



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **2 870 991**

⑮ Int. Cl.:
C07K 14/705 (2006.01)

⑫

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑥ Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.04.2016 PCT/US2016/027995**

⑦ Fecha y número de publicación internacional: **20.10.2016 WO16168771**

⑨ Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.04.2016 E 16720255 (5)**

⑩ Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.03.2021 EP 3283508**

④ Título: **Proteínas inmunomoduladoras con afinidades ajustables**

⑩ Prioridad:

**17.04.2015 US 201562149437 P
14.09.2015 US 201562218534 P**

⑤ Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

28.10.2021

⑦ Titular/es:

**ALPINE IMMUNE SCIENCES, INC. (100.0%)
188 East Blaine Street, Suite 200
Seattle, WA 98102, US**

⑦ Inventor/es:

**SWANSON, RYAN y
KORNACKER, MICHAEL**

⑦ Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 870 991 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Proteínas inmunomoduladoras con afinidades ajustables

Campo

5 La presente invención se refiere a proteínas terapéuticas para modular la respuesta inmune en el tratamiento del cáncer y las enfermedades inmunológicas.

Antecedentes

10 La modulación de la respuesta inmune mediante la intervención en los procesos que ocurren en la sinapsis inmunológica (SI) formada por y entre células presentadoras de antígeno (APC) o células diana y linfocitos tiene un interés médico cada vez mayor. Actualmente, los productos biológicos utilizados para potenciar o suprimir la respuesta inmune se han limitado generalmente a inmunoglobulinas (p. ej., mAb anti-PD-1) o receptores solubles (p. ej., Fc-CTLA4). Los receptores solubles adolecen de una serie de deficiencias. Si bien son útiles para antagonizar las interacciones entre proteínas, los receptores solubles a menudo carecen de la capacidad de agonizar tales interacciones. Los anticuerpos han demostrado ser menos limitados a este respecto y se conocen en la técnica 15 ejemplos de anticuerpos tanto agonistas como antagonistas. Sin embargo, tanto los receptores solubles como los anticuerpos carecen de atributos importantes que son críticos para funcionar en la SI. Desde el punto de vista del mecanismo, las proteínas de la superficie celular en la SI pueden implicar la interacción coordinada y, a menudo, simultánea de múltiples dianas proteicas con una sola proteína a la que se unen. Las interacciones SI ocurren en estrecha asociación con la unión de dos células, y una sola proteína en esta estructura puede interaccionar tanto con una proteína en la misma célula (cis) como con una proteína en la célula asociada (trans), probablemente al mismo 20 tiempo. Por tanto, existe la necesidad de moléculas mejoradas para la modulación de las respuestas inmunes. Se proporcionan realizaciones que satisfacen tales necesidades.

Resumen

25 En la presente memoria se proporcionan proteínas inmunomoduladoras que exhiben afinidades de unión alteradas con parejas de unión que son ligandos proteicos inmunes implicados en las respuestas inmunológicas, como se define en las reivindicaciones adjuntas. En algunas realizaciones, las proteínas inmunomoduladoras proporcionadas pueden modular, tal como potenciar o amortiguar, la actividad del ligando proteico inmune, modulando así las respuestas inmunológicas. En algunas realizaciones, también se proporcionan proteínas inmunomoduladoras para su uso en 30 métodos para modular respuestas inmunes poniendo en contacto células que expresan uno o más de los ligandos proteicos inmunes con la proteína inmunomoduladora proporcionada, por ejemplo, en el tratamiento inmunoterapéutico de enfermedades o afecciones que se pueden tratar modulando la respuesta inmune.

35 Según la invención reivindicada, en la presente memoria se proporciona una proteína inmunomoduladora, que comprende al menos un dominio no de inmunoglobulina de la superfamilia de las inmunoglobulinas (IgSF) modificado por afinidad que comprende una o más sustituciones de aminoácidos en un dominio IgSF de tipo salvaje, en donde: al menos un dominio de IgSF con afinidad modificada tiene una unión aumentada a al menos dos compañeros de unión afines en comparación con el dominio de IgSF de tipo salvaje; y el al menos un dominio de IgSF con afinidad modificada se une específicamente de forma no competitiva a los al menos dos compañeros de unión afines. En algunas realizaciones, los al menos dos compañeros de unión afines son especies moleculares de la superficie celular expresadas en la superficie de una célula de mamífero. En algunas realizaciones, las especies moleculares de la superficie celular se expresan en configuración cis o configuración trans. En algunas realizaciones, la célula de mamífero es una de las dos células de mamífero que forman una sinapsis inmunológica (SI) y cada una de las especies moleculares de la superficie celular se expresa en al menos una de las dos células de mamífero que forman la SI. En 40 algunas realizaciones, al menos una de las células de mamífero es un linfocito. En algunas realizaciones, el linfocito es una célula NK o una célula T. En algunas realizaciones, la unión del dominio de IgSF con afinidad modificada modula la actividad inmunológica del linfocito.

45 En algunas realizaciones, la proteína inmunomoduladora es capaz de dar lugar a una actividad inmunológica incrementada en comparación con la proteína de tipo salvaje que comprende el dominio de IgSF de tipo salvaje. En algunas realizaciones, la proteína inmunomoduladora es capaz de dar lugar a una actividad inmunológica disminuida en comparación con la proteína de tipo salvaje que comprende el dominio de IgSF de tipo salvaje. En algunas realizaciones, al menos una de las células de mamífero es una célula tumoral. En algunas realizaciones, las células de mamífero son células humanas. En algunas realizaciones, el dominio de IgSF con afinidad modificada es capaz de 50 unirse específicamente a las dos células de mamífero que forman la SI.

55 Según la invención reivindicada y según una cualquiera de las proteínas inmunomoduladoras descritas anteriormente, el dominio de IgSF de tipo salvaje es de un miembro de la familia de IgSF de una familia seleccionada de la familia de proteínas reguladoras de señales (SIRP), familia semejantes al receptor de activación expresado en células mieloides (TREML), familia de moléculas de adhesión celular relacionadas con antígenos carcinoembrionarios (CEACAM), familia de lectinas similares a Ig de unión a ácido siálico (SIGLEC), familia de butirofilinas, familia B7, familia CD28, familia que contiene dominios de conjunto V y de inmunoglobulina (VSIG), familia de dominios de conjunto V transmembrana (VSTM), familia de complejos mayores de histocompatibilidad (MHC), familia de moléculas de

- activación linfocítica de señalización (SLAM), receptor semejante a inmunoglobulina leucocitaria (LIR), familia de nectina (Nec), familia semejante a nectina (NECL), familia relacionada con el receptor de poliovirus (PVR), familia de receptores desencadenantes de citotoxicidad natural (NCR), familia de inmunoglobulina y mucina de células T (TIM) o familia de receptores semejantes a inmunoglobulina de células asesinas (KIR). Según la invención reivindicada, el dominio de IgSF de tipo salvaje es de un miembro de IgSF seleccionado de CD80. En algunas realizaciones, el dominio de IgSF de tipo salvaje es un miembro de IgSF humano.
- En algunas realizaciones según una cualquiera de las proteínas inmunomoduladoras descritas anteriormente, el dominio de IgSF de tipo salvaje es un dominio IgV, un dominio IgC1, un dominio IgC2 o un fragmento de unión específico del mismo. En algunas realizaciones, el dominio de IgSF con afinidad modificada es un dominio IgV con afinidad modificada, un dominio IgC1 con afinidad modificada o un dominio IgC2 con afinidad modificada o es un fragmento de unión específico del mismo que comprende una o más sustituciones de aminoácidos.
- En algunas realizaciones según una cualquiera de las proteínas inmunomoduladoras descritas anteriormente, la proteína inmunomoduladora comprende al menos dos dominios de IgSF no de inmunoglobulina con afinidad modificada. En algunas realizaciones, cada uno de los dominios de IgSF no de inmunoglobulina con afinidad modificada se une a un compañero de unión afín diferente, en donde los dos dominios de IgSF con afinidad modificada se unen específicamente de forma no competitiva a los al menos dos compañeros de unión afines diferentes. En algunas realizaciones, los al menos dos dominios no de inmunoglobulina de IgSF con afinidad modificada comprenden cada uno una o más sustituciones de aminoácidos diferentes en el mismo dominio de IgSF de tipo salvaje. En algunas realizaciones, los al menos dos dominios de IgSF no de inmunoglobulina con afinidad modificada comprenden cada uno una o más sustituciones de aminoácidos en diferentes dominios de IgSF de tipo salvaje. En algunas realizaciones, los diferentes dominios de IgSF de tipo salvaje son de diferentes miembros de la familia de IgSF.
- En algunas realizaciones según una cualquiera de las proteínas inmunomoduladoras descritas anteriormente, la proteína inmunomoduladora comprende sólo un dominio de IgSF no de inmunoglobulina con afinidad modificada.
- Según la invención reivindicada y según una cualquiera de las proteínas inmunomoduladoras descritas anteriormente, la IgSF modificada por afinidad comprende al menos un 85 % de identidad de secuencia con un dominio de IgSF de tipo salvaje o un fragmento de unión específico del mismo contenido en la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, la proteína inmunomoduladora comprende además una segunda IgSF modificada por afinidad, en donde el segundo dominio de IgSF con afinidad modificada comprende al menos un 85 % de identidad de secuencia con un dominio de IgSF de tipo salvaje o un fragmento de unión específico del mismo contenido en la secuencia de aminoácidos mostrada en cualquiera de las SEQ ID NO: 1-27.
- Según la invención reivindicada y según una cualquiera de las proteínas inmunomoduladoras descritas anteriormente, el dominio de IgSF de tipo salvaje es un miembro de la familia B7. Según la invención reivindicada, el dominio de IgSF de tipo salvaje es un dominio de CD80.
- Según la invención reivindicada y según una cualquiera de las proteínas inmunomoduladoras descritas anteriormente, en la presente memoria se proporciona una proteína inmunomoduladora, que comprende al menos un dominio de la superfamilia de inmunoglobulinas (IgSF) CD80 con afinidad modificada que comprende una o más sustituciones de aminoácidos en un dominio de IgSF de CD80 de tipo salvaje, en donde el al menos un dominio de IgSF de CD80 con afinidad modificada tiene una unión aumentada a al menos dos compañeros de unión afines en comparación con el dominio de IgSF de CD80 de tipo salvaje.
- Según la invención reivindicada y según una cualquiera de las proteínas inmunomoduladoras descritas anteriormente, los compañeros de unión afines son CD28 y PD-L1. En algunas realizaciones, el dominio de IgSF de tipo salvaje es un dominio IgV y/o el dominio de CD80 con afinidad modificada es un dominio IgV con afinidad modificada. Según la invención reivindicada, el dominio con afinidad modificada comprende al menos un 85 % de identidad de secuencia con un dominio de CD80 de tipo salvaje o un fragmento de unión específico del mismo contenido en la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 1.
- En algunas realizaciones según una cualquiera de las proteínas inmunomoduladoras descritas anteriormente, el al menos un dominio de IgSF con afinidad modificada comprende al menos 1 y no más de veinte sustituciones de aminoácidos en el dominio de IgSF de tipo salvaje. En algunas realizaciones, el al menos un dominio de IgSF con afinidad modificada comprende al menos 1 y no más de diez sustituciones de aminoácidos en el dominio de IgSF de tipo salvaje. En algunas realizaciones, el al menos un dominio de IgSF con afinidad modificada comprende al menos 1 y no más de cinco sustituciones de aminoácidos en el dominio de IgSF de tipo salvaje.
- En algunas realizaciones según una cualquiera de las proteínas inmunomoduladoras descritas anteriormente, el dominio de IgSF con afinidad modificada tiene al menos un 120 % de la afinidad de unión como su dominio IgSF de tipo salvaje a cada uno de los al menos dos compañeros de unión afines.
- En algunas realizaciones según una cualquiera de las proteínas inmunomoduladoras descritas anteriormente, la proteína inmunomoduladora comprende además un dominio de IgSF no con afinidad modificada.
- En algunas realizaciones según una cualquiera de las proteínas inmunomoduladoras descritas anteriormente, la

proteína inmunomoduladora es soluble. En algunas realizaciones, la proteína inmunomoduladora carece de un dominio transmembrana o un dominio citoplásico. En algunas realizaciones, la proteína inmunomoduladora comprende solo el dominio extracelular (ECD) o un fragmento de unión específico del mismo que comprende el dominio de IgSF con afinidad modificada.

- 5 En algunas realizaciones según una cualquiera de las proteínas inmunomoduladoras descritas anteriormente, la proteína inmunomoduladora está glicosilada o pegilada.

En algunas realizaciones según una cualquiera de las proteínas inmunomoduladoras descritas anteriormente, la proteína inmunomoduladora está unida a un dominio de multimerización. En algunas realizaciones, la proteína inmunomoduladora está unida a un dominio Fc o una variante del mismo con función efectora reducida. En algunas 10 realizaciones, el dominio Fc es un dominio de IgG1, un dominio de IgG2 o es una variante del mismo con función efectora reducida. En algunas realizaciones, el dominio Fc es de mamífero, opcionalmente humano; o el dominio Fc variante comprende una o más modificaciones de aminoácidos en comparación con un dominio Fc no modificado que es de mamífero, opcionalmente humano. En algunas realizaciones, el dominio Fc o variante del mismo comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 226 o SEQ ID NO: 227 o una secuencia de aminoácidos que 15 exhibe al menos un 85 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 226 o SEQ ID NO: 227.

En algunas realizaciones según una cualquiera de las proteínas inmunomoduladoras descritas anteriormente, la proteína inmunomoduladora está unida indirectamente a través de un enlazador.

En algunas realizaciones según una cualquiera de las proteínas inmunomoduladoras descritas anteriormente, la proteína inmunomoduladora es un dímero.

- 20 En algunas realizaciones según una cualquiera de las proteínas inmunomoduladoras descritas anteriormente, la proteína inmunomoduladora está unida a una membrana liposomal.

En la presente memoria también se describen proteínas inmunomoduladoras que comprenden al menos dos dominios de la superfamilia de inmunoglobulinas (IgSF) que no son inmunoglobulina, en donde: al menos uno es un dominio de IgSF con afinidad modificada y los al menos dos dominios de IgSF que no son de inmunoglobulina se unen cada uno independientemente a al menos un compañero de unión diferente. En algunas realizaciones, los al menos dos dominios de IgSF que no son de inmunoglobulina se unen de forma no competitiva a los diferentes compañeros de unión. En algunas realizaciones, el dominio de IgSF con afinidad modificada contiene una sustitución de aminoácido más en un primer dominio de IgSF de tipo salvaje o no modificado. En algunas realizaciones, el otro dominio de IgSF es un dominio de IgSF de tipo salvaje o no modificado. En algunas realizaciones, el otro dominio de IgSF es también 30 un dominio de IgSF con afinidad modificada.

En algunas realizaciones según una cualquiera de las proteínas inmunomoduladoras anteriores, la proteína inmunomoduladora contiene al menos dos dominios de IgSF que no son de inmunoglobulina con afinidad modificada (un primer dominio de IgSF con afinidad modificada y un segundo dominio de IgSF con afinidad modificada) en los que el primer dominio de IgSF no modificado que no es de inmunoglobulina comprende una o más sustituciones de aminoácidos en un primer dominio de IgSF de tipo salvaje y el segundo dominio de IgSF no modificado que no es de inmunoglobulina comprende una o más sustituciones de aminoácidos en un segundo dominio de IgSF de tipo salvaje, y en el que el primer y el segundo dominio de IgSF no modificado que no es de inmunoglobulina se une cada uno 35 específicamente a al menos un compañero de unión afín diferente. En algunas realizaciones, los al menos dos dominios de IgSF que no son de inmunoglobulina se unen de forma no competitiva a los diferentes compañeros de unión. En algunas realizaciones, el primer y segundo dominio de IgSF modificado que no es de inmunoglobulina se modifica por afinidad para exhibir una unión alterada a su compañero de unión afín. Por tanto, en algunas 40 realizaciones, el primer y segundo dominios de IgSF modificados que no son de inmunoglobulina son dominios de IgSF con afinidad modificada. En algunas realizaciones, el primer dominio de IgSF no modificado que no es de inmunoglobulina exhibe una unión alterada a al menos uno de sus compañeros de unión afines en comparación con el primer dominio de IgSF de tipo salvaje; y el segundo dominio de IgSF modificado que no es de inmunoglobulina exhibe una unión alterada a al menos uno de sus compañeros de unión afines en comparación con el segundo dominio 45 de IgSF de tipo salvaje. En algunas realizaciones, la unión alterada aumenta o disminuye independientemente.

En algunas realizaciones, los diferentes compañeros de unión afines son especies moleculares de la superficie celular expresadas en la superficie de una célula de mamífero. En algunas realizaciones, las diferentes especies moleculares 50 de la superficie celular se expresan en configuración cis o configuración trans. En algunas realizaciones, la célula de mamífero es una de las dos células de mamífero que forman una sinapsis inmunológica (IS) y las diferentes especies moleculares de la superficie celular se expresan en al menos una de las dos células de mamífero que forman la IS. En algunas realizaciones, al menos una de las células de mamífero es un linfocito. En algunas realizaciones, el linfocito es una célula NK o una célula T. En algunas realizaciones, la unión de la proteína inmunomoduladora a la célula 55 modula la actividad inmunológica del linfocito. En algunas realizaciones, la proteína inmunomoduladora es capaz de dar lugar a una actividad inmunológica incrementada en comparación con la proteína de tipo salvaje que comprende el dominio de IgSF de tipo salvaje. En algunas realizaciones, la proteína inmunomoduladora es capaz de dar lugar a una actividad inmunológica disminuida en comparación con la proteína de tipo salvaje que comprende el dominio de IgSF de tipo salvaje. En algunas realizaciones, al menos una de las células de mamífero es una célula tumoral. En

algunas realizaciones, las células de mamífero son células humanas. En algunas realizaciones, la proteína inmunomoduladora es capaz de unirse específicamente a las dos células de mamífero que forman la IS.

5 En algunas realizaciones según una cualquiera de las proteínas inmunomoduladoras descritas anteriormente, el primer y segundo dominios de IgSF modificados comprenden cada uno una o más sustituciones de aminoácidos en diferentes dominios de IgSF de tipo salvaje. En algunas realizaciones, los diferentes dominios de IgSF de tipo salvaje son de diferentes miembros de la familia de IgSF. En la presente memoria también se describen proteínas inmunomoduladoras en las que el primer y segundo dominios de IgSF modificados son combinaciones que no son de tipo salvaje. En algunas realizaciones, el primer dominio de IgSF de tipo salvaje y el segundo dominio de IgSF de tipo salvaje, cada uno individualmente, es de un miembro de la familia de IgSF de una familia seleccionada de la familia 10 de proteínas reguladoras de señales (SIRP), familia semejante al receptor de activación expresado en células mieloides (TREML), familia de moléculas de adhesión celular relacionadas con antígenos carcinoembriónarios (CEACAM), familia de lectinas similares a Ig de unión a ácido siálico (SIGLEC), familia de butirofilinas, familia B7, familia CD28, familia que contiene dominios de conjunto V y de inmunoglobulina (VSIG), familia de dominios de conjunto V transmembrana (VSTM), familia de complejos mayores de histocompatibilidad (MHC), familia de moléculas 15 de activación linfocítica de señalización (SLAM), receptor semejante a inmunoglobulina leucocitaria (LIR), familia de nectina (Nec), familia semejante a nectina (NECL), familia relacionada con el receptor de poliovirus (PVR), familia de receptores desencadenantes de citotoxicidad natural (NCR), familia de inmunoglobulina y mucina de células T (TIM) o familia de receptores semejantes a inmunoglobulina de células asesinas (KIR). En algunas realizaciones, el primer dominio de IgSF de tipo salvaje y el segundo dominio de IgSF de tipo salvaje, cada uno individualmente, es de un 20 miembro de IgSF seleccionado de CD80, CD86, PD-L1, PD-L2, Ligando ICOS, B7-H3, B7-H4, CD28, CTLA4, PD-1, ICOS, BTLA, CD4, CD8-alfa, CD8-beta, LAG3, TIM-3, CEACAM1, TIGIT, PVR, PVRL2, CD226, CD2, CD160, CD200, CD200R o Nkp30.

25 En algunas realizaciones según una cualquiera de las proteínas inmunomoduladoras descritas anteriormente, el primer dominio de IgSF modificado y el segundo dominio de IgSF modificado, cada uno individualmente, comprende al menos un 85 % de identidad de secuencia con un dominio de IgSF de tipo salvaje o un fragmento de unión específico del mismo contenido en la secuencia de aminoácidos mostrada en cualquiera de las SEQ ID NO: 1-27.

30 En algunas realizaciones según una cualquiera de las proteínas inmunomoduladoras descritas anteriormente, el primer y segundo dominio de IgSF de tipo salvaje, cada uno individualmente, es un miembro de la familia B7. En algunas realizaciones, el primer y segundo dominio de IgSF de tipo salvaje, cada uno individualmente, es de CD80, CD86 o ICOSLG. En algunas realizaciones, el primer o segundo dominio de IgSF de tipo salvaje es de un miembro de la familia B7 y el otro del primer o segundo dominio de IgSF de tipo salvaje es de otra familia de IgSF.

En la presente memoria también se describen proteínas inmunomoduladoras según una cualquiera de las proteínas inmunomoduladoras descritas anteriormente, en donde el primer y segundo dominio de IgSF de tipo salvaje es de ICOSLG y Nkp30.

35 En algunas realizaciones según una cualquiera de las proteínas inmunomoduladoras descritas anteriormente, el primer y segundo dominio de IgSF de tipo salvaje es de CD80 y Nkp30.

En algunas realizaciones según una cualquiera de las proteínas inmunomoduladoras descritas anteriormente, el primer y segundo dominio de IgSF de tipo salvaje, cada uno individualmente, es un miembro de IgSF humana.

40 En algunas realizaciones según una cualquiera de las proteínas inmunomoduladoras descritas anteriormente, el primer y segundo dominio de IgSF de tipo salvaje, cada uno individualmente, es un dominio IgV y un dominio IgC1, un dominio IgC2 o una unión específica del mismo. En algunas realizaciones, el primer dominio modificado que no es inmunoglobulina y el segundo dominio modificado que no es inmunoglobulina, cada uno individualmente, es un dominio IgV modificado, un dominio IgC1 modificado o un dominio IgC2 modificado o es un fragmento de unión específico del mismo que comprende una o más sustituciones de aminoácidos. En algunas realizaciones, al menos uno del primer dominio modificado que no es inmunoglobulina o el segundo dominio modificado que no es inmunoglobulina es un dominio IgV modificado. En algunas realizaciones, el primer dominio de IgSF modificado que no es de inmunoglobulina y el segundo dominio de IgSF modificado que no es de inmunoglobulina, cada uno individualmente, comprende 1 y no más de veinte sustituciones de aminoácidos. En algunas realizaciones, el primer dominio de IgSF modificado que no es de inmunoglobulina y el segundo dominio de IgSF modificado que no es de inmunoglobulina, cada uno individualmente, comprende 1 y no más de diez sustituciones de aminoácidos. En algunas realizaciones, el primer dominio de IgSF modificado que no es de inmunoglobulina y el segundo dominio de IgSF modificado que no es de inmunoglobulina, cada uno individualmente, comprende 1 y no más de cinco sustituciones de aminoácidos.

55 En algunas realizaciones según una cualquiera de las proteínas inmunomoduladoras descritas anteriormente, al menos uno del primer o segundo dominio de IgSF modificado que no es de inmunoglobulina tiene entre un 10 % y un 90 % de la afinidad de unión del dominio de IgSF de tipo salvaje para al menos uno de sus compañeros de unión afines. En algunas realizaciones, al menos uno del primer o segundo dominio de IgSF modificado que no es de inmunoglobulina tiene al menos un 120 % de la afinidad de unión del dominio de IgSF de tipo salvaje para al menos uno de sus compañeros de unión afines.

- En algunas realizaciones según una cualquiera de las proteínas inmunomoduladoras descritas anteriormente, el primer y segundo dominio de IgSF modificado que no es de inmunoglobulina, cada uno individualmente, tiene al menos un 120 % de la afinidad de unión del dominio de IgSF de tipo salvaje para al menos uno de sus compañeros de unión afines.
- 5 En algunas realizaciones según una cualquiera de las proteínas inmunomoduladoras descritas anteriormente, la proteína inmunomoduladora es soluble.
- En algunas realizaciones según una cualquiera de las proteínas inmunomoduladoras descritas anteriormente, la proteína inmunomoduladora está glicosilada o pegilada.
- 10 En algunas realizaciones según una cualquiera de las proteínas inmunomoduladoras descritas anteriormente, la proteína inmunomoduladora está unida a un dominio de multimerización. En algunas realizaciones, la proteína inmunomoduladora está unida a un dominio Fc o una variante del mismo con función efectora reducida. En algunas realizaciones, el dominio Fc es un dominio de IgG1, un dominio de IgG2 o es una variante del mismo con función efectora reducida. En algunas realizaciones, el dominio Fc es de mamífero, opcionalmente humano; o el dominio Fc variante comprende una o más modificaciones de aminoácidos en comparación con un dominio Fc no modificado que es de mamífero, opcionalmente humano. En algunas realizaciones, el dominio Fc o variante del mismo comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 226 o SEQ ID NO: 227 o una secuencia de aminoácidos que exhibe al menos un 85 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 226 o SEQ ID NO: 227.
- 15 En algunas realizaciones según una cualquiera de las proteínas inmunomoduladoras descritas anteriormente, el polipéptido CD80 variante se une indirectamente a través de un enlazador.
- 20 En algunas realizaciones según una cualquiera de las proteínas inmunomoduladoras descritas anteriormente, la proteína inmunomoduladora es un dímero.
- En algunas realizaciones según una cualquiera de las proteínas inmunomoduladoras descritas anteriormente, la proteína inmunomoduladora comprende además uno o más dominios adicionales de IgSF que no son inmunoglobulina que son iguales o diferentes del primer o segundo dominio de IgSF no modificado que no es inmunoglobulina. En algunas realizaciones, el uno o más dominios adicionales de IgSF que no son inmunoglobulina es un dominio de IgSF con afinidad modificada.
- 25 En algunas realizaciones según una cualquiera de las proteínas inmunomoduladoras descritas anteriormente, la proteína inmunomoduladora está unida a una membrana liposomal.
- 30 En algunas realizaciones, en la presente memoria se proporciona una molécula de ácido nucleico que codifica el polipéptido inmunomodulador según una cualquiera de las realizaciones descritas anteriormente. En algunas realizaciones, la molécula de ácido nucleico es un ácido nucleico sintético. En algunas realizaciones, la molécula de ácido nucleico es ADNc.
- En algunas realizaciones, en la presente memoria se proporciona un vector, que comprende la molécula de ácido nucleico según una cualquiera de las realizaciones descritas anteriormente. En algunas realizaciones, el vector es un vector de expresión.
- 35 En algunas realizaciones, en la presente memoria se proporciona una célula, que comprende el vector según una cualquiera de las realizaciones descritas anteriormente. En algunas realizaciones, la célula es una célula eucariota o una célula procariota.
- En algunas realizaciones, en la presente memoria se proporciona un método para producir una proteína inmunomoduladora, que comprende introducir la molécula de ácido nucleico según una cualquiera de las realizaciones descritas anteriormente o el vector según una cualquiera de las realizaciones descritas anteriormente en una célula huésped en condiciones para expresar la proteína en la célula. En algunas realizaciones, el método comprende además aislar o purificar la proteína inmunomoduladora de la célula.
- 40 En algunas realizaciones, en la presente memoria se proporciona una composición farmacéutica que comprende la proteína inmunomoduladora según una cualquiera de las realizaciones descritas anteriormente. En algunas realizaciones, la composición farmacéutica comprende un excipiente farmacéuticamente aceptable. En algunas realizaciones, la composición farmacéutica es estéril.
- En la presente memoria también se describe un artículo de fabricación que comprende la composición farmacéutica según una cualquiera de las realizaciones descritas anteriormente en un vial. En algunas realizaciones, el vial está sellado.
- 45 En la presente memoria también se describe un kit que comprende la composición farmacéutica según una cualquiera de las realizaciones descritas anteriormente e instrucciones para su uso.
- En la presente memoria también se describe un kit que comprende el artículo de fabricación según una cualquiera de las realizaciones descritas anteriormente, e instrucciones para su uso.

En algunas realizaciones, en la presente memoria se proporciona una composición farmacéutica según una cualquiera de las realizaciones descritas anteriormente para su uso en un método para modular una respuesta inmune en un sujeto. En algunas realizaciones, el método comprende administrar a un sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de la proteína inmunomoduladora según una cualquiera de las realizaciones descritas anteriormente. En algunas

- 5 realizaciones, la modulación de la respuesta inmune trata una enfermedad o afección en el sujeto. En algunas realizaciones, se incrementa la respuesta inmune. En algunas realizaciones, la enfermedad o afección es un tumor o cáncer. En algunas realizaciones, la enfermedad o afección se selecciona de melanoma, cáncer de pulmón, cáncer de vejiga o una malignidad hematológica. En algunas realizaciones, se reduce la respuesta inmune. En algunas realizaciones, la enfermedad o afección es una enfermedad o afección inflamatoria. En algunas realizaciones, la enfermedad o afección se selecciona de enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, esclerosis múltiple, asma, artritis reumatoide o psoriasis.

En la presente memoria también se describe un método para identificar una proteína inmunomoduladora modificada por afinidad, que comprende: a) poner en contacto una proteína modificada que comprende al menos un dominio de la superfamilia de inmunoglobulinas (IgSF) que no es de inmunoglobulina modificada o un fragmento de unión

- 15 específico del mismo con al menos dos compañeros de unión afines en condiciones capaces de lograr la unión de la proteína con los al menos dos compañeros de unión afines, en donde el al menos un dominio de IgSF modificado comprende una o más sustituciones de aminoácidos en un dominio de IgSF de tipo salvaje; b) identificar una proteína modificada que comprende el dominio de IgSF modificado que tiene una unión aumentada a al menos uno de los dos compañeros de unión afines en comparación con una proteína que comprende el dominio de IgSF de tipo salvaje; y
- 20 c) seleccionar una proteína modificada que comprende el dominio de IgSF modificado que se une de forma no competitiva a los al menos dos compañeros de unión afines, identificando así la proteína inmunomoduladora modificada por afinidad. La etapa b) puede comprender identificar una proteína modificada que comprende un dominio de IgSF modificado que tiene una unión aumentada a cada uno de los al menos dos compañeros de unión afines en comparación con una proteína que comprende el dominio de tipo salvaje. Antes de la etapa a), se pueden introducir
- 25 una o más sustituciones de aminoácidos en el dominio de IgSF de tipo salvaje, generando así una proteína modificada que comprende el dominio de IgSF modificado. La proteína modificada puede comprender al menos dos dominios de IgSF modificados o fragmentos de unión específicos de los mismos, en donde el primer dominio de IgSF comprende una o más sustituciones de aminoácidos en un primer dominio de IgSF de tipo salvaje y el segundo dominio de IgSF con afinidad modificada que no es inmunoglobulina comprende una o más sustituciones de aminoácidos en un
- 30 segundo dominio de IgSF de tipo salvaje. El primer y segundo dominio de IgSF con afinidad modificada que no es inmunoglobulina pueden unirse cada uno específicamente a al menos un compañero de unión afín diferente.

En algunas realizaciones, también se proporcionan proteínas inmunomoduladoras de la invención que comprenden al menos un dominio de la superfamilia de inmunoglobulinas (IgSF) con afinidad modificada que no es inmunoglobulina. Según la invención reivindicada, el dominio de IgSF con afinidad modificada se une específicamente de manera no

- 35 competitiva a al menos dos especies moleculares de la superficie celular. En algunas realizaciones, cada una de las especies moleculares se expresa en al menos una de las dos células de mamífero que forman una sinapsis inmunológica (IS). En algunas realizaciones, las especies moleculares están en configuración cis o configuración trans. En algunas realizaciones, una de las células de mamífero es un linfocito y la unión del dominio de IgSF con afinidad modificada modula la actividad inmunológica del linfocito. En algunas realizaciones, el dominio de IgSF con afinidad modificada se une específicamente a las dos células de mamífero que forman la IS.

En algunas realizaciones, la proteína inmunomoduladora de la invención comprende al menos dos dominios de IgSF con afinidad modificada que no son inmunoglobulina y la proteína inmunomoduladora se une específicamente a las dos células de mamífero que forman la IS. En algunas realizaciones, la proteína inmunomoduladora comprende al menos dos dominios de IgSF con afinidad modificada, en donde los dominios de IgSF con afinidad modificada no son la misma especie de dominio de IgSF.

En algunas realizaciones, una de las dos células de mamífero es una célula tumoral. En algunas realizaciones, el linfocito es una célula NK o una célula T. En algunas realizaciones, las células de mamífero son células de ratón, rata, mono cynomolgus o humanas.

En algunas realizaciones, las especies moleculares de la superficie celular IgSF son miembros de IgSF humana.

- 50 En algunas realizaciones, la proteína inmunomoduladora comprende un miembro de IgSF de mamífero con afinidad modificada. En algunas realizaciones, el dominio de IgSF con afinidad modificada es un dominio IgV, IgC1 o IgC2 con afinidad modificada. En algunas realizaciones, el dominio de IgSF con afinidad modificada difiere en al menos una y no más de diez sustituciones de aminoácidos de su dominio de IgSF de tipo salvaje. En algunas realizaciones, el dominio de IgSF con afinidad modificada difiere en al menos una y no más de cinco sustituciones de aminoácidos de su dominio de IgSF de tipo salvaje.

Según la invención reivindicada, el miembro de IgSF humano con afinidad modificada es CD80. En algunas realizaciones, el dominio de IgSF con afinidad modificada comprende al menos un dominio de CD80 humano con afinidad modificada. En algunas realizaciones, el dominio de IgSF con afinidad modificada es un dominio de IgSF CD80 humano.

En algunas realizaciones, la proteína inmunomoduladora tiene al menos un 85 % de identidad de secuencia con una secuencia de aminoácidos seleccionada de las SEQ ID NO: 1-27, o un fragmento de la misma. En algunas realizaciones, la proteína inmunomoduladora tiene al menos un 90 % de identidad de secuencia con una secuencia de aminoácidos seleccionada de las SEQ ID NO: 1-27 o un fragmento de la misma. En algunas realizaciones, la proteína inmunomoduladora tiene al menos un 95 % de identidad de secuencia con una secuencia de aminoácidos seleccionada de las SEQ ID NO: 1-27, o un fragmento de la misma. En algunas realizaciones, la proteína inmunomoduladora tiene al menos un 99 % de identidad de secuencia con una secuencia de aminoácidos seleccionada de las SEQ ID NO: 1-27, o un fragmento de la misma. En algunas realizaciones, la proteína inmunomoduladora que tiene al menos un 85 %, 90 %, 95 % o 99 % de identidad de secuencia con una secuencia de aminoácidos seleccionada de las SEQ ID NO: 1-27 o un fragmento de la misma comprende además una segunda proteína inmunomoduladora, en donde la segunda proteína inmunomoduladora tiene al menos un 85 %, 90 %, 95 % o 99 % de identidad de secuencia con una secuencia de aminoácidos seleccionada de las SEQ ID NO: 1-27 o un fragmento de la misma.

En algunas realizaciones, se potencia la actividad inmunológica. En otras, se suprime.

15 En algunas realizaciones, el dominio de IgSF con afinidad modificada tiene entre un 10 % y un 90 % de la afinidad de unión del dominio de IgSF de tipo salvaje para al menos una de las dos especies moleculares de la superficie celular. En algunas realizaciones, el dominio de IgSF con afinidad modificada se une específicamente de forma no competitiva a exactamente un miembro de IgSF. En algunas realizaciones, el dominio de IgSF con afinidad modificada tiene al menos un 120 % de la afinidad de unión como su dominio de IgSF de tipo salvaje para al menos una de las dos especies moleculares de la superficie celular.

20 En algunas realizaciones, la proteína inmunomoduladora está unida covalentemente, directa o indirectamente, a un fragmento de anticuerpo cristalizable (Fc). En algunas realizaciones, la proteína inmunomoduladora está glicosilada o pegilada. En algunas realizaciones, la proteína inmunomoduladora es soluble. En algunas realizaciones, la proteína inmunomoduladora está embebida en una membrana liposomal. En algunas realizaciones, la proteína inmunomoduladora se dimeriza mediante enlaces disulfuro intermoleculares.

25 En algunas realizaciones, la proteína inmunomoduladora está en un vehículo farmacéuticamente aceptable.

30 En otro aspecto, en la presente memoria se proporcionan proteínas inmunomoduladoras de la invención que comprenden al menos dos dominios de la superfamilia de las inmunoglobulinas (IgSF) modificados por afinidad que no son inmunoglobulinas. Cada uno de los dominios de IgSF con afinidad modificada se une específicamente a su propia especie molecular de la superficie celular. Cada una de las especies moleculares se expresa en al menos una de las dos células de mamífero que forman una sinapsis inmunológica (IS) y una de las células de mamífero es un linfocito. Las especies moleculares están, en algunas realizaciones, en configuración cis o configuración trans. La unión del dominio de IgSF con afinidad modificada modula la actividad inmunológica del linfocito. En algunas realizaciones, al menos uno de los dominios de IgSF con afinidad modificada se une de forma competitiva. En algunas 35 realizaciones, los dominios de IgSF con afinidad modificada no son la misma especie de dominio de IgSF. En algunas realizaciones, los dominios de IgSF con afinidad modificada son combinaciones de tipo no salvaje. En algunas realizaciones, las especies moleculares de la superficie celular son miembros de IgSF humano. Según la invención reivindicada, los al menos dos dominios de IgSF con afinidad modificada son de al menos uno de: CD80, CD86, CD274, PDCD1LG2, ICOSLG, CD276, VTCN1, CD28, CTLA4, PDCD1, ICOS, BTLA, CD4, CD8A, CD8B, LAG3, 40 HAVCR2, CEACAM1, TIGIT, PVR, PVRL2, CD226, CD2, CD160, CD200, NKp30 o CD200R1.

45 En algunas realizaciones, la proteína inmunomoduladora de la invención comprende al menos dos miembros de IgSF de mamífero con afinidad modificada. En algunas realizaciones, los miembros de IgSF de mamífero son miembros de IgSF humano. En algunas realizaciones, los miembros de IgSF de mamífero son al menos dos de: CD80, CD86, CD274, PDCD1LG2, ICOSLG, CD276, VTCN1, CD28, CTLA4, PDCD1, ICOS, BTLA, CD4, CD8A, CD8B, LAG3, HAVCR2, CEACAM1, TIGIT, PVR, PVRL2, CD226, CD2, CD160, CD200, NKp30 o CD200R1. En algunas realizaciones, se potencia la actividad inmunológica. En algunas realizaciones, se suprime la actividad inmunológica. En algunas realizaciones, una de las dos células de mamífero es una célula tumoral. En algunas realizaciones, el linfocito es una célula NK o una célula T. En algunas realizaciones, las células de mamífero son células de ratón, rata, mono cynomolgus o humanas. En algunas realizaciones, al menos uno de los dos dominios de IgSF con afinidad modificada tiene entre un 10 % y un 90 % de la afinidad de unión del dominio de IgSF de tipo salvaje para al menos una de las especies moleculares de la superficie celular. En algunas realizaciones, al menos uno de los dos dominios de IgSF con afinidad modificada se une específicamente a exactamente una especie molecular de la superficie celular. En algunas realizaciones, al menos uno de los dos dominios de IgSF con afinidad modificada tiene al menos un 120 % de la afinidad de unión como su dominio de IgSF de tipo salvaje para al menos una de las dos especies moleculares de la superficie celular. En algunas realizaciones, los dominios de IgSF con afinidad modificada son al menos uno de un dominio IgV, IgC1 o IgC2. En algunas realizaciones, cada uno de los al menos dos dominios de IgSF con afinidad modificada difiere en al menos una y no más de diez sustituciones de aminoácidos de su dominio de IgSF de tipo salvaje. En algunas realizaciones, cada uno de los al menos dos dominios de IgSF con afinidad modificada difiere en al menos una y no más de cinco sustituciones de aminoácidos de su dominio de IgSF de tipo salvaje. En 50 algunas realizaciones, la proteína inmunomoduladora está unida covalentemente, directa o indirectamente, a un fragmento de anticuerpo cristalizable (Fc). En algunas realizaciones, la proteína inmunomoduladora está en un fragmento de anticuerpo cristalizable (Fc). En algunas realizaciones, la proteína inmunomoduladora está en un

vehículo farmacéuticamente aceptable. En algunas realizaciones, la proteína inmunomoduladora está glicosilada o pegilada. En algunas realizaciones, la proteína inmunomoduladora es soluble. En algunas realizaciones, la proteína inmunomoduladora está embebida en una membrana liposomal. En algunas realizaciones, la proteína inmunomoduladora se dimeriza mediante enlaces disulfuro intermoleculares.

5 En otro aspecto, la presente invención se refiere a un ácido nucleico recombinante que codifica cualquiera de las proteínas inmunomoduladoras resumidas anteriormente.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un vector de expresión recombinante que comprende un ácido nucleico que codifica cualquiera de las proteínas inmunomoduladoras resumidas anteriormente.

10 En otro aspecto, la presente invención se refiere a una célula huésped recombinante que comprende un vector de expresión como se resume anteriormente.

15 En otro aspecto, la presente invención se refiere a un método para preparar cualquiera de las proteínas inmunomoduladoras resumidas anteriormente. El método comprende cultivar la célula huésped recombinante en condiciones en las que se expresa la proteína inmunomoduladora, expresar la proteína inmunomoduladora codificada por el vector de expresión recombinante en la misma y purificar la proteína inmunomoduladora recombinante expresada por la misma.

20 En otro aspecto, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende cualquiera de las proteínas inmunomoduladoras resumidas anteriormente para su uso en un método de tratamiento de un paciente mamífero que necesita una respuesta inmunológica aumentada o suprimida mediante la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de una proteína inmunomoduladora de cualquiera de las realizaciones descritas anteriormente. En algunas realizaciones, la respuesta inmunológica aumentada trata el melanoma, el cáncer de pulmón, el cáncer de vejiga o una malignidad hematológica en el paciente. En algunas realizaciones, la respuesta inmunológica suprimida trata la enfermedad de Crohn, la colitis ulcerosa, la esclerosis múltiple, el asma, la artritis reumatoide o la psoriasis en el paciente.

Breve descripción de los dibujos

25 La FIG. 1A representa los resultados de un ensayo de unión de competición para la unión de la proteína de fusión CD28.Fc recombinante biotinilada (rCD28.Fc) a la molécula de fusión variante de ECD de CD80 A91G-Fc inmovilizada en presencia de PD-L1-his humana recombinante no marcada, CTLA-4-his humana o proteína de fusión PD-L2-Fc humana.

30 La FIG. 1B representa los resultados de un ensayo de unión de competición para la unión de la proteína monomérica PD-L1-his humana recombinante biotinilada a la molécula de fusión variante de ECD de CD80 A91G-Fc inmovilizada en presencia de rCD28.Fc humana recombinante no marcado, CTLA-4.Fc humana o PD-L2.Fc humana.

35 Si una definición mostrada en la presente memoria es contraria a o de otra forma inconsistente con una definición mostrada en las patentes, solicitudes, solicitudes publicadas y otras publicaciones, prevalecerá la definición mostrada en la presente memoria.

Descripción detallada

40 En la presente memoria se proporcionan proteínas inmunomoduladoras solubles como se definen en las reivindicaciones adjuntas que son capaces de unirse a uno o más ligandos proteicos, y generalmente a dos o más ligandos proteicos, para modular, p. ej., inducir, potenciar o suprimir respuestas inmunológicas. Según la invención reivindicada, los ligandos proteicos son proteínas de la superficie celular expresadas por las células inmunes que se unen con uno o más de otros receptores inmunes, p. ej., en linfocitos, para inducir señales inhibidoras o activadoras. 45 Por ejemplo, la interacción de ciertos receptores en los linfocitos con sus ligandos de la superficie celular afines para formar una sinapsis inmunológica (IS) entre las células presentadoras de antígenos (APC) o las células diana y los linfocitos puede proporcionar señales coestimuladoras o inhibidoras que pueden regular el sistema inmune. En algunos aspectos, las proteínas inmunomoduladoras proporcionadas en la presente memoria pueden alterar la interacción de los ligandos proteicos de la superficie celular con sus receptores para modular de este modo la actividad de las células inmunes, tales como las células T.

50 En algunas realizaciones, en condiciones fisiológicas normales, la respuesta inmune mediada por células T se inicia mediante el reconocimiento de antígenos por el receptor de células T (TCR) y está regulada por un equilibrio de señales coestimuladoras e inhibidoras (es decir, proteínas de puntos de control inmunitarios). El sistema inmune se basa en puntos de control inmunológicos para prevenir la autoinmunidad (es decir, la auto-tolerancia) y para proteger a los tejidos de un daño excesivo durante una respuesta inmune, por ejemplo, durante un ataque contra una infección patógena. En algunos casos, sin embargo, estas proteínas inmunomoduladoras pueden desregularse en enfermedades y afecciones, incluyendo los tumores, como un mecanismo para evadir el sistema inmune.

55 Por tanto, en algunos aspectos, la inmunoterapia que altera la actividad de las células inmunes, tal como la actividad de las células T, puede tratar determinadas enfermedades y afecciones en las que la respuesta inmune está desregulada. Los enfoques terapéuticos que buscan modular las interacciones en la IS se beneficiarían de la

capacidad de unir múltiples dianas de la IS simultáneamente y de una manera que sea sensible a la secuencia temporal y la orientación espacial. Los enfoques terapéuticos actuales no alcanzan este objetivo. En cambio, los receptores solubles y los anticuerpos no se unen típicamente a más de una proteína diana a la vez. Esto puede deberse a la ausencia de más de una especie diana. Además, los ligandos y receptores de tipo salvaje poseen 5 afinidades bajas por los compañeros de unión afines, lo que excluye su uso como agentes terapéuticos solubles.

Sin embargo, de manera menos trivial, los receptores solubles y los anticuerpos generalmente se unen de manera competitiva (p. ej., a no más de una especie diana a la vez) y, por lo tanto, carecen de la capacidad de unirse simultáneamente a múltiples dianas. Y, aunque los anticuerpos biespecíficos, así como las modalidades que 10 comprenden regiones duales de unión a antígeno, pueden unirse a más de una molécula diana simultáneamente, la configuración tridimensional típica de estas modalidades a menudo les impide intervenir en procesos clave que ocurren en la IS de una manera consistente con sus requisitos temporales y espaciales.

Lo que se necesita es una clase completamente nueva de moléculas terapéuticas que tengan la especificidad y 15 afinidad de los anticuerpos o receptores solubles, pero, además, mantengan las restricciones de tamaño, volumen y orientación espacial requeridas en la IS y posean una mayor afinidad hacia los respectivos compañeros de unión afines. Además, dichos agentes terapéuticos tendrían la capacidad de unirse a sus dianas tanto de forma no competitiva como competitiva. Por tanto, una molécula con estas propiedades tendría una función novedosa en la 20 capacidad de integrarse en complejos de múltiples proteínas en la IS y generar la configuración de unión y la actividad biológica resultante deseadas.

Con este fin, los regímenes terapéuticos de inmuno-oncología emergentes deben romper de forma segura la tolerancia 25 de las células T inducida por los tumores. Los inmunoterapéuticos de última generación bloquean PD-1 o CTLA4, moléculas inhibidoras centrales de la familia B7/CD28 que se sabe que limitan la función efectora de las células T. Si bien los anticuerpos antagonistas contra dichas dianas únicas funcionan para disrupir los complejos de señalización del punto de control de la sinapsis inmune, no logran activar simultáneamente las células T. Por el contrario, los enfoques de anticuerpos biespecíficos activan las células T, pero no logran bloquear simultáneamente los ligandos inhibidores que regulan la señal inducida.

Para abordar estas deficiencias, se proporcionan moléculas terapéuticas según las reivindicaciones que, en algunas realizaciones, estimularán la señalización de activación de las células T y bloquearán simultáneamente la regulación 30 inhibidora. Según la invención reivindicada, las proteínas inmunomoduladoras proporcionadas se refieren a componentes de la super familia de inmunoglobulinas (IgSF) de la sinapsis inmune que se sabe que tienen un papel doble tanto en la activación de las células T como en el bloqueo de ligandos inhibidores. En aspectos particulares, las proteínas inmunomoduladoras proporcionadas proporcionan una plataforma de inmunoterapia usando ligandos inmunes nativos con afinidad modificada para generar productos biológicos de inmunoterapia que se unen con afinidades ajustables a uno o más de sus receptores inmunes afines en el tratamiento de una variedad de indicaciones oncológicas e inmunológicas. En algunos aspectos, los agentes terapéuticos basados en IgSF preparados por 35 ingeniería a partir de ligandos del sistema inmune, tales como los ligandos del sistema inmune humano, tienen más probabilidades de retener su capacidad para ensamblarse normalmente en vías clave de la sinapsis inmune y mantener interacciones y funciones reguladoras normales de una manera que no pueden lograr los anticuerpos o los reactivos biespecíficos de última generación. Esto se debe al tamaño relativamente grande de los anticuerpos, así como al hecho de que no son componentes naturales de la sinapsis inmune. Estas características únicas de los 40 ligandos del sistema inmune humano prometen proporcionar un nuevo nivel de eficacia y seguridad inmunoterapéuticas.

Los encabezamientos de las secciones usados en la presente memoria son solo para fines organizativos y no deben interpretarse como limitantes del contenido descrito.

I. Definiciones

45 A menos que se defina de otro modo, todos los términos de la técnica, notaciones y otros términos o terminología técnica y científicos usados en la presente memoria pretenden tener el mismo significado que el comúnmente entendido por un experto en la técnica a la que pertenece el contenido reivindicado. En algunos casos, los términos con significados comúnmente entendidos se definen en la presente memoria para mayor claridad y/o para una fácil referencia, y no debe interpretarse necesariamente que la inclusión de tales definiciones en la presente memoria 50 represente una diferencia sustancial con respecto a lo que se entiende generalmente en la técnica.

Los términos utilizados a lo largo de esta memoria descriptiva se definen como sigue, a menos que se limiten de otra manera en casos específicos. Tal y como se usa en la memoria descriptiva y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "una" y "el" incluyen referentes plurales a menos que el contexto indique claramente lo contrario. A menos que se defina de otro modo, todos los términos, acrónimos y abreviaturas técnicos y científicos utilizados en la presente memoria tienen el mismo significado que el comúnmente entendido por un experto en la técnica a la que pertenece la invención. A menos que se indique lo contrario, las abreviaturas y los símbolos de los nombres químicos y bioquímicos son según la nomenclatura IUPAC-IUB. A menos que se indique lo contrario, todos los rangos numéricos incluyen los valores que definen el rango, así como todos los valores enteros intermedios.

El término "con afinidad modificada", tal y como se usa en el contexto de un dominio de la superfamilia de inmunoglobulinas, significa un dominio de la superfamilia de inmunoglobulinas (IgSF) de mamíferos que tiene una secuencia de aminoácidos alterada (en relación con el dominio de IgSF de control de tipo salvaje) de modo que tiene una afinidad o avidez de unión aumentada o disminuida para al menos uno de sus compañeros de unión afines en comparación con el dominio de control de IgSF de tipo salvaje (es decir, sin afinidad modificada). En algunas realizaciones, el dominio de IgSF puede contener 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 o más diferencias de aminoácidos, tales como sustituciones de aminoácidos, en un dominio de IgSF de tipo salvaje o no modificado. Un dominio de IgSF que tiene una secuencia de aminoácidos alterada (en relación con el dominio de IgSF de tipo salvaje) que no tiene una afinidad o avidez de unión aumentada o disminuida para al menos uno de sus compañeros de unión afines en comparación con el dominio de control de IgSF de tipo salvaje es un dominio de IgSF con afinidad no modificada. Se puede determinar un aumento o disminución de la afinidad o avidez de unión usando ensayos de unión bien conocidos, tales como la citometría de flujo. Larsen et al., *American Journal of Transplantation*, Vol 5: 443-453 (2005). Véase, también, Linsley et al., *Immunity*, 1: 7930801 (1994). Un aumento en la afinidad o avidez de unión de una proteína para su o sus compañeros de unión afines tiene un valor al menos un 10 % mayor que el del control del dominio de IgSF de tipo salvaje y, en algunas realizaciones, al menos un 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 100 %, 200 %, 300 %, 500 %, 1.000 %, 5.000 % o 10.000 % mayor que el del valor de control de dominio de IgSF de tipo salvaje. Una disminución en la afinidad o avidez de unión de una proteína para al menos uno de sus compañeros de unión afines tiene un valor no superior al 90 % del control, pero no inferior al 10 % del valor de control del dominio de IgSF de tipo salvaje, y en algunas realizaciones no superior al 80 %, 70 % 60 %, 50 %, 40 %, 30 % o 20 %, pero no inferior al 10 % del valor de control del dominio de IgSF de tipo salvaje. Una proteína con afinidad modificada se altera en la secuencia de aminoácidos primaria mediante sustitución, adición o delección de residuos de aminoácidos. El término "dominio de IgSF con afinidad modificada" no debe interpretarse como que impone ninguna condición para ninguna composición o método de partida particular mediante el cual se creó el dominio de IgSF con afinidad modificada. Por tanto, los dominios de IgSF con afinidad modificada de la presente invención no se limitan a dominios de IgSF de tipo salvaje que luego se transforman en un dominio de IgSF con afinidad modificada mediante cualquier proceso particular de modificación de la afinidad. Un polipéptido de dominio de IgSF con afinidad modificada puede, por ejemplo, generarse a partir de la información de secuencia del dominio de IgSF de mamífero de tipo salvaje, luego modelarse in silico para unirse a su compañero de unión afín, y finalmente sintetizarse recombinantemente o químicamente para producir la composición de dominio de IgSF con afinidad modificada de interés. 10 15 20 25 30 35 40 45 50

En solo un ejemplo alternativo, se puede crear un dominio de IgSF con afinidad modificada mediante mutagénesis dirigida a sitio de un dominio de IgSF de tipo salvaje. Por tanto, el dominio de IgSF con afinidad modificada denota un producto y no necesariamente un producto producido por ningún proceso dado. Puede emplearse una variedad de técnicas que incluyen métodos recombinantes, síntesis química o combinaciones de los mismos.

Los términos "afinidad de unión" y "avidez de unión" tal y como se usan en la presente memoria significan la afinidad de unión específica y la avidez de unión específica, respectivamente, de una proteína por su compañero de unión afín en condiciones de unión específicas. En cinética bioquímica, la avidez se refiere a la fuerza acumulada de múltiples afinidades de interacciones de unión no covalentes individuales, tales como entre un dominio de IgSF y su compañero de unión afín. Como tal, la avidez es distinta de la afinidad, que describe la fuerza de una única interacción. Los métodos para determinar la afinidad o avidez de unión se conocen en la técnica. Véase, por ejemplo, Larsen et al., *American Journal of Transplantation*, Vol 5: 443-453 (2005).

El término "semivida biológica" se refiere a la cantidad de tiempo que tarda una sustancia, tal como un polipéptido inmunomodulador de la presente invención, en perder la mitad de su actividad o concentración farmacológica o fisiológica. La semivida biológica puede verse afectada por la eliminación, excreción, degradación (p. ej., enzimática) de la sustancia o la absorción y concentración en ciertos órganos o tejidos del cuerpo. En algunas realizaciones, la semivida biológica se puede evaluar determinando el tiempo que tarda la concentración de la sustancia en el plasma sanguíneo en alcanzar la mitad de su nivel de estado estacionario ("semivida en plasma"). Los conjugados que se pueden usar para derivatizar y aumentar la semivida biológica de los polipéptidos de la invención son conocidos en la técnica e incluyen, pero no están limitados a, polietilenglicol (PEG), hidroxietil almidón (HES), XTEN (péptidos recombinantes extendidos; véase, WO2013130683), albúmina de suero humano (HSA), albúmina de suero bovino (BSA), lípidos (acilación) y poli-Pro-Ala-Ser (PAS), ácido poliglutámico (glutamilación).

El término "compañero de unión afín", en referencia a una proteína, tal como un dominio de IgSF o un dominio de IgSF con afinidad modificada, se refiere a al menos una molécula (típicamente una proteína de mamífero nativa) a la que la proteína de referencia se une específicamente en condiciones de unión específicas. Una especie de ligando reconocida y que se une específicamente a su receptor afín en condiciones de unión específicas es un ejemplo de un compañero de unión afín de ese receptor. Un "compañero de unión de la superficie celular afín" es un compañero de unión afín expresado en la superficie de una célula de mamífero. En la presente invención, una "especie molecular de la superficie celular" es un compañero de unión afín de la sinapsis inmunológica (IS), expresada en y por células, tales como células de mamífero, que forman la sinapsis inmunológica.

El término "unión competitiva", tal y como se usa en la presente memoria, significa que una proteína es capaz de unirse específicamente a al menos dos compañeros de unión afines, pero que la unión específica de un compañero de unión afín inhibe, tal como previene o impide, la unión simultánea del segundo compañero de unión afín. Por tanto, en algunos casos, no es posible que una proteína se una a los dos compañeros de unión afines al mismo tiempo. Generalmente, los ligantes competitivos contienen el mismo sitio de unión o superpuesto para una unión específica,

pero esto no es un requisito. En algunas realizaciones, la unión competitiva provoca una inhibición mensurable (parcial o completa) de la unión específica de una proteína a uno de sus compañeros de unión afines debido a la unión específica de un segundo compañero de unión afín. Se conocen diversos métodos para cuantificar la unión competitiva, tales como los ensayos ELISA (ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas).

- 5 El término "sustitución conservativa de aminoácidos", tal y como se usa en la presente memoria, significa una sustitución de aminoácidos en la que un residuo de aminoácido está sustituido por otro residuo de aminoácido que tiene un grupo R de cadena lateral con propiedades químicas similares (p. ej., carga o hidrofobicidad). Los ejemplos de grupos de aminoácidos que tienen cadenas laterales con propiedades químicas similares incluyen 1) cadenas laterales alifáticas: glicina, alanina, valina, leucina e isoleucina; 2) cadenas laterales con hidroxilo alifáticas: serina y treonina; 3) cadenas laterales que contienen amida: asparagina y glutamina; 4) cadenas laterales aromáticas: fenilalanina, tirosina y triptófano; 5) cadenas laterales básicas: lisina, arginina e histidina; 6) cadenas laterales ácidas: ácido aspártico y ácido glutámico; y 7) cadenas laterales que contienen azufre: cisteína y metionina. Los grupos de sustitución de aminoácidos conservativas son: valina-leucina-isoleucina, fenilalanina-tirosina, lisina-arginina, alanina-valina, glutamato-aspartato y asparagina-glutamina.
- 10 15 El término "correspondiente a" con referencia a las posiciones de una proteína, tales como la recitación de que las posiciones de nucleótidos o aminoácidos "corresponden a" posiciones de nucleótidos o aminoácidos en una secuencia descrita, tal como se establece en el listado de secuencias, se refiere a posiciones de nucleótidos o aminoácidos identificadas tras el alineamiento con la secuencia descrita basándose en el alineamiento de la secuencia estructural o usando un algoritmo de alineamiento estándar, tal como el algoritmo GAP. Al alinear las secuencias, un experto en la técnica puede identificar los residuos correspondientes, por ejemplo, utilizando residuos de aminoácidos conservados e idénticos como guías.
- 20 25 El término "citoquina" incluye, p. ej., pero no está limitado a, interleucinas, interferones (IFN), quimioquinas, factores de crecimiento hematopoyético, factores de necrosis tumoral (TNF) y factores de crecimiento transformantes. En general, se trata de proteínas de pequeño peso molecular que regulan la maduración, activación, proliferación y diferenciación de las células del sistema inmune.

Los términos "disminuir" o "atenuar" o "suprimir" tal y como se usan en la presente memoria significan disminuir en una cantidad estadísticamente significativa. Una disminución puede ser al menos del 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o 100 %.

30 Los términos "derivados" o "derivatizado" se refieren a la modificación de una proteína inmunomoduladora uniéndola covalentemente, directa o indirectamente, para alterar características tales como semivida, biodisponibilidad, inmunogenicidad, solubilidad, toxicidad, potencia o eficacia mientras se retiene o potencia su beneficio terapéutico. Los derivados se pueden preparar mediante glicosilación, pegilación, lipidación o fusión con Fc.

35 40 45 50 55 Tal y como se usa en la presente memoria, dominio (típicamente una secuencia de tres o más, generalmente 5 o 7 o más aminoácidos, tal como 10 a 200 residuos de aminoácidos) se refiere a una porción de una molécula, tal como una proteína o un ácido nucleico codificante, que es estructural y/o funcionalmente diferente de otras porciones de la molécula y es identificable. Por ejemplo, los dominios incluyen aquellas porciones de una cadena polipeptídica que pueden formar una estructura plegada independientemente dentro de una proteína formada por uno o más restos estructurales y/o que se reconoce en virtud de una actividad funcional, tal como la actividad de unión. Una proteína puede tener uno, o más de uno, dominios distintos. Por ejemplo, un dominio puede identificarse, definirse o distinguirse por homología de la secuencia o estructura primaria con miembros de la familia relacionados, tal como homología con restos. En otro ejemplo, un dominio se puede distinguir por su función, tal como la capacidad de interaccionar con una biomolécula, tal como un compañero de unión afín. Un dominio puede exhibir independientemente una función o actividad biológica de manera que el dominio independientemente o fusionado a otra molécula pueda realizar una actividad, tal como, por ejemplo, la unión. Un dominio puede ser una secuencia lineal de aminoácidos o una secuencia no lineal de aminoácidos. Muchos polipéptidos contienen una pluralidad de dominios. Dichos dominios son conocidos y pueden ser identificados por los expertos en la técnica. Para exemplificación en la presente memoria, se proporcionan definiciones, pero se entiende que está bien dentro de la experiencia en la técnica reconocer dominios particulares por su nombre. Si es necesario, se puede emplear el software adecuado para identificar los dominios. Se entiende que la referencia a aminoácidos, incluyendo una secuencia específica mostrada como SEQ ID NO utilizada para describir la organización del dominio de un dominio de IgSF, tiene fines ilustrativos y no pretende limitar el alcance de las realizaciones proporcionadas. Se entiende que los polipéptidos y la descripción de los dominios de los mismos se derivan teóricamente basándose en análisis de homología y alineamientos con moléculas similares. Por lo tanto, el locus exacto puede variar y no es necesariamente el mismo para cada proteína. Por tanto, el dominio de IgSF específico, tal como el dominio IgV específico o el dominio IgC, puede tener una longitud más larga o corta de varios aminoácidos (uno, dos, tres o cuatro).

60 El término "ectodominio", tal y como se usa en la presente memoria, se refiere a la región de una proteína de membrana, tal como una proteína transmembrana, que se encuentra fuera de la membrana vesicular. Los ectodominios a menudo comprenden dominios de unión que se unen específicamente a ligandos o receptores de la superficie celular. El ectodominio de una proteína transmembrana celular se denomina alternativamente dominio extracelular.

Los términos "cantidad eficaz" o "cantidad terapéuticamente eficaz" se refieren a una cantidad y/o concentración de una composición terapéutica de la invención, que cuando se administra *ex vivo* (por contacto con una célula de un paciente) o *in vivo* (por administración en un paciente) ya sea sola (es decir, como monoterapia) o en combinación con agentes terapéuticos adicionales, produce una inhibición estadísticamente significativa de la progresión de la enfermedad tal como, por ejemplo, mejorando o eliminando los síntomas y/o la causa de la enfermedad. Una cantidad eficaz para tratar una enfermedad o trastorno del sistema inmune puede ser una cantidad que mitiga, disminuye o alivia al menos un síntoma o respuesta biológica o efecto asociado con la enfermedad o trastorno, o previene la progresión de la enfermedad o trastorno, o mejora el funcionamiento físico del paciente. En algunas realizaciones, el paciente es un paciente humano.

10 Los términos "potenciado" o "aumentado", tal y como se usan en la presente memoria en el contexto de aumentar la actividad inmunológica de un linfocito de mamífero, significan aumentar la producción de interferón gamma (IFN-gamma), tal como en una cantidad estadísticamente significativa. En algunas realizaciones, la actividad inmunológica se puede evaluar en un ensayo de reacción de linfocitos mixtos (MLR). Los métodos para realizar ensayos de MLR se conocen en la técnica. Wang et al., *Cancer Immunol Res.* 2014 sep; 2(9): 846-56. En algunas realizaciones, una 15 potenciación puede ser un aumento de al menos un 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 75 %, 100 %, 200 %, 300 %, 400 % o 500 % mayor que un valor de control cero.

20 El término "célula huésped" se refiere a una célula que puede usarse para expresar una proteína codificada por un vector de expresión recombinante. Una célula huésped puede ser un procariota, por ejemplo, *E. coli*, o puede ser un eucariota, por ejemplo, un eucariota unicelular (p. ej., una levadura u otro hongo), una célula vegetal (p. ej., una célula de la planta del tabaco o tomate), una célula animal (p. ej., una célula humana, una célula de mono, una célula de hámster, una célula de rata, una célula de ratón o una célula de insecto) o un hibridoma. Los ejemplos de células huésped incluyen células de ovario de hámster chino (CHO) o sus derivados tales como Veggie CHO y líneas celulares relacionadas que crecen en medio sin suero o la cepa de CHO DX-B11, que es deficiente en DHFR.

25 El término "sinapsis inmunológica" o "sinapsis inmune", tal y como se usa en la presente memoria, significa la interfaz entre una célula de mamífero que expresa MHC I (complejo mayor de histocompatibilidad) o MHC II, tal como una célula presentadora de antígeno o una célula tumoral, y un linfocito de mamífero, tal como una célula T efectora o una célula asesina natural (NK).

30 El término "inmunoglobulina" (abreviado "Ig"), tal y como se usa en la presente memoria, es sinónimo del término "anticuerpo" (abreviado "Ab") y se refiere a una proteína de inmunoglobulina de mamífero que incluye cualquiera de las cinco clases humanas: IgA (que incluye las subclases IgA1 y IgA2), IgD, IgE, IgG (que incluye las subclases IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4) e IgM. El término también incluye inmunoglobulinas que no tienen la longitud completa, ya sean total o parcialmente sintéticas (p. ej., recombinante o síntesis química) o producidas naturalmente, tal como fragmento de unión a antígeno (Fab), fragmento variable (Fv) que contiene V_H y V_L , el fragmento variable monocatenario (scFv) que contiene V_H y V_L unidos entre sí en una cadena, así como otros fragmentos de la región V del anticuerpo, tales como fragmentos de polipéptido Fab', F(ab)₂, F(ab')₂, diacuerpo dsFv, Fc y Fd. Los anticuerpos biespecíficos, homobiespecíficos y heterobiespecíficos, se incluyen dentro del significado del término.

35 Una región o dominio Fc (fragmento cristalizable) de una molécula de inmunoglobulina (también denominado polipéptido Fc) corresponde en gran medida a la región constante de la cadena pesada de inmunoglobulina y es responsable de varias funciones, incluyendo las funciones efectoras del anticuerpo. Una fusión de Fc de inmunoglobulina ("fusión Fc") es una molécula que comprende uno o más polipéptidos (o una o más moléculas pequeñas) unidos operativamente a una región Fc de una inmunoglobulina. Una fusión Fc puede comprender, por ejemplo, la región Fc de un anticuerpo (que facilita la farmacocinética) y el dominio de IgSF de un dominio de superfamilia de inmunoglobulina de tipo salvaje o con afinidad modificada ("IgSF"), u otra proteína o fragmento de la misma. En algunas realizaciones, el Fc facilita además las funciones efectoras. En algunas realizaciones, el Fc es un 40 Fc variante que presenta una actividad reducida (p. ej., reducida en más del 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o más) para facilitar una función efectora. El dominio de IgSF media el reconocimiento del compañero de unión afín (comparable a la de la región variable del anticuerpo de un anticuerpo para un antígeno). Una región Fc de inmunoglobulina puede unirse directa o indirectamente a uno o más polipéptidos o moléculas pequeñas (compañeros de fusión). Se conocen varios enlazadores en la técnica y se pueden usar para enlazar un Fc a un compañero de 45 fusión para generar una fusión Fc. Una proteína de fusión Fc de la invención comprende típicamente una región Fc de inmunoglobulina unida covalentemente, directa o indirectamente, a al menos un dominio de IgSF con afinidad modificada. Las fusiones Fc de especies idénticas se pueden dimerizar para formar homodímeros de fusión Fc, o usando especies no idénticas para formar heterodímeros de fusión Fc.

50 El término "superfamilia de inmunoglobulinas" o "IgSF", tal y como se usa en la presente memoria, significa el grupo de proteínas solubles y de la superficie celular que están involucradas en los procesos de reconocimiento, unión o adhesión de las células. Las moléculas se clasifican como miembros de esta superfamilia basándose en características estructurales compartidas con inmunoglobulinas (es decir, anticuerpos); todos poseen un dominio conocido como dominio o pliegue de inmunoglobulina. Los miembros de la IgSF incluyen receptores de antígenos de la superficie celular, correceptores y moléculas coestimuladoras del sistema inmune, moléculas implicadas en la presentación de antígenos a linfocitos, moléculas de adhesión celular, ciertos receptores de citoquinas y proteínas musculares intracelulares. Por lo general, se asocian con funciones en el sistema inmune. Las proteínas en la sinapsis 55

inmunológica son a menudo miembros de la IgSF. La IgSF también se puede clasificar en "subfamilias" según las propiedades compartidas, tal como la función. Dichas subfamilias consisten típicamente en 4 a 30 miembros de IgSF.

Los términos "dominio de IgSF" o "dominio de inmunoglobulina" o "dominio de Ig", tal y como se usan en la presente memoria, se refieren a un dominio estructural de proteínas IgSF. Los dominios de Ig reciben el nombre de las moléculas de inmunoglobulina. Contienen aproximadamente 70-110 aminoácidos y se clasifican según su tamaño y función. Los dominios de Ig poseen un pliegue de Ig característico, que tiene una estructura tipo sándwich formada por dos láminas de hebras beta antiparalelas. Las interacciones entre los aminoácidos hidrófobos en el lado interno del sándwich y los enlaces disulfuro altamente conservados formados entre los residuos de cisteína en las cadenas B y F, estabilizan el pliegue de Ig. Un extremo del dominio de Ig tiene una sección denominada región determinante de la complementariedad que es importante para la especificidad de los anticuerpos por sus ligandos. Los dominios similares a Ig se pueden clasificar (en clases) como: IgV, IgC1, IgC2 o IgI. La mayoría de los dominios de Ig son variables (IgV) o constantes (IgC). Los dominios de IgV con 9 cadenas beta son generalmente más largos que los dominios de IgC con 7 cadenas beta. Los dominios de Ig de algunos miembros de la IgSF se parecen a los dominios de IgV en la secuencia de aminoácidos, pero son similares en tamaño a los dominios de IgC. Estos se denominan dominios de IgC2, mientras que los dominios de IgC estándar se denominan dominios de IgC1. Las cadenas del receptor de células T (TCR) contienen dos dominios de Ig en la porción extracelular; un dominio IgV en el extremo N y un dominio IgC1 adyacente a la membrana celular.

El término "especie de IgSF", tal y como se usa en la presente memoria, significa un conjunto de proteínas miembro de IgSF con una secuencia de aminoácidos primaria idéntica o sustancialmente idéntica. Cada miembro de la superfamilia de inmunoglobulinas (IgSF) de mamíferos define una identidad única de todas las especies de IgSF que pertenecen a ese miembro de IgSF. Por tanto, cada miembro de la familia de IgSF es único respecto a otros miembros de la familia de IgSF y, en consecuencia, cada especie de un miembro de la familia de IgSF particular es única respecto a las especies de otro miembro de la familia de IgSF. No obstante, pueden producirse variaciones entre moléculas que son de la misma especie de IgSF debido a diferencias en la modificación postraduccional tales como glicosilación, fosforilación, ubiquitinación, nitrosilación, metilación, acetilación y lipidación. Además, las diferencias menores de secuencia dentro de una única especie de IgSF debido a polimorfismos génicos constituyen otra forma de variación dentro de una única especie de IgSF al igual que las formas truncadas de tipo salvaje de especies de IgSF debido, por ejemplo, a la escisión proteolítica. Una "especie de IgSF de la superficie celular" es una especie de IgSF expresada en la superficie de una célula, generalmente una célula de mamífero.

El término "actividad inmunológica", tal y como se usa en la presente memoria en el contexto de linfocitos de mamíferos, significa su expresión de citoquinas, tales como químoquinas o interleuquinas. Los ensayos para determinar el aumento o la supresión de la actividad inmunológica incluyen ensayos MLR para interferón-gamma (Wang et al., Cancer Immunol Res. 2014 sep; 2(9): 846-56), ensayo de estimulación de células T por SEB (enterotoxina estafilocócica B) (Wang et al., Cancer Immunol Res. 2014 sep; 2(9): 846-56) y ensayos de estimulación de células T anti-CD3 (Li y Kurlander, J Transl Med. 2010; 8: 104). La inducción de una respuesta inmune da como resultado un aumento de la actividad inmunológica en relación con los linfocitos quiescentes. Una proteína inmunomoduladora o un dominio de IgSF con afinidad modificada de la invención puede, en algunas realizaciones, aumentar o, en realizaciones alternativas, disminuir la expresión de IFN-gamma (interferón-gamma) en un ensayo de células T primarias en relación con un miembro de IgSF de tipo salvaje o control de dominio de IgSF. Los expertos reconocerán que el formato del ensayo de células T primarias usado para determinar un aumento en la expresión de IFN-gamma diferirá del empleado para ensayar una disminución en la expresión de IFN-gamma. En el ensayo de la capacidad de una proteína inmunomoduladora o dominio de IgSF con afinidad modificada de la invención para disminuir la expresión de IFN-gamma en un ensayo de células T primarias, se puede usar un ensayo de reacción de linfocitos mixtos (MLR) como se describe en el Ejemplo 6. Convenientemente, se puede emplear una forma soluble de un dominio de IgSF con afinidad modificada de la invención para determinar su capacidad para antagonizar y, por lo tanto, disminuir la expresión de IFN-gamma en un MLR como se describe igualmente en el Ejemplo 6. Alternativamente, en el ensayo de la capacidad de una proteína inmunomoduladora o dominio de IgSF con afinidad modificada de la invención para aumentar la expresión de IFN-gamma en un ensayo de células T primarias, se puede usar un ensayo de coinmovilización. En un ensayo de coinmovilización, una señal del receptor de células T, proporcionada en algunas realizaciones por un anticuerpo anti-CD3, se usa junto con un dominio de IgSF con afinidad modificada coinmovilizado para determinar la capacidad de aumentar la expresión de IFN-gamma en relación con un control de dominio de IgSF de tipo salvaje.

Una "proteína inmunomoduladora" es una proteína que modula la actividad inmunológica. Por "modulación" o "que modula" una respuesta inmune se entiende que la actividad inmunológica se potencia o se suprime. Una proteína inmunomoduladora puede ser una única cadena polipeptídica o un multímero (dímeros o multímeros de orden superior) de al menos dos cadenas polipeptídicas unidas covalentemente entre sí mediante, por ejemplo, enlaces disulfuro intercadena. Por tanto, las proteínas monoméricas, diméricas y multiméricas de orden superior están dentro del alcance del término definido. Las proteínas multiméricas pueden ser homomultiméricas (de cadenas polipeptídicas idénticas) o heteromultiméricas (de cadenas polipeptídicas diferentes).

El término "aumento", tal y como se usa en la presente memoria, significa aumentar en una cantidad estadísticamente significativa. Un aumento puede ser al menos del 5 %, 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 75 %, 100 % o mayor que un valor de control distinto de cero.

El término "linfocito", tal y como se usa en la presente memoria, significa cualquiera de los tres subtipos de glóbulos blancos en el sistema inmune de un mamífero. Incluyen células asesinas naturales (células NK) (que funcionan en la inmunidad innata citotóxica mediada por células), células T (para la inmunidad adaptativa citotóxica mediada por células) y células B (para la inmunidad adaptativa humorada dirigida por anticuerpos). Las células T incluyen: células T auxiliares, células T citotóxicas, células T asesinas naturales, células T de memoria, células T reguladoras o células T gamma delta. Las células linfoideas innatas (ILC) también se incluyen dentro de la definición de linfocito.

Los términos "mamífero", "sujeto" o "paciente" incluyen específicamente una referencia a al menos uno de: ser humano, chimpancé, mono rhesus, mono cynomolgus, perro, gato, ratón o rata.

Los términos "que modulan" o "modulan", tal y como se usan en la presente memoria en el contexto de una respuesta inmune, tal como una respuesta inmune de mamífero, se refieren a cualquier alteración, tal como un aumento o una disminución, de una respuesta inmune existente o potencial que ocurre como resultado de la administración de una proteína inmunomoduladora de la presente invención. Por tanto, se refiere a una alteración, tal como un aumento o una disminución, de una respuesta inmune en comparación con la respuesta inmune que se produce o está presente en ausencia de la administración de la proteína inmunomoduladora. Dicha modulación incluye cualquier inducción, o alteración en el grado o extensión, o supresión de la actividad inmunológica de una célula inmune. Las células inmunes incluyen células B, células T, células NK (asesinas naturales), células T NK, células presentadoras de antígenos (APC) profesionales y células presentadoras de antígenos no profesionales, y células inflamatorias (neutrófilos, macrófagos, monocitos, eosinófilos, y basófilos). La modulación incluye cualquier cambio impartido en una respuesta inmune existente, una respuesta inmune en desarrollo, una respuesta inmune potencial o la capacidad de inducir, regular, influir o responder a una respuesta inmune. La modulación incluye cualquier alteración en la expresión y/o función de genes, proteínas y/u otras moléculas en las células inmunes como parte de una respuesta inmune. La modulación de una respuesta inmune o la modulación de la actividad inmunológica incluye, por ejemplo, lo siguiente: eliminación, deleción o secuestro de células inmunes; inducción o generación de células inmunes que pueden modular la capacidad funcional de otras células tales como linfocitos autoreactivos, células presentadoras de antígenos o células inflamatorias; inducción de un estado no respondedor en las células inmunes (es decir, anergia); potenciar o suprimir la actividad o función de las células inmunes, incluyendo, pero no limitado a, alterar el patrón de proteínas expresadas por estas células. Los ejemplos incluyen la producción y/o secreción alterada de ciertas clases de moléculas tales como citoquinas, quimioquinas, factores de crecimiento, factores de transcripción, quinasas, moléculas coestimuladoras u otros receptores de la superficie celular o cualquier combinación de estos eventos moduladores. La modulación se puede evaluar, por ejemplo, mediante una alteración en la expresión de IFN-gamma (interferón gamma) en relación con o en comparación con el control de dominio(s) de IgSF de tipo salvaje o no modificado en un ensayo de células T primarias (véase, Zhao y Ji, *Exp Cell Res.* 2016 ene 1; 340(1) 132-138).

El término "especie molecular", tal y como se usa en la presente memoria, significa un conjunto de proteínas con una secuencia de aminoácidos primaria idéntica o sustancialmente idéntica. Cada miembro de la superfamilia de inmunoglobulinas (IgSF) de mamíferos define una colección de especies moleculares idénticas o sustancialmente idénticas. Así, por ejemplo, la CD80 humana es un miembro de IgSF y cada molécula de CD80 humana es una especie de CD80. La variación entre moléculas que son de la misma especie molecular puede ocurrir debido a diferencias en la modificación postraduccional tal como glicosilación, fosforilación, ubiquitinación, nitrosilación, metilación, acetilación y lipidación. Además, las diferencias de secuencia menores dentro de una única especie molecular debido a polimorfismos génicos constituyen otra forma de variación dentro de una única especie molecular al igual que las formas truncadas de tipo salvaje de una única especie molecular debido, por ejemplo, a la escisión proteolítica. Una "especie molecular de la superficie celular" es una especie molecular expresada en la superficie de una célula de mamífero. Se dice que dos o más especies diferentes de proteína, cada una de las cuales está presente exclusivamente en una o exclusivamente en la otra (pero no en ambas) de las dos células de mamífero que forman la IS, están en "cis" o "configuración cis" entre sí. Se dice que dos especies diferentes de proteína, la primera de las cuales está presente exclusivamente en una de las dos células de mamífero que forman la IS y la segunda de las cuales está presente exclusivamente en la segunda de las dos células de mamífero que forman la IS, están en "trans" o "configuración trans". Dos especies diferentes de proteína, cada una de las cuales está presente en las dos células de mamífero que forman la IS, están en configuraciones cis y trans en estas células.

El término "unión no competitiva", tal y como se usa en la presente memoria, significa la capacidad de una proteína para unirse específicamente de forma simultánea a al menos dos compañeros de unión afines. En algunas realizaciones, la unión se produce en condiciones de unión específicas. Por lo tanto, la proteína puede unirse al menos a dos compañeros de unión afines diferentes al mismo tiempo, aunque la interacción de la unión no necesita tener la misma duración, de modo que, en algunos casos, la proteína se une específicamente a solo uno de los compañeros de unión afines. En algunas realizaciones, la unión simultánea es tal que la unión de un compañero de unión afín no inhibe sustancialmente la unión simultánea a un segundo compañero de unión afín. En algunas realizaciones, unión no competitiva significa que la unión de un segundo compañero de unión afín a su sitio de unión en la proteína no desplaza la unión de un primer compañero de unión afín a su sitio de unión en la proteína. Los métodos para evaluar la unión no competitiva son bien conocidos en la técnica, tales como el método descrito en Perez de La Lastra et al., *Immunology*, abril de 1999: 96(4): 663-670. En algunos casos, en las interacciones no competitivas, el primer compañero de unión afín se une específicamente a un sitio de interacción que no se superpone con el sitio de interacción del segundo compañero de unión afín, de modo que la unión del segundo compañero de unión afín no interfiere directamente con la unión del primer compañero de unión afín. Por tanto, cualquier efecto sobre la unión del

5 compañero de unión afín por la unión del segundo compañero de unión afín es a través de un mecanismo distinto de la interferencia directa con la unión del primer compañero de unión afín. Por ejemplo, en el contexto de interacciones enzima-sustrato, un inhibidor no competitivo se une a un sitio diferente al sitio activo de la enzima. La unión no competitiva abarca interacciones de unión no competitivas en las que un segundo compañero de unión afín se une específicamente a un sitio de interacción que no se superpone con la unión del primer compañero de unión afín, sino que se une al segundo sitio de interacción solo cuando el primer sitio de interacción está ocupado por el primer compañero de unión afín.

10 Los términos "ácido nucleico" y "polinucleótido" se usan indistintamente para hacer referencia a un polímero de residuos de ácido nucleico (p. ej., desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos) en forma monocatenaria o bicatenaria. A menos que se limite específicamente, los términos abarcan ácidos nucleicos que contienen análogos conocidos de los nucleótidos naturales y que tienen propiedades de unión similares y se metabolizan de una manera similar a los nucleótidos de origen natural. A menos que se indique lo contrario, una secuencia de ácido nucleico particular también abarca implícitamente variantes modificadas de manera conservativa de la misma (p. ej., sustituciones de codones degenerados) y secuencias de nucleótidos complementarias, así como la secuencia indicada explícitamente.

15 15 Específicamente, las sustituciones de codones degenerados se pueden lograr generando secuencias en las que la tercera posición de uno o más codones seleccionados (o todos) está sustituida con residuos de base mixta y/o desoxiinosina. El término ácido nucleico o polinucleótido abarca ADNc o ARNm codificado por un gen.

20 20 El término "composición farmacéutica" se refiere a una composición adecuada para uso farmacéutico en un sujeto mamífero, a menudo un ser humano. Una composición farmacéutica comprende típicamente una cantidad eficaz de un agente activo (p. ej., una proteína inmunomoduladora de la invención) y un vehículo, excipiente o diluyente. El vehículo, excipiente o diluyente es típicamente un vehículo, excipiente o diluyente farmacéuticamente aceptable, respectivamente.

25 25 Los términos "polipéptido" y "proteína" se usan indistintamente en la presente memoria y se refieren a una cadena molecular de dos o más aminoácidos unidos mediante enlaces peptídicos. Los términos no se refieren a una longitud específica del producto. Por tanto, "péptidos" y "oligopéptidos" se incluyen dentro de la definición de polipéptido. Los términos incluyen modificaciones postraduccionales del polipéptido, por ejemplo, glicosilaciones, acetilaciones, fosforilaciones y similares. Los términos también incluyen moléculas en las que se incluyen uno o más análogos de aminoácidos o aminoácidos no canónicos o no naturales que pueden sintetizarse o expresarse de forma recombinante usando técnicas de ingeniería de proteínas conocidas. Además, las proteínas pueden derivatizarse como se describe en la presente memoria mediante técnicas de química orgánica bien conocidas.

30 30 El término "ensayo de células T primarias", tal y como se usa en la presente memoria, se refiere a un ensayo *in vitro* para medir la expresión de interferón-gamma ("IFN-gamma"). Se conoce en la técnica una variedad de dichos ensayos de células T primarias tales como el descrito en el Ejemplo 6. En una realización preferida, el ensayo usado es un ensayo de coinmovilización de anti-CD3. En este ensayo, las células T primarias son estimuladas por anti-CD3 inmovilizado con o sin proteínas recombinantes adicionales. Los sobrenadantes del cultivo se recogen en puntos de tiempo, generalmente 24-72 horas. En otra realización, el ensayo utilizado es una reacción de linfocitos mixtos (MLR). En este ensayo, las células T primarias se simulan con APC alogénica. Los sobrenadantes del cultivo se recogen en puntos de tiempo, generalmente 24-72 horas. Los niveles de IFN-gamma humano se miden en sobrenadantes de cultivo mediante técnicas estándar de ELISA. Los proveedores ofrecen kits comerciales y el ensayo se realiza según las recomendaciones del fabricante.

35 40 El término "purificado" aplicado a ácidos nucleicos o proteínas inmunomoduladoras de la invención denota generalmente un ácido nucleico o polipéptido que está sustancialmente libre de otros componentes según se determina mediante técnicas analíticas bien conocidas en la técnica (p. ej., un polipéptido o polinucleótido purificado forma una banda discreta en un gel electroforético, eluado cromatográfico y/o un medio sometido a centrifugación en gradiente de densidad). Por ejemplo, un ácido nucleico o polipéptido que da lugar esencialmente a una banda en un gel electroforético está "purificado". Un ácido nucleico o proteína inmunomoduladora de la invención purificado es al menos aproximadamente un 50 % puro, normalmente al menos aproximadamente un 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 99 % o más puro (p. ej., porcentaje en peso o sobre una base molar).

45 50 El término "recombinante" indica que el material (p. ej., un ácido nucleico o un polipéptido) ha sido alterado artificialmente (es decir, de forma no natural) por la intervención humana. La alteración se puede realizar en el material dentro o fuera de su entorno o estado natural. Por ejemplo, un "ácido nucleico recombinante" es uno que se prepara recombinando ácidos nucleicos, p. ej., durante la clonación, modificación de afinidad, mezcla de ADN u otros procedimientos biológicos moleculares bien conocidos. Una "molécula de ADN recombinante" se compone de segmentos de ADN unidos entre sí mediante dichas técnicas de biología molecular. El término "proteína recombinante" o "polipéptido recombinante", tal y como se usa en la presente memoria, se refiere a una molécula de proteína (p. ej., una proteína inmunomoduladora) que se expresa usando una molécula de ADN recombinante. Una "célula huésped recombinante" es una célula que contiene y/o expresa un ácido nucleico recombinante. Las señales de control de la transcripción en eucariotas comprenden elementos "promotores" y "potenciadores". Los promotores y potenciadores consisten en series cortas de secuencias de ADN que interaccionan específicamente con proteínas celulares involucradas en la transcripción. Se han aislado elementos promotores y potenciadores de una variedad de fuentes eucariotas que incluyen genes en células de levadura, insectos y mamíferos y virus (elementos de control análogos,

es decir, promotores, también se encuentran en procariotas). La selección de un promotor y potenciador particular depende del tipo de célula que se utilizará para expresar la proteína de interés. Los términos "en combinación operativa", "en orden operativo" y "unido operativamente", tal y como se usan en la presente memoria, se refieren a la unión de secuencias de ácido nucleico de tal manera u orientación que se produce una molécula de ácido nucleico capaz de dirigir

5 la transcripción de un gen dado y/o la síntesis de una molécula de proteína deseada. El término también se refiere a la unión de secuencias de aminoácidos de tal manera que se produce y/o transporta una proteína funcional.

El término "vector de expresión recombinante", tal y como se usa en la presente memoria, se refiere a una molécula de ADN que contiene una secuencia codificante deseada (p. ej., un ácido nucleico inmunomodulador) y secuencias de ácido nucleico apropiadas necesarias para la expresión de la secuencia codificante unida operativamente en una célula huésped particular. Las secuencias de ácido nucleico necesarias para la expresión en procariotas incluyen un promotor, opcionalmente una secuencia operadora, un sitio de unión al ribosoma y posiblemente otras secuencias. Se sabe que las células eucariotas utilizan promotores, potenciadores y señales de terminación y poliadenilación. Una secuencia de péptido señal secretora también puede estar codificada, opcionalmente, por el vector de expresión recombinante, unida operativamente a la secuencia codificante de la proteína de fusión recombinante de la invención, de modo que la proteína de fusión expresada pueda ser secretada por la célula huésped recombinante, para un aislamiento más fácil de la proteína de fusión de la célula, si se desea.

10 El término "identidad de secuencia", tal y como se usa en la presente memoria, se refiere a la identidad de secuencia entre genes o proteínas a nivel de nucleótidos o aminoácidos, respectivamente. La "identidad de secuencia" es una medida de la identidad entre proteínas a nivel de aminoácidos y una medida de la identidad entre ácidos nucleicos a 20 nivel de nucleótidos. La identidad de la secuencia de la proteína se puede determinar comparando la secuencia de aminoácidos en una posición dada en cada secuencia cuando las secuencias están alineadas. De manera similar, la identidad de la secuencia de ácido nucleico se puede determinar comparando la secuencia de nucleótidos en una posición dada en cada secuencia cuando las secuencias están alineadas. Los métodos para el alineamiento de secuencias para comparación son bien conocidos en la técnica, dichos métodos incluyen GAP, BESTFIT, BLAST, 25 FASTA y TFASTA. El algoritmo BLAST calcula el porcentaje de identidad de secuencia y realiza un análisis estadístico de la similitud entre las dos secuencias. El software para realizar el análisis BLAST está disponible públicamente a través del sitio web del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI).

30 El término "soluble", tal y como se usa en la presente memoria con referencia a proteínas, significa que la proteína no es una proteína de membrana. En general, una proteína soluble contiene solo el dominio extracelular de un receptor miembro de la familia de IgSF, o una porción del mismo que contiene un dominio o dominios de IgSF o fragmentos de unión específicos del mismo.

35 El término "especie", tal y como se usa en la presente memoria en el contexto de una secuencia de ácido nucleico o una secuencia de polipéptido, se refiere a una colección idéntica de dichas secuencias. Se considera que las secuencias ligeramente truncadas que difieren (o codifican una diferencia) de la especie de longitud completa en el extremo amino o extremo carboxi en no más de 1, 2 o 3 residuos de aminoácidos son de una única especie. Dichas microheterogeneidades son una característica común de las proteínas fabricadas.

40 El término "se une específicamente", tal y como se usa en la presente memoria, significa la capacidad de una proteína, en condiciones de unión específicas, para unirse a una proteína diana de manera que su afinidad o avidez sea al menos 10 veces mayor, pero opcionalmente 50, 100, 250 o 500 veces mayor, o incluso al menos 1.000 veces mayor, que la afinidad o avidez promedio de la misma proteína por una colección de péptidos o polipéptidos aleatorios de tamaño estadístico suficiente. Una proteína que se une específicamente no necesita unirse exclusivamente a una única molécula diana (p. ej., su compañero de unión afín), sino que puede unirse específicamente a una molécula no diana debido a la similitud en la conformación estructural entre la diana y la no diana (p. ej., parálogos u ortólogos). Los expertos reconocerán que es posible la unión específica a una molécula que tiene la misma función en una especie 45 de animal diferente (es decir, ortólogo) o a una molécula no diana que tiene un epítopo sustancialmente similar al de la molécula diana (p. ej., parálogo) y no resta valor a la especificidad de la unión que se determina en relación con una colección estadísticamente válida de no dianas únicas (p. ej., polipéptidos aleatorios). Por tanto, un polipéptido con afinidad modificada de la invención puede unirse específicamente a más de una especie distinta de molécula diana debido a la reactividad cruzada. Generalmente, dicha unión específica fuera de la diana se mitiga reduciendo la afinidad o la avidez por dianas no deseadas. Pueden usarse inmunoensayos ELISA en fase sólida o mediciones de Biacore para determinar la unión específica entre dos proteínas. Generalmente, las interacciones entre dos proteínas de unión tienen constantes de disociación (K_d) menores de 1×10^{-5} M, y a menudo tan bajas como 1×10^{-12} M. En ciertos aspectos de la presente descripción, las interacciones entre dos proteínas de unión tienen constantes de disociación de 1×10^{-6} M, 1×10^{-7} M, 1×10^{-8} M, 1×10^{-9} M, 1×10^{-10} M o 1×10^{-11} M.

55 El término "fragmento de unión específico" o "fragmento", tal y como se usa en la presente memoria en referencia a un dominio de IgSF de tipo salvaje maduro (es decir, sin el péptido señal), significa un polipéptido que es más corto que el dominio de IgSF maduro de longitud completa y que se une específicamente *in vitro* y/o *in vivo* al compañero de unión afín nativa del dominio de IgSF de tipo salvaje maduro. En algunas realizaciones, el fragmento de unión específico tiene una longitud de secuencia que es al menos el 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de la secuencia de tipo salvaje madura de longitud completa. Se puede alterar la secuencia del fragmento de unión específico para formar un dominio de IgSF con afinidad modificada de la

invención. En algunas realizaciones, el fragmento de unión específico modula la actividad inmunológica de un linfocito.

Los términos "suprimido" o "disminuido", tal y como se usan en la presente memoria, significan disminuir en una cantidad estadísticamente significativa. En algunas realizaciones, la supresión puede ser una disminución de al menos un 10 % y hasta un 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 % o 90 %.

- 5 El término "resto de direccionamiento", tal y como se usa en la presente memoria, se refiere a una composición que está unida covalentemente o no covalentemente a, o encapsula físicamente, un polipéptido que comprende un dominio de IgSF de tipo salvaje y/o con afinidad modificada de la presente invención. El resto de direccionamiento tiene una afinidad de unión específica para un compañero de unión afín deseado, tal como un receptor de la superficie celular o un antígeno tumoral, tal como un antígeno tumoral específico (TSA) o un antígeno asociado a tumor (TAA).
- 10 10 Típicamente, el compañero de unión afín deseado se localiza en un tejido o tipo celular específico. Los restos de direccionamiento incluyen: anticuerpos, fragmento de unión a antígeno (Fab), fragmento variable (Fv) que contiene V_H y V_L , el fragmento variable monocatenario (scFv) que contiene V_H y V_L unidos entre sí en una cadena, así como otros fragmentos de la región V de anticuerpo, tales como Fab', F(ab)₂, F(ab')₂, diacuerpo dsFv, nanocuerpos, receptores solubles, ligandos de receptor, ligandos o receptores madurados por afinidad, así como composiciones de moléculas 15 pequeñas (<500 dalton) (p. ej., composiciones de receptores de unión específicos). Los restos de direccionamiento también pueden unirse covalentemente o no covalentemente a la membrana lípida de los liposomas que encapsulan un polipéptido inmunomodulador de la presente invención.
- 20 Los términos "tratar", "tratamiento" o "terapia" de una enfermedad o trastorno, tal y como se usan en la presente memoria, significan ralentizar, detener o revertir la progresión de la enfermedad o los trastornos, como se pone de manifiesto por la disminución, el cese o la eliminación de los síntomas clínicos o de diagnóstico, por la administración de una proteína inmunomoduladora de la presente invención sola o en combinación con otro compuesto como se describe en la presente memoria. "Tratar", "tratamiento" o "terapia" también significa una disminución de la gravedad de los síntomas en una enfermedad o trastorno agudo o crónico o una disminución en la tasa de recidiva tal como, por ejemplo, en el caso de un curso de enfermedad autoinmune recurrente o remitente, o una disminución de la inflamación 25 en el caso de un aspecto inflamatorio de una enfermedad autoinmune. Tal y como se usan en la presente memoria en el contexto del cáncer, los términos "tratamiento" o "inhibir", "que inhibe" o "inhibición" del cáncer se refieren al menos a uno de: una disminución estadísticamente significativa en la tasa de crecimiento tumoral, un cese del crecimiento tumoral, o una reducción en el tamaño, masa, actividad metabólica o volumen del tumor, según se mide por criterios estándar tales como, pero no limitado a, los Criterios de Evaluación de la Respuesta para Tumores Sólidos (RECIST), 30 o un aumento estadísticamente significativo en la supervivencia libre de progresión (PFS) o supervivencia global (OS). "Prevenir", "profilaxis" o "prevención" de una enfermedad o trastorno, tal y como se usa en el contexto de esta invención, se refiere a la administración de una proteína inmunomoduladora de la presente invención, ya sea sola o en combinación con otro compuesto, para prevenir la aparición o inicio de una enfermedad o trastorno o de algunos o todos los síntomas de una enfermedad o trastorno o disminuir la probabilidad del inicio de una enfermedad o trastorno.
- 35 El término "antígeno específico de tumor" o "TSA", tal y como se usa en la presente memoria, se refiere a un antígeno que está presente principalmente en células tumorales de un sujeto mamífero, pero que no se encuentra generalmente en células normales del sujeto mamífero. No es necesario que un antígeno específico de tumor sea exclusivo de las células tumorales, pero el porcentaje de células de un mamífero en particular que tiene el antígeno específico de tumor es lo suficientemente alto o los niveles del antígeno específico de tumor en la superficie del tumor son lo 40 suficientemente altos como para que pueda ser diana de terapias antitumorales, tales como polipéptidos inmunomoduladores de la invención, y proporcionar prevención o tratamiento del mamífero de los efectos del tumor. En algunas realizaciones, en una muestra estadística aleatoria de células de un mamífero con un tumor, al menos el 50 % de las células que presentan un TSA son cancerosas. En otras realizaciones, al menos el 60 %, 70 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o 99 % de las células que presentan un TSA son cancerosas.
- 45 45 Tal y como se usa en la presente memoria, "cribado" se refiere a la identificación o selección de una molécula o parte de la misma de una colección o biblioteca de moléculas y/o partes de la misma, basándose en la determinación de la actividad o propiedad de una molécula o parte de la misma. El cribado se puede realizar de una variedad de formas, incluyendo, por ejemplo, mediante ensayos que evalúan la unión directa (p. ej., afinidad de unión) de la molécula a una proteína diana o mediante ensayos funcionales que evalúan la modulación de una actividad de una proteína diana.
- 50 50 El término "de tipo salvaje" o "natural" o "nativo" o "parental", tal y como se usa en la presente memoria, se usa en conexión con materiales biológicos tales como moléculas de ácido nucleico, proteínas, miembros de IgSF, células huésped y similares, se refiere a aquellos que se encuentran en la naturaleza y no están modificados por la intervención humana. Un dominio de IgSF de tipo salvaje es un tipo de dominio de IgSF sin modificación de la afinidad. En algunas realizaciones de proteínas inmunomoduladoras de la invención, una IgSF sin modificación de la afinidad es un dominio de IgSF de tipo salvaje.

II. Proteínas inmunomoduladoras con afinidad modificada

La presente invención proporciona proteínas inmunomoduladoras como se define en las reivindicaciones adjuntas que tienen utilidad terapéutica al modular la actividad inmunológica en un mamífero con una enfermedad o trastorno en el que la modulación de la respuesta del sistema inmune es beneficiosa.

5 Los miembros de la familia de IgSF incluidos dentro del alcance de las proteínas inmunomoduladoras de la presente invención excluyen los anticuerpos (es decir, inmunoglobulinas) tales como los que son mamíferos o pueden ser de origen mamífero. Por tanto, la presente invención se refiere a dominios de IgSF que no son inmunoglobulinas (es decir, no anticuerpos). Los miembros de la familia de IgSF de mamíferos de tipo salvaje que no son inmunoglobulinas (es decir, anticuerpos) son conocidos en la técnica al igual que sus secuencias nucleicas y de aminoácidos. Todos los miembros de la familia de IgSF de mamíferos que no son inmunoglobulinas están incluidos dentro del alcance de la invención.

10 En algunas realizaciones, los miembros de la familia de IgSF que no son inmunoglobulinas, y los correspondientes dominios de IgSF presentes en ellos, son de origen de ratón, rata, mono cynomolgus o humano. En algunas realizaciones, los miembros de la familia de IgSF son miembros de al menos o exactamente una, dos, tres, cuatro, cinco o más subfamilias de IgSF tales como: familia de proteínas reguladoras de señales (SIRP), familia semejante al receptor de activación expresado en células mieloides (TREM1), familia de moléculas de adhesión celular relacionadas con antígenos carcinoembrionarios (CEACAM), familia de lectinas similares a Ig de unión a ácido siálico (SIGLEC), familia de butirofilinas, familia B7, familia CD28, familia que contiene dominios de conjunto V y de inmunoglobulina (VSIG), familia de dominios de conjunto V transmembrana (VSTM), familia de complejos mayores de histocompatibilidad (MHC), familia de moléculas de activación linfocítica de señalización (SLAM), receptor semejante a inmunoglobulina leucocitaria (LIR), familia de nectina (Nec), familia semejante a nectina (NECL), familia relacionada con el receptor de poliovirus (PVR), familia de receptores desencadenantes de citotoxicidad natural (NCR), o familia de receptores semejantes a inmunoglobulina de células asesinas (KIR).

15 20 En algunas realizaciones, los miembros de la familia de IgSF que no son inmunoglobulinas, y los correspondientes dominios de IgSF presentes en ellos, de una proteína inmunomoduladora de la invención, tienen afinidad modificada en comparación con un miembro de IgSF de mamífero. En algunas realizaciones, el miembro de IgSF de mamífero es uno de los miembros de IgSF o comprende un dominio de IgSF de uno de los miembros de IgSF como se indica en la Tabla 1 que incluye cualquier ortólogo de mamífero del mismo. Los ortólogos son genes de diferentes especies que evolucionaron a partir de un gen ancestral común por especiación. Normalmente, los ortólogos retienen la misma función en el curso de la evolución.

25 30 35 La primera columna de la Tabla 1 proporciona el nombre y, opcionalmente, el nombre de algunos sinónimos posibles para ese miembro de IgSF en particular. La segunda columna proporciona el identificador de proteínas de la base de datos UniProtKB, una base de datos disponible públicamente accesible a través de internet en uniprot.org. Universal Protein Resource (UniProt) es un recurso completo para la secuencia de proteínas y los datos de anotación. Las bases de datos de UniProt incluyen la base de conocimientos de UniProt (UniProtKB). UniProt es una colaboración entre el Instituto Europeo de Bioinformática (EMBL-EBI), el Instituto Suizo de Bioinformática SIB y el Recurso de Información de Proteínas (PIR) y está financiada principalmente por una subvención de los Institutos Nacionales de Salud de EE. UU. (NIH). La tercera columna proporciona la región donde se encuentra el dominio de IgSF indicado. La región se especifica como un rango donde el dominio incluye los residuos que definen el rango. La columna 3 también indica la clase de dominio de IgSF para la región de IgSF especificada. La columna 4 proporciona la región donde se encuentran los dominios adicionales indicados (péptido señal, S; dominio extracelular, E; dominio transmembrana, T; dominio citoplásmico, C). La columna 5 indica para algunos de los miembros de IgSF enumerados, algunos de sus compañeros de unión a la superficie celular afines.

40 Típicamente, el dominio de IgSF con afinidad modificada de las realizaciones proporcionadas es un dominio de IgSF con afinidad modificada humano o murino.

TABLA 1. Miembros de IgSF según la presente descripción.

Miembro de IgSF (sinónimos)	Identificador de proteínas UniProtKB	Región de IgSF y clase de dominio	Otros dominios	Compañeros de unión a la superficie celular afines	Secuencia de aminoácidos del miembro de IgSF (SEQ ID NO)	
					Precursor (residuos maduros)	ECD
CD80 (B7-1)	NP_005182.1 P33681	35-138 o 37-138 IgV, 145-230 o 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: 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: 29
CD274 (PD-L1, B7-H1)	Q9NZQ7.1	24-130 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: 30
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: 31

TABLA 1. Miembros de IgSF según la presente descripción.

Miembro de IgSF (sinónimos)	Identificador de proteínas UniProtKB	Región de IgSF y clase de dominio	Otros dominios	Compañeros de unión a la superficie celular afines	Secuencia de aminoácidos del miembro de IgSF (SEQ ID NO)	
					Precursor (residuos maduros)	ECD
ICOSLG (B7RP1, CD275, ICOSL, B7-H2)	Q75144.2	19-129 IgV, 141-227S: 1-18, E: 19-256, IgC2 T: 257-277, C: 278-302		ICOS, CD28, CTLA4	SEQ ID NO: 5 (19-302)	SEQ ID NO: 32
CD276 (B7-H3)	Q5ZPR3.1	29-139 IgV, 145-238S: 1-28, E: 29-466, IgC2, 243-357 IgV, T: 467-487, C: 367-453 IgC 488-534			SEQ ID NO: 6 (29-534)	SEQ ID NO: 33
VTCN1 (B7-H4)	Q7Z7D3.1	35-146 IgV, 153-241S: 1-24, E: 25-259, IgV T: 260-280, C: 281-282			SEQ ID NO: 7 (25-282)	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: 35
CTLA4	P16410.3	39-140 IgV S: 1-35, E: 36-161, T: 162-182, C: 183-223		B7-1, B7-2, B7RP1	SEQ ID NO: 9 (36-223)	SEQ ID NO: 36
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: 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: 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: 39
CD4	P01730.1	26-125 IgV, 126-203S: 1-25, E: 26-396, IgC2, 204-317 IgC2, T: 397-418, C: 317-389 IgC2 419-458		MHC clase II	SEQ ID NO: 13 (26-458)	SEQ ID NO: 40
CD8A (CD8-alfa)	P01732.1	22-135 IgV S: 1-21, E: 22-182, T: 183-203, C: 204-235		MHC clase I	SEQ ID NO: 14 (22-235)	SEQ ID NO: 41
CD8B (CD8-beta)	P10966.1	22-132 IgV S: 1-21, E: 22-170, T: 171-191, C: 192-210		MHC clase I	SEQ ID NO: 15 (22-210)	SEQ ID NO: 42
LAG3	P18627.5	37-167 IgV, 168-252S: 1-28, E: 29-450, IgC2, 265-343 IgC2, T: 451-471, C: 349-419 IgC2 472-525 		MHC clase II	SEQ ID NO: 16 (29-525)	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, fosfatidil erina, Galectina-9, HMGB1	SEQ ID NO: 17 (22-301)	SEQ ID NO: 44
CEACAM1	P13688.2	35-142 IgV, 145-232S: 1-34, E: 35-428, IgC2, 237-317 IgC2, T: 429-452, C: 323-413 IgC 453-526		TIM-3	SEQ ID NO: 18 (35-526)	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: 46
PVR (CD155)	P15151.2	24-139 IgV, 145-237S: 1-20, E: 21-343, IgC2, 244-328 IgC2 T: 344-367, C: 368-417		TIGIT, CD226, CD96, poliovirus	SEQ ID NO: 20 (21-417)	SEQ ID NO: 47
PVRL2 (CD112)	Q92692.1	32-156 IgV, 162-256S: 1-31, E: 32-360, IgC2, 261-345 IgC2 T: 361-381, C: 382-538		TIGIT, CD226, CD112R	SEQ ID NO: 21 (32-538)	SEQ ID NO: 48
CD226	Q15762.2	19-126 IgC2, 135-239 IgC2 S: 1-18, E: 19-254, T: 255-275, C: 276-336		CD155, CD112	SEQ ID NO: 22 (19-336)	SEQ ID NO: 49

TABLA 1. Miembros de IgSF según la presente descripción.

Miembro de IgSF (sinónimos)	Identificador de proteínas UniProtKB	Región de IgSF y clase de dominio	Otros dominios	Compañeros de unión a la superficie celular afines	Secuencia de aminoácidos del miembro de IgSF (SEQ ID NO)	
					Precursor (residuos maduros)	ECD
CD2	P06729.2	25-128 IgV, 129-209S: 1-24, E: 25-209, IgC2 T: 210-235, C: 236-351		CD58	SEQ ID NO: 23 (25-351)	SEQ ID NO: 50
CD160	095971.1	27-122 IgV	N/A	HVEM, familia de proteínas MHC	SEQ ID NO: 24 (27-159)	SEQ ID NO: 51
CD200	P41217.4	31-141 IgV, 142-232S: 1-30, E: 31-232, IgC2 T: 233-259, C: 260-278		CD200R	SEQ ID NO: 25 (31-278)	SEQ ID NO: 52
CD200R1 (CD200R)	Q8TD46.2	53-139 IgV, 140-228S: 1-28, E: 29-243, IgC2 T: 244-264, C: 265-325		CD200	SEQ ID NO: 26 (29-325)	SEQ ID NO: 53
NCR3 (NKp30)	014931.1	19-126 similar a IgC S: 1-18, E: 19-135,  T: 136-156, C: 157-201		B7-H6	SEQ ID NO: 27 (19-201)	SEQ ID NO: 54

En algunas realizaciones, las proteínas inmunomoduladoras de la presente invención comprenden al menos un dominio de IgSF de mamífero con afinidad modificada. El dominio de IgSF con afinidad modificada puede modificarse en su afinidad para que se une específicamente a múltiples (2, 3, 4 o más) compañeros de unión afines (también denominados "ligando de contraestructura"). Un dominio de IgSF puede modificarse en su afinidad para aumentar o disminuir independientemente la afinidad o avidez de unión específica a cada uno de los múltiples compañeros de unión afines a los que se une. Mediante este mecanismo, la unión específica a cada uno de los múltiples compañeros de unión afines se ajusta independientemente a una afinidad o avidez particular.

5 En algunas realizaciones, el compañero de unión afín de un dominio de IgSF es al menos dos o tres de los compañeros de unión afines del dominio de IgSF de tipo salvaje, tales como los enumerados en la Tabla 1. La secuencia del dominio de IgSF, tal como un dominio de IgSF de mamífero se modifica en su afinidad alterando su secuencia con al menos una sustitución, y puede alterarse con al menos una adición o delección. La alteración de la secuencia puede ocurrir en el sitio de unión para el compañero de unión afín o en un sitio alostérico. En algunas realizaciones, un ácido nucleico que codifica un dominio de IgSF, tal como un dominio de IgSF de mamífero, se modifica en su afinidad mediante sustitución, adición, delección o combinaciones de los mismos, de sitios de nucleótidos específicos y predeterminados para producir un ácido nucleico de la invención. En algunas realizaciones contrastantes, un ácido nucleico que codifica un dominio de IgSF, tal como un dominio de IgSF de mamífero, se modifica en su afinidad mediante sustitución, adición, delección o combinaciones de los mismos, en sitios aleatorios dentro del ácido nucleico. 10 En algunas realizaciones, se utiliza una combinación de los dos enfoques (predeterminado y aleatorio). En algunas realizaciones, el diseño de los dominios de IgSF con afinidad modificada de la presente invención se realiza *in silico*.

15 Según la invención reivindicada, el dominio de IgSF con afinidad modificada contiene una o más sustituciones de aminoácidos (alternativamente, "mutaciones" o "reemplazos") con respecto a un polipéptido de tipo salvaje o no modificado o una porción del mismo que contiene un dominio de la superfamilia de inmunoglobulinas (IgSF), tal como un dominio IgV o un dominio IgC o un fragmento de unión específico del dominio IgV o el dominio IgC. En algunas realizaciones, la proteína inmunomoduladora comprende un dominio de IgSF con afinidad modificada que contiene un dominio IgV o un dominio IgC o fragmentos de unión específicos del mismo en el que al menos una de las sustituciones de aminoácidos está en el dominio IgV o dominio IgC o en un fragmento de unión específico del mismo. En algunas realizaciones, en virtud de la actividad de unión o afinidad alterada, el dominio IgV o el dominio IgC es un dominio de IgSF con afinidad modificada.

20 En algunas realizaciones, el dominio de IgSF, tal como un dominio de IgSF de mamífero, se modifica en su afinidad en la secuencia con al menos una pero no más de un total de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 sustituciones, adiciones, delecciones de aminoácidos o combinaciones de las mismas. En algunas realizaciones, el dominio de IgSF, tal como un dominio de IgSF de mamífero, se modifica en su afinidad en la secuencia con al menos una pero no más de 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3 o 2 sustituciones de aminoácidos. En algunas realizaciones, las sustituciones son sustituciones conservativas. En algunas realizaciones, las sustituciones no son conservativas. En algunas realizaciones, las sustituciones son una combinación de sustituciones conservativas y no conservativas. En algunas realizaciones, la modificación en la secuencia se realiza en el sitio de unión del dominio de IgSF para su compañero de unión afín.

25 En algunas realizaciones, el dominio de IgSF de tipo salvaje o no modificado es un dominio de IgSF de mamífero. En algunas realizaciones, el dominio de IgSF de tipo salvaje o no modificado puede ser un dominio de IgSF que incluye, pero no se limita a, humano, ratón, mono cynomolgus o rata. En algunas realizaciones, el dominio de IgSF de tipo

salvaje o no modificado es humano.

En algunas realizaciones, el dominio de IgSF de tipo salvaje o no modificado es un dominio de IgSF o un fragmento de unión específico del mismo contenido en la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 1 o una forma madura de la misma que carece de la secuencia señal, una secuencia de aminoácidos que exhibe al menos un 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 1 o una forma madura de la misma, o es una porción de la misma que contiene un dominio IgV o un dominio IgC o fragmentos de unión específicos del mismo.

En algunas realizaciones, el dominio de IgSF de tipo salvaje o no modificado es o comprende un dominio extracelular de un miembro de la familia de IgSF o una porción del mismo que contiene un dominio de IgSF (p. ej., dominio IgV o dominio IgC). En la presente memoria también se describen dominios de IgSF no modificados o de tipo salvaje que comprenden la secuencia de aminoácidos mostrada en cualquiera de las SEQ ID NO: 28-54, o un ortólogo de la misma. Por ejemplo, los dominios de IgSF no modificados o de tipo salvaje que comprenden (i) la secuencia de aminoácidos mostrada en cualquiera de las SEQ ID NO: 28-54, (ii) una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente un 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %

10 de identidad de secuencia con cualquiera de las SEQ ID NO: 28-54, o (iii) es un fragmento de unión específico de la secuencia de aminoácidos mostrada en cualquiera de las SEQ ID NO: 28-54 o un fragmento de unión específico de una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente un 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % de identidad de secuencia con cualquiera de las SEQ ID NO: 28-54 que comprende un dominio IgV o un dominio IgC.

15 20 En algunas realizaciones, el dominio extracelular de un dominio de IgSF no modificado o de tipo salvaje puede comprender más de un dominio de IgSF, por ejemplo, un dominio IgV y un dominio IgC. Sin embargo, el dominio de IgSF con afinidad modificada no necesita comprender tanto el dominio IgV como el dominio IgC. En algunas realizaciones, el dominio de IgSF con afinidad modificada comprende o consiste esencialmente en el dominio IgV o un fragmento de unión específico del mismo. En algunas realizaciones, el dominio de IgSF con afinidad modificada comprende o consiste esencialmente en el dominio IgC o un fragmento de unión específico del mismo. En algunas realizaciones, el dominio de IgSF con afinidad modificada comprende el dominio IgV o un fragmento de unión específico del mismo, y el dominio IgC o un fragmento de unión específico del mismo.

25 30 En algunas realizaciones, la una o más sustituciones de aminoácidos del dominio de IgSF con afinidad modificada puede estar localizado en uno cualquiera o más de los dominios polipeptídicos de IgSF. Por ejemplo, en algunas realizaciones, una o más sustituciones de aminoácidos están localizadas en el dominio extracelular del polipéptido de IgSF. En algunas realizaciones, una o más sustituciones de aminoácidos están localizadas en el dominio IgV o fragmento de unión específico del dominio IgV. En algunas realizaciones, una o más sustituciones de aminoácidos están localizadas en el dominio IgC o fragmento de unión específico del dominio IgC.

35 40 En algunas realizaciones, al menos un dominio de IgSF, tal como un dominio de IgSF de mamífero, de una proteína inmunomoduladora proporcionada en la presente memoria se modifica independientemente en su afinidad en la secuencia para tener al menos un 99 %, 98 %, 97 %, 96 %, 95 %, 94 %, 93 %, 92 %, 91 %, 90 %, 89 %, 88 %, 87 %, 86 % u 85 % de identidad de secuencia con un dominio de IgSF de tipo salvaje o no modificado o fragmento de unión específico del mismo contenido en una proteína de IgSF de tipo salvaje o no modificada, tal como, pero no limitado a, las descritas en la Tabla 1 como SEQ ID NO: 1.

45 50 En algunas realizaciones, el dominio de IgSF de una proteína inmunomoduladora proporcionada en la presente memoria es un fragmento de unión específico de un dominio de IgSF de tipo salvaje o no modificado contenido en una proteína de IgSF de tipo salvaje o no modificada, tal como, pero no limitado a, los descritos en la Tabla 1 en la SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, el fragmento de unión específico puede tener una longitud de aminoácidos de al menos 50 aminoácidos, tal como al menos 60, 70, 80, 90, 100 o 110 aminoácidos. En algunas realizaciones, el fragmento de unión específico del dominio IgV contiene una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente un 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % de la longitud del dominio IgV de tipo salvaje o no modificado. En algunas realizaciones, el fragmento de unión específico del dominio IgC comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente un 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % de la longitud del dominio IgC de tipo salvaje o no modificado. En algunas realizaciones, el fragmento de unión específico modula la actividad inmunológica. En realizaciones más específicas, el fragmento de unión específico de un dominio de IgSF aumenta la actividad inmunológica. En realizaciones alternativas, el fragmento de unión específico disminuye la actividad inmunológica.

55 60 Para determinar el porcentaje de identidad de dos secuencias de ácido nucleico o de dos aminoácidos, las secuencias se alinean con fines de comparación óptimos (p. ej., se pueden introducir huecos en la secuencia de una primera secuencia de aminoácidos o de ácido nucleico para un alineamiento óptimo con una segunda secuencia de aminoácidos o de ácido nucleico). A continuación, se comparan los residuos de aminoácidos o nucleótidos en las posiciones de aminoácidos o posiciones de nucleótidos correspondientes. Cuando una posición en la primera secuencia está ocupada por el mismo residuo de aminoácido o nucleótido que la posición correspondiente en la segunda secuencia, entonces las moléculas son idénticas en esa posición. El porcentaje de identidad entre las dos secuencias es una función del número de posiciones idénticas compartidas por las secuencias (es decir, % de

identidad = no. de posiciones idénticas/no. total de posiciones (p. ej., posiciones superpuestas) x 100). En una realización, las dos secuencias tienen la misma longitud. Se pueden alinear manualmente las secuencias y contar el número de ácidos nucleicos o aminoácidos idénticos. Alternativamente, el alineamiento de dos secuencias para la determinación del porcentaje de identidad se puede lograr usando un algoritmo matemático. Dicho algoritmo está

5 incorporado en los programas NBLAST y XBLAST. Las búsquedas de nucleótidos BLAST se pueden realizar con el programa NBLAST, puntuación = 100, longitud de palabra = 12, para obtener secuencias de nucleótidos homólogas a las moléculas de ácido nucleico de la invención. Las búsquedas de proteínas BLAST se pueden realizar con el programa XBLAST, puntuación = 50, longitud de palabra = 3 para obtener secuencias de aminoácidos homólogas a una molécula de proteína de la invención. Para obtener alineamientos con huecos con fines de comparación, se puede
10 utilizar Gapped BLAST. Alternativamente, se puede usar PSI-Blast para realizar una búsqueda iterada que detecta relaciones distantes entre moléculas. Cuando se utilizan los programas NBLAST, XBLAST y Gapped BLAST, se
15 pueden utilizar los parámetros por defecto de los programas respectivos, tales como los disponibles en el sitio web de NCBI. Alternativamente, la identidad de secuencia se puede calcular después de que las secuencias se hayan alineado, p. ej., por el programa BLAST en la base de datos NCBI. Generalmente, se pueden utilizar para el alineamiento los ajustes por defecto con respecto, p. ej., a, la "matriz de puntuación" y la "penalización por huecos".
En el contexto de la presente invención, se pueden emplear los ajustes por defecto de BLASTN y PSI BLAST NCBI.

Según la invención reivindicada, la proteína inmunomoduladora contiene al menos un dominio de IgSF con afinidad modificada. En algunas realizaciones, la proteína inmunomoduladora contiene al menos un dominio con afinidad modificada y además contiene al menos un dominio de IgSF sin afinidad modificada (p. ej., dominio de IgSF no modificada o de tipo salvaje). En algunas realizaciones, la proteína inmunomoduladora contiene al menos dos dominios con afinidad modificada. En algunas realizaciones, la proteína inmunomoduladora puede contener una pluralidad de dominios de IgSF sin afinidad modificada y/o dominios de IgSF con afinidad modificada tal como 1, 2, 3, 4, 5 o 6 dominios de IgSF sin afinidad modificada y/o de IgSF con afinidad modificada.

20 En algunas realizaciones, al menos un dominio de IgSF sin afinidad modificada y/o un dominio de IgSF con afinidad modificada presente en una proteína inmunomoduladora proporcionada en la presente memoria se une específicamente al menos a una especie molecular de la superficie celular expresada en células de mamífero que forman la sinapsis inmunológica (IS). Por supuesto, en algunas realizaciones, una proteína inmunomoduladora proporcionada en la presente memoria comprende una pluralidad de dominios de IgSF sin afinidad modificada y dominios de IgSF con afinidad modificada tal como 1, 2, 3, 4, 5 o 6 dominios de IgSF sin afinidad modificada y dominios de IgSF con afinidad modificada. Uno o más de estos dominios de IgSF sin afinidad modificada y/o dominios de IgSF con afinidad modificada pueden unirse específicamente independientemente a una o ambas de las células de mamífero que forman la IS.

25 En algunas realizaciones, la especie molecular de la superficie celular a la que se une específicamente el dominio de IgSF con afinidad modificada es el compañero de unión afín del miembro de la familia de IgSF de tipo salvaje o del dominio de IgSF de tipo salvaje que ha sido modificado en su afinidad. En algunas realizaciones, la especie molecular de la superficie celular es un miembro de IgSF de mamífero. En algunas realizaciones, la especie molecular de la superficie celular es un miembro de IgSF humano. Según la invención reivindicada, las especies moleculares de la superficie celular serán los compañeros de unión afines de la superficie celular como se indica en la Tabla 1. En la presente memoria 30 también se describe una especie molecular de la superficie celular que es una proteína viral, tal como una proteína de poliovirus, en superficie celular de una célula de mamífero tal como una célula humana.

35 En algunas realizaciones, al menos un dominio de IgSF sin afinidad modificada y/o con afinidad modificada de una proteína inmunomoduladora proporcionada en la presente memoria se une al menos a dos o tres especies moleculares de la superficie celular presentes en células de mamífero que forman la IS. Las especies moleculares de la superficie celular a las que se unen específicamente los dominios de IgSF sin afinidad modificada y/o los dominios de IgSF con 40 afinidad modificada de la invención pueden estar exclusivamente en una u otra de las dos células de mamífero (es decir, en configuración cis) que forman la IS o, alternativamente, la especie molecular de la superficie celular puede estar presente en ambas.

45 En algunas realizaciones, el dominio de IgSF con afinidad modificada se une específicamente al menos a dos especies moleculares de la superficie celular en donde una de las especies moleculares está presente en una de las dos células de mamífero que forman la IS y la otra especie molecular está presente en la segunda de las dos células de mamíferos que forman la IS. En dichas realizaciones, la especie molecular de la superficie celular no está necesariamente presente únicamente en una u otra de las dos células de mamífero que forman la IS (es decir, en una configuración trans) aunque en algunas realizaciones sí lo está. Por lo tanto, las realizaciones proporcionadas en la presente memoria incluyen aquellas en las que cada especie molecular de la superficie celular está exclusivamente en una u otra de las células de mamífero que forman la IS (configuración cis), así como aquellas en las que la especie molecular de la superficie celular a la que se une cada IgSF con afinidad modificada está presente en ambas células de mamífero que forman la IS (es decir, configuración cis y trans).

50 Los expertos reconocerán que las células presentadoras de antígenos (APC) y las células tumorales forman una sinapsis inmunológica con los linfocitos. Por tanto, en algunas realizaciones, al menos un dominio de IgSF sin afinidad modificada y/o al menos un dominio de IgSF con afinidad modificada de la proteína inmunomoduladora se une 55 específicamente solo a especies moleculares de la superficie celular presentes en una célula cancerosa, en donde la

célula cancerosa junto con linfocito forma la IS. En otras realizaciones, al menos un dominio de IgSF sin afinidad modificada y/o al menos un dominio de IgSF con afinidad modificada de la proteína inmunomoduladora se une específicamente solo a especies moleculares de la superficie celular presentes en un linfocito, en donde el linfocito junto con una APC o célula tumoral forma la IS. En algunas realizaciones, el dominio de IgSF sin afinidad modificada y/o el dominio de IgSF con afinidad modificada se une a especies moleculares de la superficie celular presentes tanto en la célula diana (o APC) como en el linfocito que forman la IS.

5 Las proteínas inmunomoduladoras de la invención reivindicada comprenden al menos un dominio de IgSF con afinidad modificada con una secuencia de aminoácidos que difiere de un dominio de IgSF de tipo salvaje o no modificado (p. ej., un dominio de IgSF de mamífero) de manera que su afinidad de unión (o avidez si es multimérico u otra estructura relevante), en condiciones de unión específicas, para al menos dos de sus compañeros de unión afines se incrementa en relación con el control de dominio de IgSF de tipo salvaje inalterado o no modificado. En algunas realizaciones, un dominio de IgSF con afinidad modificada tiene una afinidad de unión para un compañero de unión afín que difiere de la de una secuencia de control de IgSF de tipo salvaje o no modificado según se determina, por ejemplo, mediante inmunoensayos ELISA en fase sólida, citometría de flujo o ensayos Biacore. El dominio de IgSF de la invención reivindicada tiene una mayor afinidad de unión para dos o más compañeros de unión afines. En algunas realizaciones, el dominio de IgSF con afinidad modificada tiene una afinidad de unión disminuida para uno o más compañeros de unión afines, en relación con un dominio de IgSF de tipo salvaje o no modificado. En algunas realizaciones, el compañero de unión afín puede ser una proteína de mamífero, tal como una proteína humana o una proteína murina.

10 15 20 Las afinidades de unión para cada uno de los compañeros de unión afines son independientes; es decir, en algunas realizaciones, un dominio de IgSF con afinidad modificada tiene una afinidad de unión aumentada para dos o tres compañeros de unión afines diferentes, y una afinidad de unión disminuida por uno, dos o tres de los compañeros de unión afines diferentes, en relación con un polipéptido ICOSL de tipo salvaje o no modificado.

25 En algunas realizaciones de una proteína inmunomoduladora proporcionada en la presente memoria, la afinidad o avidez de unión del dominio de IgSF con afinidad modificada aumenta al menos un 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 100 %, 200 %, 300 %, 400 %, 500 %, 1.000 %, 5.000 % o 10.000 % con respecto al dominio de IgSF de control de tipo salvaje o no modificado. En algunas realizaciones, el aumento en la afinidad de unión en relación con el dominio de IgSF de tipo salvaje o no modificado es más de 1,2 veces, 1,5 veces, 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 6 veces, 7 veces, 8 veces, 9 veces, 10 veces, 20 veces, 30 veces 40 veces o 50 veces.

30 35 En algunas realizaciones, la afinidad o avidez de unión disminuye al menos un 10 % y hasta un 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 % o hasta un 90 % en relación con el dominio de IgSF de control de tipo salvaje o no modificado. En algunas realizaciones, la disminución de la afinidad de unión en relación con el dominio de IgSF de tipo salvaje o no modificado es más de 1,2 veces, 1,5 veces, 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 6 veces, 7 veces, 8 veces, 9 veces, 10 veces, 20 veces, 30 veces 40 veces o 50 veces.

40 45 En algunas realizaciones, la afinidad de unión específica de un dominio de IgSF con afinidad modificada a un compañero de unión afín puede ser de al menos 1×10^{-5} M, 1×10^{-6} M, 1×10^{-7} M, 1×10^{-8} M, 1×10^{-9} M, 1×10^{-10} M o 1×10^{-11} M, o 1×10^{-12} M.

En algunas realizaciones, una proteína inmunomoduladora proporcionada comprende al menos dos dominios de IgSF en los que al menos uno de los dominios de IgSF tiene la afinidad modificada mientras que en algunas realizaciones ambos están tienen la afinidad modificada, y en los que al menos uno de los dominios de IgSF con afinidad modificada tiene una afinidad (o avidez) aumentada para su compañero de unión afín y al menos un dominio de IgSF con afinidad modificada tiene una afinidad (o avidez) disminuida para su compañero de unión afín.

50 55 En algunas realizaciones, un dominio de IgSF que de otro modo se une a múltiples especies moleculares de la superficie celular se modifica en su afinidad de manera que sustancialmente ya no se une específicamente a una de sus especies moleculares afines de la superficie celular. Por tanto, en estas realizaciones, la unión específica a una de sus especies moleculares afines de la superficie celular se reduce a una unión específica de no más del 10 % del nivel de tipo salvaje y, a menudo, no más del 7 %, 5 %, 3 %, 1 %, o ninguna unión específica detectable o estadísticamente significativa.

En estas realizaciones, un sitio de unión específico en un dominio de IgSF de mamífero se inactiva o se inactiva sustancialmente con respecto al menos a una de las especies moleculares de la superficie celular. En la presente memoria también se describe, si un dominio de IgSF de tipo salvaje se une específicamente a exactamente dos especies moleculares de la superficie celular, entonces puede modificarse su afinidad para que se una específicamente a exactamente una especie molecular de la superficie celular (por lo que la determinación del número de dominios de IgSF con afinidad modificada ignora cualquier secuencia fraccionaria sustancialmente inmunológica inactiva del mismo). Y, si un dominio de IgSF de tipo salvaje se une específicamente a exactamente tres especies moleculares de la superficie celular, entonces, en algunas realizaciones, se modifica su afinidad para que se una específicamente a exactamente dos especies moleculares de la superficie celular. El dominio de IgSF con afinidad modificada para que ya no se una sustancialmente específicamente a una de sus especies moleculares afines de la superficie celular puede ser un dominio de IgSF que, de otro modo, se une específicamente de forma competitiva o no competitiva a sus especies moleculares de la superficie celular. Los expertos apreciarán que un dominio de IgSF

de tipo salvaje que se une competitivamente a dos compañeros de unión afines puede, no obstante, inactivarse con respecto a exactamente uno de ellos si, por ejemplo, sus sitios de unión no son precisamente coextensivos, sino que simplemente se superponen de manera que la unión específica de uno inhibe la unión del otro compañero de unión afín y, sin embargo, ambos sitios de unión competitivos son distintos.

- 5 Los dominios de IgSF sin afinidad modificada y/o los dominios de IgSF con afinidad modificada de las proteínas inmunomoduladoras proporcionadas pueden en algunas realizaciones unirse específicamente de forma competitiva a sus especies moleculares afines de la superficie celular. En otras realizaciones, los dominios de IgSF sin afinidad modificada y/o los dominios de IgSF con afinidad modificada de una proteína inmunomoduladora proporcionada en la presente memoria se unen específicamente de forma no competitiva a sus especies moleculares afines de la superficie celular. Cualquier número de dominios de IgSF sin afinidad modificada y/o dominios de IgSF con afinidad modificada presentes en una proteína inmunomoduladora proporcionada en la presente memoria puede unirse específicamente de forma competitiva o no competitiva, siempre que al menos un dominio de la superfamilia de inmunoglobulinas (IgSF) CD80 con afinidad modificada se una específicamente de forma no competitiva a los al menos dos compañeros de unión afines.
- 10 15 En algunas realizaciones, la proteína inmunomoduladora proporcionada en la presente memoria comprende al menos dos dominios de IgSF sin afinidad modificada, o al menos un dominio de IgSF sin afinidad modificada y al menos un dominio de IgSF con afinidad modificada, o al menos dos dominios de IgSF con afinidad modificada en donde un dominio de IgSF se une específicamente de manera competitiva y un segundo dominio de IgSF se une de manera no competitiva a sus especies moleculares afines de la superficie celular. Más generalmente, una proteína inmunomoduladora proporcionada en la presente memoria puede comprender 1, 2, 3, 4, 5 o 6 dominios de IgSF sin afinidad modificada y/o dominios de IgSF con afinidad modificada con unión competitiva o 1, 2, 3, 4, 5 o 6 con unión no competitiva o cualquier combinación de los mismos. Por lo tanto, una proteína inmunomoduladora proporcionada en la presente memoria puede tener el número de dominios de IgSF de unión competitiva y no competitiva, respectivamente, de: 1 y 0, 1 y 1, 1 y 2, 1 y 3, 2 y 0, 2 y 1, 2 y 2, 2 y 3, 3 y 0, 3 y 1, 3 y 2, 3 y 3, 4 y 0, 4 y 1, 4 y 2.
- 20 25 30 35 40 45 50 55 60 65 70 75 80 85 90 95 100 105 110 115 120 125 130 135 140 145 150 155 160 165 170 175 180 185 190 195 200 205 210 215 220 225 230 235 240 245 250 255 260 265 270 275 280 285 290 295 300 305 310 315 320 325 330 335 340 345 350 355 360 365 370 375 380 385 390 395 400 405 410 415 420 425 430 435 440 445 450 455 460 465 470 475 480 485 490 495 500 505 510 515 520 525 530 535 540 545 550 555 560 565 570 575 580 585 590 595 600 605 610 615 620 625 630 635 640 645 650 655 660 665 670
- No es necesario que una pluralidad de proteínas inmunomoduladoras de dominios de IgSF sin afinidad modificada y con afinidad modificada proporcionadas en la presente memoria estén unidas covalentemente directamente entre sí. En algunas realizaciones, un tramo intermedio de uno o más residuos de aminoácidos enlaza indirectamente covalentemente los dominios de IgSF sin afinidad modificada y/o con afinidad modificada entre sí. El enlace puede ser a través de los residuos N-terminal a C-terminal.
- En algunas realizaciones, el enlace se puede realizar a través de las cadenas laterales de residuos de aminoácidos que no están localizados en el extremo N-terminal o C-terminal del dominio de IgSF sin afinidad modificada o con afinidad modificada. Por tanto, los enlaces se pueden realizar mediante residuos de aminoácidos internos o terminales o combinaciones de los mismos.
- Los "enlazadores peptídicos" que unen los dominios de IgSF sin afinidad modificada y/o con afinidad modificada pueden tener una longitud de un solo residuo de aminoácido o mayor. En algunas realizaciones, el enlazador peptídico tiene una longitud de al menos un residuo de aminoácido, pero no más de 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1 residuos de aminoácidos. En algunas realizaciones, el enlazador es (en código de aminoácidos de una letra): GGGGS ("4GS") o multímeros del enlazador 4GS, tales como repeticiones de 2, 3, 4 o 5 enlazadores 4GS. En otras realizaciones opcionales, se interponen una serie de residuos de alanina entre los enlazadores 4GS y una Fc a la que se une covalentemente la proteína inmunomoduladora. En algunas realizaciones, el número de residuos de alanina en cada serie es: 2, 3, 4, 5 o 6 alaninas.

A. Dominios de IgSF con afinidad modificada ejemplares

Según la invención reivindicada, el dominio de IgSF con afinidad modificada tiene una o más sustituciones de aminoácidos en un dominio de IgSF de una proteína de IgSF de tipo salvaje o no modificada, tal como se muestra en la Tabla 1 anterior. La una o más sustituciones de aminoácidos pueden estar en el ectodominio del dominio de IgSF de tipo salvaje o no modificado, tal como el dominio extracelular. En algunas realizaciones, la una o más sustituciones de aminoácidos están en el dominio IgV o en un fragmento de unión específico del mismo. En algunas realizaciones, la una o más sustituciones de aminoácidos están en el dominio IgC o en un fragmento de unión específico del mismo. En algunas realizaciones del dominio de IgSF con afinidad modificada, algunas de la una o más sustituciones de aminoácidos están en el dominio IgV o en un fragmento de unión específico del mismo, y algunas de la una o más sustituciones de aminoácidos están en el dominio IgC o en un fragmento de unión específico del mismo.

En algunas realizaciones, el dominio de IgSF con afinidad modificada tiene hasta 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, o 20 sustituciones de aminoácidos. Las sustituciones pueden estar en el dominio IgV o en el dominio IgC. En algunas realizaciones, el dominio de IgSF con afinidad modificada tiene hasta 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, o 20 sustituciones de aminoácidos en el dominio IgV o fragmento de unión específico del mismo. En algunas realizaciones, el dominio de IgSF con afinidad modificada tiene hasta 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, o 20 sustituciones de aminoácidos en el dominio IgC o fragmento de unión específico del mismo. En algunas realizaciones, el dominio de IgSF con afinidad modificada tiene al menos aproximadamente un 85 %, 86 %, 86 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 %

de identidad de secuencia con el dominio de IgSF de tipo salvaje o no modificado o fragmento de unión específico del mismo, tal como el dominio de IgSF contenido en la proteína de IgSF mostrada en la SEQ ID NO: 1.

Según la invención reivindicada, el dominio de IgSF con afinidad modificada contiene una o más sustituciones de aminoácidos en un dominio de IgSF de tipo salvaje o no modificado de un miembro de la familia B7 de IgSF. Según la invención reivindicada, el miembro de la familia B7 de IgSF es CD80. En algunas realizaciones, el dominio de IgSF con afinidad modificada tiene al menos aproximadamente un 85 %, 86 %, 86 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia con el dominio de IgSF de tipo salvaje o no modificado o fragmento de unión específico del mismo, tal como el dominio de IgSF contenido en la proteína de IgSF mostrada en la SEQ ID NO: 1. Los dominios de IgSF con afinidad modificada ejemplares de CD80 se muestran en la Tabla 2. Los dominios de IgSF con afinidad modificada ejemplares de ICOSL se muestran en la Tabla 3. Los dominios de IgSF con afinidad modificada ejemplares de CD86 se muestran en la Tabla 4.

TABLA 2: Polipéptidos CD80 variantes ejemplares

Mutación(es)	ECD SEQ ID NO	IgV SEQ ID NO
Tipo salvaje	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/110A	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

TABLA 2: Polipéptidos CD80 variantes ejemplares

Mutación(es)	ECD SEQ ID NO	IgV SEQ ID NO
A91G/F92L/F108L/T120S	91	181
R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/E81V/L85R/K89 N/A91T/F92P/K93V/R94L/I118T/N149S	92	182
R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/E81V/L85R/K89 N/A91T/F92P/K93V/R94L/N144S/N149S	93	
R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M42T/M43R/M47T/E81V/L85 R/K89N/A91T/F92P/K93V/R94L/LI48S/N149S	94	183
E24G/R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/F59L/E81 V/L85R/K89N/A91T/F92P/K93V/R94L/H96R/N149S/C182S	95	184
R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/E81V/L85R/K89 N/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
K36G/K37Q/M38I/L40M	103	190
K36G	104	191
R29H/Y31H/T41G/Y87N/E88G/K89E/D90N/A91G/P109S	105	192
A12T/H18L/N43V/F59L/E77K/P109S/I118T	106	193
R29V/Y31F/K36G/M38L/N43Q/E81R/V83I/L85I/K89R/D90L/A91E/F92N/K93 Q/R94G	107	194
V68M/L70P/L72P/K86E	108	195

TABLA 3: Polipéptidos de ICOSL variantes ejemplares

Mutación(es)	ECD SEQ ID NO	IgV SEQ ID NO
Tipo salvaje	32	196
N52S	109	197
N52H	110	198
N52D	111	199
N52Y/N57Y/F138L/L203P	112	200
N52H/N57Y/Q100P	113	201
N52S/Y146C/Y152C	114	
N52H/C198R	115	
N52H/C140D/T225A	116	
N52H/C198R/T225A	117	
N52H/K92R	118	202
N52H/S99G	119	203
N52Y	120	204
N57Y	121	205
N57Y/Q100P	122	206
N52S/S130G/Y152C	123	
N52S/Y152C	124	
N52S/C198R	125	
N52Y/N57Y/Y152C	126	
N52Y/N57Y/129P/C198R	127	
N52H/L161P/C198R	128	
N52S/T113E	129	

TABLA 2: Polipéptidos CD80 variantes ejemplares

Mutación(es)	ECD SEQ ID NO	IgV SEQ ID NO
S54A	130	207
N52D/S54P	131	208
N52K/L208P	132	209
N52S/Y152H	133	
N52D/V151A	134	
N52H/I143T	135	
N52S/L80P	136	210
F120S/Y152H/N201S	137	
N52S/R75Q/L203P	138	211
N52S/D158G	139	
N52D/Q133H	140	
N52S/N57Y/H94D/L96F/L98F/Q100R	141	212
N52S/N57Y/H94D/L96F/L98F/Q100R/G103E/F120S	142	213
N52S/G103E	239	240

TABLA 4: Polipéptidos CD86 variantes ejemplares

Mutación(es)	ECD SEQ ID NO	IgC SEQ ID NO
Tipo salvaje	29	220
Q35H/H90L/Q102H	148	221
Q35H	149	222
H90L	150	223
Q102H	151	224

5 En la presente memoria también se describen dominios de IgSF con afinidad modificada que contienen una o más sustituciones de aminoácidos en un dominio de IgSF de tipo salvaje o no modificado de un miembro de la familia Nkp30. El dominio de IgSF con afinidad modificada puede tener al menos aproximadamente un 85 %, 86 %, 86 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad de secuencia con el dominio de IgSF de tipo salvaje o no modificado o fragmento de unión específico del mismo, tal como el dominio de IgSF contenido en la proteína de IgSF mostrada en la SEQ ID NO: 27. La Tabla 5 proporciona dominios de IgSF de Nkp30 con afinidad modificada ejemplares .

TABLA 5: Polipéptidos Nkp30 variantes ejemplares

Mutación(es)	ECD SEQ ID NO	IgV SEQ ID NO
Tipo salvaje	54	214
L30V/A60V/S64P/S86G	143	215
L30V	144	216
A60V	145	217
S64P	146	218
S86G	147	219

10

B. Tipos de proteína inmunomoduladora con afinidad modificada

1. Dominio con afinidad modificada de unión dual

15 En algunas realizaciones, la proteína inmunomoduladora proporcionada en la presente memoria puede comprender la secuencia de al menos un dominio de IgSF de un miembro de la familia de IgSF que no es una inmunoglobulina (es decir, no es un anticuerpo) de mamífero de tipo salvaje, en donde al menos un dominio de IgSF en la misma tiene la afinidad modificada (Proteínas inmunomoduladoras de "Tipo I"). Según la invención, el al menos un dominio de IgSF modificado se une específicamente de forma no competitiva a los al menos dos compañeros de unión afines.

En algunas realizaciones, la proteína inmunomoduladora comprende al menos un dominio de la superfamilia de

5 inmunoglobulinas (IgSF) con afinidad modificada que no es una inmunoglobulina que se une específicamente de forma no competitiva al menos a dos compañeros de unión afines. En la presente memoria también se describen dominios con afinidad modificada que exhiben una unión aumentada al menos a uno de los compañeros de unión afines en comparación con el dominio de IgSF de tipo salvaje o no modificado. Según la invención reivindicada, el dominio con afinidad modificada exhibe una unión aumentada al menos a dos compañeros de unión afines diferentes.

Según la invención reivindicada, el miembro de IgSF no modificado o de tipo salvaje, tal como el miembro de IgSF de mamífero, es uno de los miembros de IgSF o comprende un dominio de IgSF de uno de los miembros de IgSF como se indica en la Tabla 1, incluyendo cualquier ortólogo de mamífero del mismo.

10 En algunas realizaciones, los dominios de IgSF adicionales presentes en la proteína inmunomoduladora de Tipo I pueden no tener la afinidad modificada y/o tener la afinidad modificada, tales como al menos dos, tres, cuatro o cinco dominios de IgSF y, en algunas realizaciones, exactamente dos, tres, cuatro o cinco dominios de IgSF.

15 En algunas realizaciones, una proteína inmunomoduladora de Tipo I de la presente memoria que comprende al menos un dominio de la superfamilia de inmunoglobulinas (IgSF) con afinidad modificada que no es una inmunoglobulina que comprende una o más sustituciones de aminoácidos en un dominio de IgSF de tipo salvaje o no modificado, en el que el dominio de IgSF con afinidad modificada tiene 1) unión aumentada al menos a dos compañeros de unión afines en comparación con el dominio de IgSF de tipo salvaje o no modificado; y 2) el al menos un dominio de IgSF con afinidad modificada se une específicamente de forma no competitiva a los al menos dos compañeros de unión afines. Según la invención reivindicada, el dominio de IgSF con afinidad modificada de la proteína inmunomoduladora de Tipo I tiene una unión aumentada al menos a dos compañeros de unión afines. En la presente memoria también se describen dominios de IgSF con afinidad modificada de proteínas inmunomoduladoras de Tipo I con unión disminuida al menos a dos compañeros de unión afines. El dominio de IgSF con afinidad modificada de la proteína inmunomoduladora de Tipo I puede tener una unión aumentada al menos a un compañero de unión afín y una unión disminuida al menos a otro compañero de unión afín diferente.

20 En algunas realizaciones, los dos compañeros de unión afines se expresan en la superficie de al menos dos células diferentes, tales como dos células de mamífero diferentes. Por ejemplo, en algunas realizaciones, un compañero de unión afín se expresa en un linfocito y otro compañero de unión afín se expresa en células presentadoras de antígeno. En algunas realizaciones, los dos compañeros de unión afines se expresan en el mismo tipo de célula, tal como la misma célula inmune. En alguna realización, la proteína inmunomoduladora de Tipo I es capaz de modular la actividad inmunológica de una o más de las células inmunes, tal como la actividad inmunológica de un linfocito, por ejemplo, una célula T. En algunas realizaciones, se incrementa la actividad inmunológica. En algunas realizaciones, se disminuye la actividad inmunológica.

25 En algunas realizaciones, la proteína inmunomoduladora comprende o consiste esencialmente en solo un dominio de IgSF con afinidad modificada, que se une de manera no competitiva a los al menos dos compañeros de unión afines. En algunas realizaciones, el dominio con afinidad modificada es un dominio IgV con afinidad modificada. En algunas realizaciones, el dominio con afinidad modificada es un dominio IgC con afinidad modificada.

30 Según la invención reivindicada, una proteína inmunomoduladora de Tipo I proporcionada en la presente memoria comprende un dominio de IgSF de CD80 con afinidad modificada que se une específicamente de forma no competitiva a CD28 y PDL1. En algunas realizaciones, el dominio de IgSF de CD80 con afinidad modificada es un dominio IgV. En algunas realizaciones, la proteína inmunomoduladora comprende además un dominio de IgSF adicional sin afinidad modificada.

40 2. Proteínas inmunomoduladoras apiladas o multidomínio

45 En algunas realizaciones de la presente invención, una proteína inmunomoduladora comprende una combinación (una "combinación de tipo no salvaje") y/o disposición (una "disposición de tipo no salvaje" o "permutación de tipo no salvaje") de secuencias de dominio de IgSF con afinidad modificada y/o sin afinidad modificada que no se encuentran en miembros de la familia de IgSF de tipo salvaje (proteínas inmunomoduladoras de "Tipo II"). Las secuencias de los dominios de IgSF que no tienen la afinidad modificada (por ejemplo, de tipo salvaje) o que tienen la afinidad modificada pueden ser de mamífero, tal como de ratón, rata, mono cynomolgus o de origen humano, o combinaciones de los mismos. El número de dichos dominios de IgSF sin afinidad modificada o con afinidad modificada presentes en estas realizaciones de una proteína inmunomoduladora de Tipo II (ya sean combinaciones de tipo no salvaje o disposiciones de tipo no salvaje) es al menos 2, 3, 4 o 5 y en algunas realizaciones exactamente 2, 3, 4 o 5 dominios de IgSF (por lo que la determinación del número de dominios de IgSF con afinidad modificada ignora cualquier secuencia fraccionaria de unión no específica de las mismas y/o secuencias fraccionarias sustancialmente inmunológicamente inactivas de las mismas).

50 55 Según la invención reivindicada, las proteínas inmunomoduladoras de Tipo II de la invención comprenden una combinación de dominios de IgSF de tipo no salvaje en donde los dominios de IgSF comprenden un dominio de IgSF de un miembro de la familia de IgSF de los enumerados en la Tabla 1. Por lo tanto, en algunas realizaciones, la proteína inmunomoduladora puede contener un primer y segundo dominio de IgSF que puede ser cada uno un dominio de IgSF con afinidad modificada que contiene una o más sustituciones de aminoácidos en comparación con un dominio

de IgSF contenido en un miembro de la familia de IgSF mostrado en la Tabla 1.

En algunas realizaciones, los dominios de IgSF son cada uno independientemente un dominio de IgSF con afinidad modificada o sin afinidad modificada contenido en un miembro de la familia de IgSF de una familia seleccionada de la familia de proteínas reguladoras de señales (SIRP), familia semejantes al receptor de activación expresado en células 5 mieloides (TREML), familia de moléculas de adhesión celular relacionadas con antígenos carcinoembriónarios (CEACAM), familia de lectinas similares a Ig de unión a ácido siálico (SIGLEC), familia de butirofilinas, familia B7, familia CD28, familia que contiene dominios de conjunto V y de inmunoglobulina (VSIG), familia de dominios de 10 conjunto V transmembrana (VSTM), familia de complejos mayores de histocompatibilidad (MHC), familia de moléculas de activación linfocítica de señalización (SLAM), receptor semejante a inmunoglobulina leucocitaria (LIR), familia de nectina (Nec), familia semejante a nectina (NECL), familia relacionada con el receptor de poliovirus (PVR), familia de 15 receptores desencadenantes de citotoxicidad natural (NCR), familia de inmunoglobulina y mucina de células T (TIM) o familia de receptores semejantes a inmunoglobulina de células asesinas (KIR). En algunas realizaciones, cada uno de los dominios de IgSF se deriva independientemente de una proteína de IgSF seleccionada del grupo que consiste en 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-alfa), CD8B (CD8-beta), LAG3, HAVCR2 (TIM-3), CEACAM1, TIGIT, PVR (CD155), PVRL2 (CD112), CD226, CD2, CD160, CD200, CD200R1 (CD200R) y NC R3 (NKp30).

En algunas realizaciones, los dominios de IgSF contienen independientemente una o más sustituciones de 20 aminoácidos en comparación con un dominio de IgSF en un dominio de IgSF de tipo salvaje o no modificado, tal como un dominio de IgSF en un miembro de la familia de IgSF mostrado en la Tabla 1. Según la invención reivindicada, el dominio de IgSF con afinidad modificada comprende al menos un 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más de identidad de secuencia con un dominio de IgSF de tipo salvaje o no modificado o un fragmento de unión específico del mismo contenido en la secuencia de aminoácidos mostrada 25 en la SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, el dominio de IgSF de tipo salvaje o no modificado es un dominio IgV o un dominio IgC, tal como un dominio IgC1 o IgC2. En algunas realizaciones, el dominio de IgSF con afinidad modificada es un dominio IgV o un dominio IgC con afinidad modificada.

En la presente memoria también se describe la proteína inmunomoduladora de Tipo II de la invención, en la que el 30 número de dominios de IgSF es al menos 2 en donde el número de dominios de IgSF con afinidad modificada y el número de dominios de IgSF sin afinidad modificada es cada uno independientemente al menos: 0, 1, 2, 3, 4, 5 o 6. Por lo tanto, el número de dominios de IgSF con afinidad modificada y el número de dominios de IgSF sin afinidad 35 modificada, respectivamente, (dominio de IgSF con afinidad modificada: dominio de IgSF sin afinidad modificada), puede ser exactamente o al menos: 2:0 (afinidad modificada: tipo salvaje), 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 o 5:1.

En algunas realizaciones de una proteína inmunomoduladora de Tipo II, al menos dos de los dominios de IgSF con 40 afinidad modificada y/o sin afinidad modificada son dominios de IgSF idénticos.

En algunas realizaciones, una proteína inmunomoduladora de Tipo II de la presente invención comprende al menos dos dominios de IgSF con afinidad modificada y/o sin afinidad modificada de un solo miembro de IgSF, pero en una 45 disposición de tipo no salvaje (alternativamente, "permutación"). Un ejemplo ilustrativo de una disposición o permutación de tipo no salvaje es una proteína inmunomoduladora de la presente invención que comprende un orden de tipo no salvaje de secuencias de dominio de IgSF con afinidad modificada y/o sin afinidad modificada en relación con las que se encuentran en el miembro de la familia de IgSF de mamífero de tipo salvaje cuyas secuencias de dominio de IgSF sirvieron como fuente de los dominios de IgSF sin afinidad modificada y/o con afinidad modificada. Los miembros de IgSF de tipo salvaje de mamífero en la realización anterior incluyen específicamente los enumerados 50 en la Tabla 1. Por tanto, en un ejemplo, si el miembro de la familia de tipo salvaje comprende un dominio IgC1 próximo al dominio transmembrana de una proteína de la superficie celular y un dominio IgV distal al dominio transmembrana, entonces una proteína inmunomoduladora de la presente invención puede comprender un IgV próximo y un IgC1 distal al dominio transmembrana, aunque en una forma sin afinidad modificada y/o con afinidad modificada. La presencia, en una proteína inmunomoduladora de la presente invención, tanto de combinaciones de tipo no salvaje como de disposiciones de tipo no salvaje de dominios de IgSF sin afinidad modificada y/o con afinidad modificada también está dentro del alcance de la presente invención.

En algunas realizaciones de una proteína inmunomoduladora de Tipo II, los dominios de IgSF sin afinidad modificada y/o con afinidad modificada son dominios de IgSF no idénticos (es decir, diferentes). Los dominios de IgSF con afinidad modificada no idénticos se unen específicamente, en condiciones de unión específicas, a diferentes compañeros de unión afines y son "no idénticos" independientemente de si los dominios de IgSF de tipo salvaje a partir de los cuales se prepararon por ingeniería eran o no los mismos. Así, por ejemplo, una combinación de tipo no salvaje de al menos dos dominios de IgSF no idénticos en una proteína inmunomoduladora de la presente invención puede comprender al menos una secuencia de dominio de IgSF cuyo origen es de y único de un miembro de la familia de IgSF, y al menos una de una segunda secuencia de dominio de IgSF cuyo origen es de y único de otro miembro de la familia de IgSF, en donde los dominios de IgSF de la proteína inmunomoduladora están en forma sin afinidad modificada y/o con afinidad modificada. Sin embargo, en realizaciones alternativas, los dos dominios de IgSF no idénticos se originan a 60 partir de la misma secuencia del dominio de IgSF, pero al menos uno tiene la afinidad modificada de modo que se

unen específicamente a diferentes compañeros de unión afines.

En algunas realizaciones, el número de dominios de IgSF sin afinidad modificada y/o con afinidad modificada no idénticos presentes en una proteína inmunomoduladora de la invención es al menos 2, 3, 4 o 5 y en algunas realizaciones exactamente 2, 3, 4, o 5 dominios de IgSF sin afinidad modificada y/o con afinidad modificada no idénticos. En algunas realizaciones, los dominios de IgSF no idénticos son combinaciones de al menos dos miembros de IgSF indicados en la Tabla 1, y en algunas realizaciones al menos 3 o 4 miembros de IgSF de la Tabla 1.

En la presente memoria también se describe una proteína inmunomoduladora de Tipo II de la invención que comprende un dominio de IgSF Nkp30 con afinidad modificada y un dominio de IgSF ICOSLG con afinidad modificada, un dominio de IgSF CD80 con afinidad modificada o un dominio de IgSF CD86 con afinidad modificada. En algunas realizaciones, una proteína inmunomoduladora de Tipo II comprende un dominio de IgSF con afinidad modificada de al menos dos miembros de la familia B7. En algunas realizaciones, las proteínas inmunomoduladoras comprenden al menos dos dominios con afinidad modificada de un dominio de IgSF CD80 con afinidad modificada, un dominio de IgSF ICOSL con afinidad modificada o un dominio de IgSF CD86 con afinidad modificada o fragmentos de unión específicos del mismo. En algunas realizaciones, los dominios con afinidad modificada se unen mediante al menos o exactamente 1, 2, 3, 4 dominios G4S.

No es necesario que una pluralidad de dominios de IgSF sin afinidad modificada y/o con afinidad modificada en una cadena polipeptídica de proteína inmunomoduladora apilada estén unidos covalentemente directamente entre sí. En algunas realizaciones, un tramo intermedio de uno o más residuos de aminoácidos une indirectamente covalentemente los dominios de IgSF sin afinidad modificada y/o con afinidad modificada entre sí. La unión puede ser a través de los residuos N-terminal a C-terminal.

En algunas realizaciones, la unión se puede realizar a través de las cadenas laterales de los residuos de aminoácidos que no están localizados en el extremo N-terminal o C-terminal del dominio de IgSF sin afinidad modificada y/o con afinidad modificada. Por tanto, las uniones se pueden realizar mediante residuos de aminoácidos internos o terminales o combinaciones de los mismos.

En algunas realizaciones, los "enlazadores peptídicos" que enlazan los dominios de IgSF sin afinidad modificada y/o con afinidad modificada pueden tener una longitud de un residuo de aminoácido único o mayor. En algunas realizaciones, el enlazador peptídico tiene una longitud de al menos un residuo de aminoácido, pero no más de 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1 residuos de aminoácidos. En algunas realizaciones, el enlazador es (en código de aminoácidos de una letra): GGGGS ("4GS") o multímeros del enlazador 4GS, tales como repeticiones de 2, 3, 4 o 5 enlazadores 4GS. En realizaciones opcionales adicionales, se interpone una serie de residuos de alanina entre un enlazador peptídico (tal como un enlazador 4GS o un multímero del mismo) y un Fc al que se une covalentemente la proteína inmunomoduladora. En algunas realizaciones, el número de residuos de alanina en cada serie es: 2, 3, 4, 5 o 6 alaninas.

En algunas realizaciones, los dominios de IgSF sin afinidad modificada y/o con afinidad modificada se unen mediante "enlazadores de péptidos de tipo salvaje" insertados en el extremo N-terminal y/o C-terminal del primer y/o segundo dominio de IgSF sin afinidad modificada y/o con afinidad modificada. En algunas realizaciones, está presente un enlazador peptídico líder insertado en el extremo N-terminal del primer dominio de IgSF y/o una primera secuencia final insertada en el extremo C-terminal del primer dominio de IgSF sin afinidad modificada y/o con afinidad modificada. En algunas realizaciones, está presente un segundo enlazador peptídico líder insertado en el extremo N del segundo dominio de IgSF y/o una segunda secuencia final insertada en el extremo C del segundo dominio de IgSF sin afinidad modificada y/o con afinidad modificada. Cuando el primer y segundo dominios de IgSF sin afinidad modificada y/o con afinidad modificada se derivan de la misma proteína parental y están conectados en la misma orientación, los enlazadores peptídicos de tipo salvaje entre el primer y segundo dominios de IgSF sin afinidad modificada y/o con afinidad modificada no están duplicados. Por ejemplo, cuando el primer enlazador peptídico de tipo salvaje final y el segundo enlazador peptídico de tipo salvaje líder son los mismos, la proteína inmunomoduladora de Tipo II no comprende ni el primer enlazador peptídico de tipo salvaje final ni el segundo enlazador peptídico de tipo salvaje líder.

En algunas realizaciones, la proteína inmunomoduladora de Tipo II comprende un primer enlazador peptídico de tipo salvaje líder insertado en el extremo N-terminal del primer dominio de IgSF sin afinidad modificada y/o con afinidad modificada, en donde el primer enlazador peptídico de tipo salvaje líder comprende en al menos 5 (tal como al menos aproximadamente cualquiera de 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 o más) aminoácidos consecutivos de la secuencia intermedia en la proteína de tipo salvaje de la que se deriva el primer dominio de IgSF sin afinidad modificada y/o con afinidad modificada entre el dominio de IgSF parental y el dominio inmediatamente anterior (tal como un péptido señal o un dominio de IgSF). En algunas realizaciones, el primer enlazador peptídico de tipo salvaje líder comprende la secuencia intermedia completa en la proteína de tipo salvaje a partir de la cual se deriva el primer dominio de IgSF sin afinidad modificada y/o con afinidad modificada entre el dominio de IgSF parental y el dominio inmediatamente anterior (tal como un péptido señal o un dominio de IgSF).

En algunas realizaciones, la proteína inmunomoduladora de Tipo II comprende además un primer enlazador peptídico de tipo salvaje final insertado en el extremo C-terminal del primer dominio de IgSF sin afinidad modificada y/o con afinidad modificada, en donde el primer enlazador peptídico de tipo salvaje final comprende al menos 5 (tal como al

menos aproximadamente cualquiera de 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 o más) aminoácidos consecutivos de la secuencia intermedia en la proteína de tipo salvaje de la que se deriva el primer dominio de IgSF sin afinidad modificada y/o con afinidad modificada entre el dominio de IgSF parental y el dominio inmediatamente siguiente (tal como un dominio de IgSF o un dominio transmembrana). En algunas realizaciones, el primer enlazador peptídico de

5 tipo salvaje final comprende la secuencia intermedia completa en la proteína de tipo salvaje de la que se deriva el primer dominio de IgSF sin afinidad modificada y/o con afinidad modificada entre el dominio de IgSF parental y el dominio inmediatamente siguiente (tal como un dominio de IgSF o un dominio transmembrana).

En algunas realizaciones, la proteína inmunomoduladora de Tipo II comprende además un segundo enlazador 10 peptídico de tipo salvaje líder insertado en el extremo N-terminal del segundo dominio de IgSF sin afinidad modificada y/o con afinidad modificada, en donde el segundo enlazador peptídico de tipo salvaje líder comprende al menos 5 (tal como al menos aproximadamente cualquiera de 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 o más) aminoácidos consecutivos de la secuencia intermedia en la proteína de tipo salvaje de la que se deriva el segundo dominio de IgSF sin afinidad modificada y/o con afinidad modificada entre el dominio de IgSF parental y el dominio inmediatamente anterior (tal como un péptido señal o un dominio de IgSF). En algunas realizaciones, el segundo enlazador peptídico de tipo salvaje 15 líder comprende la secuencia intermedia completa en la proteína de tipo salvaje de la que se deriva el segundo dominio de IgSF sin afinidad modificada y/o con afinidad modificada entre el dominio de IgSF parental y el dominio inmediatamente anterior (tal como un péptido señal o un dominio de IgSF).

En algunas realizaciones, la proteína inmunomoduladora de Tipo II comprende además un segundo enlazador 20 peptídico de tipo salvaje final insertado en el extremo C-terminal del segundo dominio de IgSF sin afinidad modificada y/o con afinidad modificada, en donde el segundo enlazador peptídico de tipo salvaje final comprende al menos 5 (tal como al menos aproximadamente cualquiera de 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 o más) aminoácidos consecutivos de la secuencia intermedia en la proteína de tipo salvaje de la que se deriva el segundo dominio de IgSF sin afinidad modificada y/o con afinidad modificada entre el dominio de IgSF parental y el dominio inmediatamente siguiente (tal como un dominio de IgSF o un dominio transmembrana). En algunas realizaciones, el segundo enlazador peptídico 25 de tipo salvaje final comprende la secuencia intermedia completa en la proteína de tipo salvaje de la que se deriva el segundo dominio de IgSF sin afinidad modificada y/o con afinidad modificada entre el dominio de IgSF parental y el dominio inmediatamente siguiente (tal como un dominio de IgSF o un dominio transmembrana).

En la SEQ ID NO: 231 y SEQ ID NO: 232 se muestra un ejemplo de una secuencia líder y una secuencia final para 30 una proteína de Tipo II que contiene un dominio de IgSF de CD80. Un ejemplo de una secuencia líder y una secuencia final para una proteína de Tipo II que contiene un dominio de IgSF de ICOSL se muestra en la SEQ ID NO: 233 y 234. Un ejemplo de una secuencia líder y una secuencia final para una proteína de Tipo II que contiene un dominio de IgSF de CD86 se muestra en cualquiera de las SEQ ID NO: 236-238. Un ejemplo de una secuencia enlazadora de tipo salvaje para una proteína de Tipo II que contiene un dominio de IgSF de Nkp30 se muestra en la SEQ ID NO: 235.

C. Formato de la proteína inmunomoduladora con afinidad modificada

35 En algunas realizaciones, una proteína inmunomoduladora proporcionada en la presente memoria está en forma soluble. Los expertos apreciarán que las proteínas de la superficie celular tienen típicamente un dominio intracelular, transmembrana y extracelular (ECD) y que se puede preparar una forma soluble de dichas proteínas usando el dominio extracelular o una subsecuencia inmunológicamente activa del mismo. Por tanto, en algunas realizaciones, la proteína inmunomoduladora que contiene un dominio de IgSF con afinidad modificada carece de un dominio transmembrana o

40 de una parte del dominio transmembrana. En algunas realizaciones, la proteína inmunomoduladora que contiene un dominio de IgSF con afinidad modificada carece del dominio intracelular (citoplásmico) o de una porción del dominio intracelular. En algunas realizaciones, la proteína inmunomoduladora contiene un dominio de IgSF con afinidad modificada que solo contiene el dominio ECD o una porción del mismo que contiene un dominio IgV y/o dominio IgC o fragmentos de unión específicos del mismo.

45 En algunas realizaciones, la forma soluble de una proteína inmunomoduladora de la presente invención está unida covalentemente, directa o indirectamente, a un Fc de inmunoglobulina. Generalmente, el Fc está unido covalentemente al extremo amino de la proteína inmunomoduladora. El Fc de inmunoglobulina es en algunas realizaciones de una inmunoglobulina de clase IgG de mamífero, tal como IgG1 o IgG2. En realizaciones particulares, el Fc será Fc de IgG1 o IgG2 humana. Los expertos en la técnica apreciarán que se pueden realizar pequeños cambios, tales como 1, 2, 3 o 4, sustituciones, delecciones, adiciones de aminoácidos o combinaciones de las mismas en un Fc sin cambiar sustancialmente sus propiedades farmacocinéticas. Dichos cambios pueden realizarse, por ejemplo, para ayudar en la capacidad de fabricación o para aumentar, suprimir o eliminar la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos. El término "Fc", tal y como se usa en la presente memoria, pretende abarcar dichas moléculas.

55 En algunas realizaciones, el Fc es Fc murino o humano. En algunas realizaciones, el Fc se deriva de IgG1, tal como IgG1 humana. En algunas realizaciones, el Fc comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 226 o una secuencia de aminoácidos que exhibe al menos un 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 226. En algunas realizaciones, el Fc se deriva de IgG2, tal como IgG2 humana. En algunas realizaciones, el Fc comprende la secuencia 60 de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 227 o una secuencia de aminoácidos que exhibe al menos un 85 %,

86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 227.

En algunas realizaciones, pueden introducirse una o más modificaciones de aminoácidos en la región Fc de una fusión IgSF-variante de Fc proporcionada en la presente memoria, generando así una variante de la región Fc. En algunas 5 realizaciones, la variante de la región Fc tiene una función efectora disminuida. Hay muchos ejemplos de cambios o mutaciones en las secuencias de Fc que pueden alterar la función efectora. Por ejemplo, WO 00/42072, WO2006019447 y Shields et al. J Biol. Chem. 9(2): 6591-6604 (2001) describen variantes de Fc ejemplares con unión mejorada o disminuida a los FcR.

En algunas realizaciones, la región Fc que posee algunas, pero no todas las funciones efectoras, lo que la convierte 10 en un candidato deseable para aplicaciones en las que es importante la semivida de la fusión Fc *in vivo*, sin embargo, ciertas funciones efectoras (tales como CDC y ADCC) son innecesarias o perjudiciales. Se pueden realizar ensayos de citotoxicidad *in vitro* y/o *in vivo* para confirmar la reducción/depleción de las actividades CDC y/o ADCC. Por ejemplo, se pueden realizar ensayos de unión al receptor de Fc (FcR) para asegurar que la fusión de la variante Fc-ICOSL carece de unión a FcγR (por lo tanto, probablemente carece de actividad ADCC), pero conserva la capacidad 15 de unión a FcRn. Las células primarias para mediar ADCC, las células NK, solo expresan FcγRIII, mientras que los monocitos expresan FcγRI, FcγRII y FcγRIII. La expresión de FcR en células hematopoyéticas se resume en la Tabla 3 en la página 464 de Ravetch y Kinet, Annu. Rev. Immunol. 9:457-492 (1991). Los ejemplos no limitantes de ensayos *in vitro* para evaluar la actividad ADCC de una molécula de interés se describen en la Pat. de EE. UU. No. 5.500.362 (véase, p. ej., Hellstrom, I. et al. Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 83:7059-7063 (1986) y Hellstrom, I et al., Proc. Nat'l Acad. 20 Sci. USA Unidos 82:1499-1502 (1985); Pat. de EE. UU. No. 5.821.337 (véase, Bruggemann, M. et al., J. Exp. Med. 166:1351-1361 (1987)). Alternativamente, se pueden emplear métodos de ensayo no radiactivos (véase, por ejemplo, ensayo de citotoxicidad no radiativo ACTI™ para citometría de flujo (CellTechnology, Inc. Mountain View, Calif.); y ensayo de citotoxicidad no radiativo CytoTox 96™ (Promega, Madison, Wis.). Las células efectoras útiles para dichos ensayos incluyen células mononucleares de sangre periférica (PBMC) y células asesinas naturales (NK). 25 Alternativamente, o adicionalmente, se puede evaluar la actividad ADCC de la molécula de interés *in vivo*, p. ej., en un modelo animal tal como el descrito en Clynes et al. Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 95:652-656 (1998). También se pueden llevar a cabo ensayos de unión de C1q para confirmar que la fusión de la variante Fc-ICOSL es incapaz de unirse a C1q y, por tanto, carece de actividad CDC. Véase, p. ej., ELISA de unión a C1q y C3c en WO 2006/029879 y WO 2005/100402. Para evaluar la activación del complemento, se puede realizar un ensayo de CDC (véase, por ejemplo, Gazzano-Santoro et al., J. Immunol. Methods 202:163 (1996); Cragg, M. S. et al., Blood 101:1045-1052 (2003); y Cragg, M. S. y M. J. Glennie, Blood 103:2738-2743 (2004)). Las determinaciones de la unión a FcRn y del aclaramiento/semivida *in vivo* también se pueden realizar usando métodos conocidos en la técnica (véase, p. ej., Petkova, S. B. et al., Int'l. Immunol. 18(12):1759-1769 (2006)).

35 Las fusiones de Fc con función efectora reducida incluyen aquellas con sustitución de uno o más de los residuos de la región Fc 238, 265, 269, 270, 297, 327 y 329 por la numeración EU (Pat. de EE. UU. No. 6.737.056). Dichos mutantes de Fc incluyen mutantes de Fc con sustituciones en dos o más de las posiciones de aminoácidos 265, 269, 270, 297 y 327 por numeración EU, incluyendo el mutante de Fc llamado "DANA" con sustitución de los residuos 265 y 297 por alanina (Pat. de EE. UU. No. 7.332.581).

40 Se describen ciertas variantes de Fc con unión mejorada o disminuida a FcR. (Véase, p. ej., la Pat. de EE. UU. No. 6.737.056; WO 2004/056312, WO2006019447 y Shields et al., J. Biol. Chem. 9(2):6591-6604 (2001).)

En algunas realizaciones, se realizan alteraciones en la región Fc que dan como resultado una unión de C1q y/o 45 citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) disminuida, p. ej., como se describe en la Pat. de EE. UU. No. 6.194.551, WO 99/51642, e Idusogie et al., J. Immunol. 164: 4178-4184 (2000).

50 En la presente memoria se describe una fusión ICOSL-variante de Fc que comprende una región Fc variante que comprende una o más sustituciones de aminoácidos que aumentan la semivida y/o mejoran la unión al receptor de Fc neonatal (FcRn). Los anticuerpos con semivididas aumentadas y unión mejorada a FcRn se describen en US2005/0014934A1 (Hinton et al.). Esos anticuerpos comprenden una región Fc con una o más sustituciones en la misma que mejoran la unión de la región Fc a FcRn. Dichas variantes de Fc incluyen aquellas con sustituciones en uno o más de los residuos de la región Fc: 238, 256, 265, 272, 286, 303, 305, 307, 311, 312, 317, 340, 356, 360, 362, 376, 378, 380, 382, 413, 424 o 434 por numeración EU, p. ej., sustitución del residuo de la región Fc 434 (Pat. de EE. UU. No. 7.371.826).

Véase también Duncan y Winter, Nature 322: 738-40 (1988.); Pat. de EE. UU. No. 5,648.260; Pat. de EE. UU. No. 55 5.624.821; y WO 94/29351 con respecto a otros ejemplos de variantes de la región Fc.

En algunas realizaciones, el Fc es una variante de IgG1 que contiene al menos una sustitución de aminoácido que es N82G por la numeración de la SEQ ID NO: 226 (correspondiente a N297G por la numeración de EU). En algunas realizaciones, la región Fc variante comprende además una modificación de aminoácido C5S. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la región Fc variante comprende las siguientes modificaciones de aminoácidos: C5S y N82G.

En algunas realizaciones, el enlace covalente indirecto de un Fc a una proteína inmunomoduladora de la presente invención puede realizarse mediante, por ejemplo, un único aminoácido o mediante un enlazador peptídico (con una

longitud de dos o más residuos de aminoácidos). Además, las cadenas polipeptídicas simples de dichas moléculas de fusión Fc pueden dimerizarse a través de una variedad de medios que incluyen a través de enlaces disulfuro entre cadenas polipeptídicas. Las formas dimerizadas de las proteínas inmunomoduladoras de la invención pueden comprender dos especies idénticas o sustancialmente idénticas de polipéptidos de la invención (homodímeros), o 5 especies separadas de cadenas polipeptídicas de la invención (heterodímeros). Se apreciará que pueden existir microheterogeneidades incluso entre la misma especie de cadena polipeptídica debido a diferencias menores en los residuos amino-terminales y carboxi-terminales por diferencias menores en la expresión o proteólisis, o por diferencias resultantes de la modificación postraduccional. No obstante, se considera que dichas cadenas sustancialmente idénticas 10 son homodiméricas. Las proteínas inmunomoduladoras derivatizadas están dentro del alcance de la presente invención y a menudo se preparan para, por ejemplo, proporcionar propiedades físico-químicas o farmacocinéticas alteradas.

En realizaciones incluso más específicas, las realizaciones específicas precedentes están unidas covalentemente a un Fc, tal como un dominio de IgG1 o IgG2 humana. En una realización específica adicional, el Fc se une a una proteína inmunomoduladora a través de uno o más dominios G4S, a menudo con al menos o exactamente uno, dos, tres, cuatro o cinco residuos de alanina sucesivos unidos directamente al Fc y a la proteína inmunomoduladora.

15 En otras realizaciones, una proteína inmunomoduladora proporcionada en la presente memoria se une a una membrana liposomal. Se conocen en la técnica una variedad de métodos para unir proteínas de forma covalente o no covalente a la superficie de un liposoma, tales como conjugación de amida o conjugación de disulfuro/tioéter.

D. Actividad funcional de las proteínas inmunomoduladoras

20 En algunas realizaciones, las proteínas inmunomoduladoras que contienen un dominio de IgSF con afinidad modificada proporcionadas en la presente memoria (fragmentos de unión de longitud completa y/o específicos o construcciones apiladas o de fusión de los mismos) exhiben actividad inmunomoduladora para modular la activación de las células T. Funcionalmente, e independientemente de si la unión específica a su compañero de unión afín está aumentada o disminuida, las proteínas inmunomoduladoras proporcionadas en la presente memoria actúan para potenciar o suprimir la actividad inmunológica de los linfocitos en relación con los linfocitos bajo los controles de ensayo apropiados, tal como en un ensayo MLR. En algunas realizaciones, una proteína inmunomoduladora proporcionada en la presente memoria comprende al menos dos dominios de IgSF con afinidad modificada en donde al menos uno de los dominios de IgSF con afinidad modificada actúa para potenciar la actividad inmunológica y al menos un dominio de IgSF con afinidad modificada actúa para suprimir la actividad inmunológica.

25 En algunas realizaciones, las proteínas inmunomoduladoras proporcionadas modulan la expresión de IFN-gamma en un ensayo de células T primarias en relación con un control de dominio de IgSF de tipo salvaje o no modificado. En algunos casos, la modulación de la expresión de IFN-gamma puede aumentar o disminuir la expresión de IFN-gamma en relación con el control. Los ensayos para determinar la unión específica y la expresión de IFN-gamma son bien conocidos en la técnica e incluyen los ensayos de MLR (reacción de linfocitos mixtos) que miden los niveles de citoquinas de interferón gamma en sobrenadantes de cultivo (Wang et al., *Cancer Immunol Res.* 2014 sep; 2(9): 846-56), ensayo de estimulación 30 de células T por SEB (enterotoxina estafilocócica B) (Wang et al., *Cancer Immunol Res.* 2014 sep; 2(9): 846-56) y ensayos de estimulación de células T con anti-CD3 (Li y Kurlander, *J Transl Med.* 2010; 8: 104).

35 En algunas realizaciones, una proteína inmunomoduladora que contiene un dominio con afinidad modificada puede en algunas realizaciones aumentar o, en realizaciones alternativas, disminuir la expresión de IFN-gamma (interferón-gamma) en un ensayo de células T primarias en relación con un control de dominio de IgSF de tipo salvaje. En algunas realizaciones de los polipéptidos proporcionados que contienen un dominio de IgSF con afinidad modificada, el polipéptido puede aumentar la expresión de IFN-gamma y, en realizaciones alternativas, disminuir la expresión de IFN-gamma en un ensayo de células T primarias en relación con un control de ICOSL de tipo salvaje. En algunas realizaciones de los polipéptidos proporcionados que contienen múltiples dominios de IgSF con afinidad modificada, el polipéptido puede aumentar la expresión de IFN-gamma y, en realizaciones alternativas, disminuir la expresión de IFN-gamma en un ensayo de células T primarias en relación con un control de dominio de IgSF de tipo salvaje.

40 Los expertos reconocerán que el formato del ensayo de células T primarias usado para determinar un aumento en la expresión de IFN-gamma puede diferir del empleado para ensayar una disminución en la expresión de IFN-gamma. Al analizar la capacidad de una proteína inmunomoduladora para disminuir la expresión de IFN-gamma en un ensayo de células T primarias, se puede usar un ensayo de reacción de linfocitos mixtos (MLR) como se describe en el Ejemplo 6. En algunos casos, puede emplearse una forma soluble de la proteína inmunomoduladora para determinar la 45 capacidad del dominio de IgSF con afinidad modificada para antagonizar y de ese modo disminuir la expresión de IFN-gamma en un MLR como se describe igualmente en el Ejemplo 6.

45 Alternativamente, al analizar la capacidad de una proteína inmunomoduladora para aumentar la expresión de IFN-gamma en un ensayo de células T primarias, se puede usar un ensayo de coinmovilización como se describe en el Ejemplo 6. En un ensayo de coinmovilización, una señal de TCR, proporcionada en algunas realizaciones por el anticuerpo anti-CD3, se usa junto con una proteína inmunomoduladora coinmovilizada que contiene un dominio de IgSF con afinidad modificada para determinar la capacidad de aumentar la expresión de IFN-gamma en relación con un control de dominio de IgSF. En algunos casos, se puede emplear una forma soluble de una proteína inmunomoduladora que está multimerizada hasta el grado de proporcionar unión multivalente para determinar la

capacidad de la proteína inmunomoduladora para agonizar y, por lo tanto, aumentar la expresión de IFN-gamma en un MLR como se describe igualmente en el Ejemplo. 6.

El uso de controles apropiados es conocido por los expertos en la técnica, sin embargo, en las realizaciones mencionadas anteriormente, el control típicamente implica el uso del dominio de IgSF no modificado, tal como un tipo salvaje de isoforma de IgSF nativa de la misma especie de mamífero de la que se derivó o desarrolló el dominio de IgSF. Independientemente de si la afinidad de unión a uno o ambos compañeros de unión afines aumenta o disminuye, una proteína inmunomoduladora particular en algunas realizaciones aumentará la expresión de IFN-gamma y, en realizaciones alternativas, disminuirá la expresión de IFN-gamma en un ensayo de células T primarias en relación con un control de dominio de IgSF de tipo salvaje.

- 5 En algunas realizaciones, una proteína inmunomoduladora que contiene un dominio de IgSF con afinidad modificada aumenta la expresión de IFN-gamma (es decir, la expresión de proteína) en relación con un control de dominio de IgSF de tipo salvaje o no modificado en al menos un: 5 %, 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o más. En otras realizaciones, una proteína inmunomoduladora que contiene un dominio de IgSF con afinidad modificada, disminuye la expresión de IFN-gamma (es decir, la expresión de proteína) en relación con un control de dominio de IgSF de tipo salvaje o no modificado en al menos un: 5 %, 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o más. En algunas realizaciones, una potenciación de la actividad inmunológica puede ser un aumento de al menos un 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 75 %, 100 %, 200 %, 300 %, 400 % o 500 % mayor que un valor de control distinto de cero, tal como en un ensayo MLR. Wang et al., *Cancer Immunol Res.* 2014 sep; 2(9): 846-56. En algunas realizaciones, la supresión de la actividad inmunológica puede ser una disminución de al menos un 10 % y hasta un 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 % o 90 %.
- 10
- 15
- 20

III. Ácidos nucleicos y métodos para preparar proteínas

La presente invención proporciona ácidos nucleicos aislados o recombinantes denominados colectivamente "ácidos nucleicos de la invención" que codifican cualquiera de las diversas realizaciones de las proteínas inmunomoduladoras (Tipo I y Tipo II) de la invención. Los ácidos nucleicos de la invención, incluyendo todos los descritos a continuación, son útiles en la producción recombinante (p. ej., expresión) de polipéptidos de la invención. Los ácidos nucleicos de la invención pueden estar en forma de ARN o en forma de ADN, e incluyen ARNm, ARNc, ARN y ADN recombinantes o sintéticos y ADNc. Los ácidos nucleicos de la invención son típicamente moléculas de ADN y normalmente moléculas de ADN bicatenarias. Sin embargo, también se proporcionan ADN monocatenario, ARN monocatenario, ARN bicatenario y ácidos nucleicos híbridos ADN/ARN o combinaciones de los mismos que comprenden cualquiera de las secuencias de nucleótidos de la invención.

La presente invención también se refiere a vectores de expresión y células huésped útiles para producir las proteínas inmunomoduladoras de la presente invención. Las proteínas inmunomoduladoras de la invención se pueden preparar en células huésped transformadas usando técnicas de ADN recombinante. Para ello, se prepara una molécula de ADN recombinante que codifica una proteína inmunomoduladora. Los métodos para preparar dichas moléculas de ADN son bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, las secuencias que codifican los péptidos podrían escindirse del ADN usando enzimas de restricción adecuadas. Alternativamente, la molécula de ADN podría sintetizarse usando técnicas de síntesis química, tales como el método de la fosforamidita. Además, podría usarse una combinación de estas técnicas. En algunos casos, se puede generar un ácido nucleico recombinante o sintético mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

- 25
- 30
- 35
- 40
- 45
- 50
- 55
- 60
- La invención también incluye vectores de expresión capaces de expresar las proteínas inmunomoduladoras en una célula huésped apropiada en condiciones adecuadas para la expresión de la proteína inmunomoduladora. Un vector de expresión recombinante comprende la molécula de ADN que codifica la proteína inmunomoduladora unida operativamente a secuencias de control de la expresión apropiadas. Los métodos para efectuar esta unión operativa, ya sea antes o después de que la molécula de ADN se inserte en el vector, son bien conocidos. Las secuencias de control de la expresión incluyen promotores, activadores, potenciadores, operadores, sitios de unión ribosómica, señales de inicio, señales de parada, señales de caperuza, señales de poliadenilación y otras señales implicadas en el control de la transcripción o traducción. El vector de expresión recombinante resultante que tiene la molécula de ADN en el mismo se usa para transformar un huésped apropiado. Esta transformación se puede realizar usando métodos bien conocidos en la técnica. En algunas realizaciones, un ácido nucleico de la invención comprende además una secuencia de nucleótidos que codifica un péptido secretor o señal unido operativamente al ácido nucleico que codifica una proteína inmunomoduladora de la invención, de modo que la proteína inmunomoduladora se recupera del medio de cultivo, célula huésped o periplasma de la célula huésped.

En la práctica de esta invención se puede utilizar cualquiera de un gran número de células huésped disponibles y bien conocidas. La selección de un huésped adecuado depende de varios factores reconocidos por la técnica. Estos incluyen, por ejemplo, la compatibilidad con el vector de expresión elegido, toxicidad de los péptidos codificados por la molécula de ADN, velocidad de transformación, facilidad de recuperación de los péptidos, características de expresión, bioseguridad y costes. Debe lograrse un equilibrio de estos factores entendiendo que no todos los huéspedes pueden ser igualmente efectivos para la expresión de una secuencia de ADN en particular. Las células huésped pueden ser una variedad de células eucariotas, tales como en las células de levadura, o con células de mamíferos, tales como las células de ovario de hámster chino (CHO) o HEK293. Las células huésped también pueden

ser células procariotas, tales como con *E. coli*. El huésped transformado se cultiva en condiciones de expresión de proteínas inmunomoduladoras y luego se purifica. Las células huésped recombinantes se pueden cultivar en condiciones de fermentación convencionales de modo que se expresen las proteínas inmunomoduladoras deseadas. Dichas condiciones de fermentación son bien conocidas en la técnica. Finalmente, las proteínas inmunomoduladoras se recuperan y purifican a partir de cultivos de células recombinantes mediante cualquiera de varios métodos bien conocidos en la técnica, que incluyen precipitación con sulfato de amonio o etanol, extracción con ácido, cromatografía de intercambio aniónico o catiónico, cromatografía de fosfocelulosa, cromatografía de interacción hidrofoba y cromatografía de afinidad. Las etapas de replegamiento de las proteínas pueden usarse, según se desee, para completar la configuración de la proteína madura. Finalmente, se puede emplear cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) en las etapas finales de purificación. Las proteínas inmunomoduladoras de la presente invención también se pueden preparar mediante métodos sintéticos. La síntesis en fase sólida es la técnica preferida para preparar péptidos individuales, ya que es el método más rentable para preparar péptidos pequeños. Por ejemplo, las técnicas de síntesis en fase sólida bien conocidas incluyen el uso de grupos protectores, enlazadores y soportes de fase sólida, así como condiciones de reacción de protección y desprotección específicas, condiciones de escisión del enlazador, uso de secuestradores y otros aspectos de la síntesis de péptidos en fase sólida. A continuación, los péptidos pueden ensamblarse en las proteínas inmunomoduladoras de la presente invención.

Los medios por los que se diseñan o crean los dominios de IgSF con afinidad modificada de la invención inmunomoduladora no se limitan a ningún método en particular. En algunas realizaciones, sin embargo, los dominios de IgSF de tipo salvaje se mutagenizan (específico de sitio, aleatorio o combinaciones de los mismos) a partir de material genético de IgSF de tipo salvaje y se criban para determinar la unión alterada según los métodos descritos en los Ejemplos. Los expertos en la técnica conocen métodos de mutagenización de ácidos nucleicos. En algunas realizaciones, los dominios de IgSF con afinidad modificada se sintetizan de novo utilizando secuencias de proteínas o ácidos nucleicos disponibles en varias bases de datos disponibles públicamente y luego se criban posteriormente. El Centro Nacional de Información Biotecnológica proporciona dicha información y su sitio web es de acceso público a través de Internet, al igual que la base de datos UniProtKB, como se discutió anteriormente.

IV. Métodos de cribado o identificación de dominios de IgSF con afinidad modificada

En la presente memoria también se describe un método para identificar una proteína inmunomoduladora con afinidad modificada que es capaz de unirse a dos o más compañeros de unión afines al mismo tiempo o de una manera no competitiva. El método puede comprender: a) poner en contacto una proteína modificada que comprende al menos un dominio de la superfamilia de inmunoglobulinas (IgSF) modificado que no es inmunoglobulina o un fragmento de unión específico del mismo con al menos dos compañeros de unión afines en condiciones capaces de efectuar la unión de la proteína con al menos dos compañeros de unión afines, en donde el al menos un dominio de IgSF modificado comprende una o más sustituciones de aminoácidos en un dominio de IgSF de tipo salvaje; b) identificar una proteína modificada que comprende el dominio de IgSF modificado que tiene una unión aumentada al menos a uno de los dos compañeros de unión afines en comparación con una proteína que comprende el dominio de IgSF de tipo salvaje; y c) seleccionar una proteína modificada que comprende el dominio de IgSF modificado que se une de forma no competitiva a los al menos dos compañeros de unión afines, identificando así la proteína inmunomoduladora con afinidad modificada. La proteína con afinidad modificada que se selecciona puede ser capaz de unirse a los dos compañeros de unión afines simultáneamente al mismo tiempo. Está dentro del nivel de un experto en la técnica evaluar o determinar la presencia de interacciones de unión no competitivas de una proteína para dos ligandos diferentes más. En el Ejemplo 7 se describen ejemplos de dichos métodos.

El dominio de IgSF puede ser un dominio de IgSF que no es una inmunoglobulina. La proteína modificada o variante puede ser una en la que se hayan realizado una o más sustituciones, deletiones o inserciones de aminoácidos en el dominio de IgSF de cualquier miembro de la familia de IgSF que no es una inmunoglobulina, tal como cualquiera que se muestra en la Tabla 1. El dominio de IgSF modificado o variante o la proteína modificada que contiene el dominio de IgSF modificado o variante puede contener al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 cambios de aminoácidos, tales como sustituciones de aminoácidos.

Pueden generarse bibliotecas de proteínas modificadas o variantes mediante la mutación de uno cualquiera o más residuos de aminoácidos de una proteína que se sabe que contiene un dominio de IgSF que no es de inmunoglobulina usando cualquier método comúnmente conocido en la técnica. Cualquiera de los métodos empleados en la técnica para generar, preparar por ingeniería o diversificar una molécula de unión puede usarse para generar un dominio de IgSF modificado en la presente memoria. Los ejemplos de dichos métodos para generar, preparar por ingeniería o diversificar una molécula de unión incluyen, pero no se limitan a, los métodos descritos en las Patentes de EE. UU. No. 5.223.409; 5.571.698; 5.750.373; 5.821.047; 5.837.500; 5.733.743; 5.871.907; 5.969.108; 6.040.136; 6.172.197; 6.291.159; 6.955.877; 6.979.538; 6.831.161; 7.063.943; 7.118.879; 7.208.293; 7.332.571; 7.385.028; 7.696.312; 7.638.299; 7.888.533; 7.642.044; Solicitud de Patente de EE. UU. No. US20080300163; US20090208454; US20090155843; US20080113412; US20100035812; US20100093608; US20110015345; Por ejemplo, se puede usar una que contiene IgSF en métodos en lugar de otras moléculas de unión en métodos de diversificación o ingeniería de biomoléculas.

Los métodos para generar bibliotecas de moléculas de unión y para crear diversidad en la biblioteca son bien conocidos en la técnica y pueden emplearse para generar bibliotecas de variantes de proteínas. Los enfoques para generar diversidad incluyen enfoques dirigidos y no dirigidos bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, los enfoques

conocidos para generar bibliotecas de ácidos nucleicos y polipéptidos diversas incluyen, pero no se limitan a, PCR propensa a errores, mutagénesis en casete; extensión mutua del cebador; ligadura y extensión asistida por molde; mutagénesis de casete de codones; mutagénesis dirigida por oligonucleótidos; amplificación usando cebadores de oligonucleótidos degenerados, incluyendo la PCR de solapamiento y de dos etapas; y enfoques combinados, tales como mutagénesis combinatoria de cassetes múltiples (CMCM) y técnicas relacionadas. Un artesano experto está familiarizado con estas técnicas.

Los ejemplos de métodos para mutar una proteína para generar bibliotecas de moléculas de proteína modificadas candidatas incluyen métodos que dan como resultado mutagénesis aleatoria en toda la secuencia de la proteína o métodos que dan como resultado mutagénesis de una región o dominio seleccionado de la proteína. Las mutaciones se pueden introducir aleatoriamente, usando métodos que dan como resultado mutagénesis aleatoria de la proteína, o más sistemáticamente, usando métodos que crean específicamente un cambio de aminoácidos único o múltiple en una posición diana. Se pueden usar tanto la mutagénesis aleatoria como la mutagénesis sistemática dirigida a sitio para introducir una o más mutaciones en la proteína. La proteína variante puede albergar una o más sustituciones, inserciones o delecciones de aminoácidos en comparación con la proteína de tipo salvaje o no modificada utilizada como armazón para generar la biblioteca. Las sustituciones o inserciones pueden ser con cualquier aminoácido de origen natural o aminoácido de origen no natural.

En los métodos para identificar o generar una proteína variante o modificada que contiene un dominio de IgSF que no es de inmunoglobulina según los métodos proporcionados, una o más regiones de la proteína, tal como un dominio de IgSF o dominios de la proteína, se pueden modificar usando mutagénesis aleatoria de una región para generar una o una pluralidad de moléculas de proteína modificadas. Por ejemplo, se puede generar una biblioteca de variantes que contenga una pluralidad de moléculas modificadas que difieren cada una por al menos una delección o inserción de reemplazo de aminoácidos (es decir, sustitución) en un dominio de IgSF en comparación con una proteína de tipo salvaje o no modificada correspondiente que contiene el dominio de IgSF. La sustitución o sustituciones de aminoácidos pueden ser sustituciones de aminoácidos de origen natural o aminoácidos de origen no natural en comparación con la proteína no modificada o de tipo salvaje. Generalmente, las bibliotecas proporcionadas en la presente memoria incluyen bibliotecas que contienen al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 10², 10³, 10⁴, 2 x 10⁴, 3 x 10⁴, 4 x 10⁴, 5 x 10⁴, 6 x 10⁴, 7 x 10⁴, 8 x 10⁴, 9 x 10⁴, 10⁵, 10⁶, 10⁷, 10⁸, 10⁹ o más miembros diferentes. La biblioteca generada que contiene una pluralidad de proteínas modificadas se puede generar como una biblioteca de presentación, incluyendo una biblioteca combinatoria en la que la presentación de la variante se realiza mediante, por ejemplo, presentación en fagos, presentación en superficie celular, presentación en perlas, presentación en ribosomas u otros. Las bibliotecas se pueden usar para cribar proteínas modificadas o variantes que contienen dominios de IgSF que no son de inmunoglobulina que se unen específicamente de forma no competitiva a los al menos dos compañeros de unión afines.

Antes de seleccionar una proteína modificada que comprende el dominio de IgSF modificado que se une de forma no competitiva a los al menos dos compañeros de unión afines, el método puede incluir combinar dos o más dominios de IgSF modificados o fragmentos de unión específicos de los mismos identificados en la etapa (b) para generar una construcción de moléculas apiladas que contiene una pluralidad de diferentes dominios de IgSF modificados.

Por lo tanto, en la presente memoria también se describe un método para identificar una proteína inmunomoduladora con afinidad modificada, que comprende: a) poner en contacto una proteína modificada que comprende al menos un dominio de la superfamilia de inmunoglobulinas (IgSF) modificado que no es de inmunoglobulina o un fragmento de unión específico del mismo con al menos dos compañeros de unión afines en condiciones capaces de efectuar la unión de la proteína con los al menos dos compañeros de unión afines, en donde el al menos un dominio de IgSF modificado comprende una o más sustituciones de aminoácidos en un dominio de IgSF de tipo salvaje; b) identificar una proteína modificada que comprende el dominio de IgSF modificado que tiene una unión aumentada al menos a uno de los dos compañeros de unión afines en comparación con una proteína que comprende el dominio de IgSF de tipo salvaje; c) combinar dos o más dominios de IgSF modificados presentes en dos o más proteínas identificadas para generar una proteína de fusión (apilada) que comprende un primer dominio de IgSF modificado unido a un segundo dominio de IgSF; y d) seleccionar una proteína modificada que comprende los dominios de IgSF modificados que se une de manera no competitiva a los al menos dos compañeros de unión afines, identificando así la proteína inmunomoduladora con afinidad modificada.

Los al menos dos compañeros de unión afines pueden ser especies moleculares de la superficie celular expresadas en la superficie de una célula de mamífero. Las especies moleculares de la superficie celular pueden expresarse en configuración cis o configuración trans. La célula de mamífero puede ser una de dos células de mamífero que forman una sinapsis inmunológica (IS) y cada una de las especies moleculares de la superficie celular puede expresarse en al menos una de las dos células de mamífero que forman la IS. Al menos una de las células de mamífero puede ser un linfocito, que puede ser una célula NK o una célula T. Al menos una de las células de mamífero puede ser una célula tumoral. Al menos una de las células de mamífero puede ser una célula presentadora de antígeno.

Los dos o más compañeros de unión afines pueden ser independientemente un ligando de un miembro de IgSF seleccionado de CD80, CD86, PD-L1, PD-L2, ligando ICOS, B7-H3, B7-H4, CD28, CTLA4, PD-1, ICOS, BTLA, CD4, CD8-alfa, CD8-beta, LAG3, TIM-3, CEACAM1, TIGIT, PVR, PVRL2, CD226, CD2, CD160, CD200, CD200R o Nkp30. Los dos o más compañeros de unión afines pueden ser independientemente un ligando de un miembro de la familia B7. Los dos o más compañeros de unión afines pueden seleccionarse de dos o más de CD28, CTLA-4, ICOS o PD-L1.

V. Composiciones y formulaciones farmacéuticas

Una composición farmacéutica que comprende una composición terapéutica de la invención puede contener materiales de formulación para modificar, mantener o conservar, por ejemplo, el pH, osmolaridad, viscosidad, claridad, color, isotonicidad, olor, esterilidad, estabilidad, velocidad de disolución o liberación, adsorción, o penetración de la

5 composición. El vehículo o portador principal en una composición farmacéutica puede ser de naturaleza acuosa o no acuosa. Por ejemplo, un vehículo o portador adecuado puede ser agua para inyección o disolución salina fisiológica, posiblemente complementada con otros materiales comunes en las composiciones para administración parenteral. La disolución salina tamponada neutra o la disolución salina mezclada con albúmina de suero son vehículos ejemplares adicionales. Otras composiciones farmacéuticas ejemplares comprenden tampón Tris con un pH de aproximadamente 10 7,0-8,5, o tampón acetato con un pH de aproximadamente 4,0-5,5, que puede incluir además sorbitol o un sustituto adecuado del mismo. En una realización de la presente invención, las composiciones de agentes de unión se pueden preparar para almacenamiento mezclando la composición seleccionada que tiene el grado de pureza deseado con agentes de formulación opcionales en forma de una torta liofilizada o una disolución acuosa. Además, el producto del agente de unión se puede formular como un liofilizado usando excipientes apropiados tales como sacarosa.

15 Los componentes de la formulación están presentes en concentraciones que son aceptables para el sitio de la administración. Por ejemplo, se utilizan tampones para mantener la composición a un pH fisiológico o un pH ligeramente más bajo, típicamente dentro de un rango de pH de aproximadamente 5 a aproximadamente 8. Un vehículo particularmente adecuado para la administración parenteral es agua destilada estéril en la que se formula un agente de unión, tal como disolución isotónica estéril, debidamente conservada. Otra preparación más puede implicar 20 la formulación de la molécula deseada con un agente, tal como microesferas inyectables, partículas bio-erosionables, compuestos poliméricos (ácido poliláctico, ácido poliglicólico), perlas o liposomas, que proporcionan la liberación controlada o sostenida del producto que puede administrarse entonces mediante una inyección de depósito.

25 En otro aspecto, las formulaciones farmacéuticas adecuadas para la administración parenteral pueden formularse en disoluciones acuosas, preferiblemente en tampones fisiológicamente compatibles tales como disolución de Hanks, disolución de Ringer o disolución salina tamponada fisiológicamente. Las suspensiones inyectables acuosas pueden 30 contener sustancias que aumentan la viscosidad de la suspensión, tales como carboximetilcelulosa de sodio, sorbitol o dextrano. Las composiciones farmacéuticas adicionales serán evidentes para los expertos en la técnica, incluyendo las formulaciones que implican moléculas del agente de unión en formulaciones de liberación sostenida o controlada. Los expertos en la técnica también conocen técnicas para formular una variedad de otros medios de administración 35 sostenida o controlada, tales como vehículos liposomales, micropartículas bio-erosionables o perlas porosas e inyecciones de depósito. La composición farmacéutica que se utilizará para la administración in vivo normalmente debe ser estéril. Esto se puede lograr mediante filtración a través de membranas de filtración estériles. Cuando la composición se liofiliza, la esterilización usando este método puede realizarse antes o después de la liofilización y reconstitución. La composición para la administración parenteral puede almacenarse en forma liofilizada o en 40 disolución. Además, las composiciones parenterales generalmente se ponen en un contenedor que tiene un puerto de acceso estéril, por ejemplo, una bolsa de disolución intravenosa o un vial que tiene un tapón perforable por una aguja de inyección hipodérmica.

45 En algunas realizaciones, la composición farmacéutica es estéril. La esterilización se puede lograr mediante filtración a través de membranas de filtración estériles o radiación. Cuando la composición se liofiliza, la esterilización usando este método puede realizarse antes o después de la liofilización y reconstitución. La composición para la administración parenteral puede almacenarse en forma liofilizada o en disolución. Además, las composiciones parenterales generalmente se ponen en un contenedor que tiene un puerto de acceso estéril, por ejemplo, una bolsa de disolución intravenosa o un vial que tiene un tapón perforable por una aguja de inyección hipodérmica.

50 Una vez formulada la composición farmacéutica, puede almacenarse en viales estériles como una disolución, suspensión, gel, emulsión, sólido o polvo deshidratado o liofilizado. Dichas formulaciones pueden almacenarse en una forma lista para usar o en una forma (p. ej., liofilizada) que requiera la reconstitución antes de la administración. Una cantidad eficaz de una composición farmacéutica que se va a emplear terapéuticamente dependerá, por ejemplo, del contexto y los objetivos terapéuticos. Un experto en la técnica apreciará que los niveles de dosificación apropiados para el tratamiento variarán, por lo tanto, dependiendo, en parte, de la molécula administrada, la indicación para la cual se está usando la molécula del agente de unión, la vía de administración y el tamaño (peso corporal, superficie corporal o tamaño de los órganos) y el estado (la edad y la salud general) del paciente. Por consiguiente, el médico puede titular la dosificación y modificar la vía de administración para obtener el efecto terapéutico óptimo. La composición terapéutica de la invención se puede administrar por vía parenteral, subcutánea o intravenosa, o como 55 se describe en otra parte de la presente memoria. La composición terapéutica de la invención puede administrarse en una cantidad terapéuticamente eficaz una, dos, tres o cuatro veces al mes, dos veces a la semana, quincenalmente (cada dos semanas) o cada dos meses (cada dos meses). La administración puede durar un período de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12 meses o más (p. ej., uno, dos, tres, cuatro o más años, incluso durante toda la vida del sujeto).

60 Generalmente, las dosificaciones y vías de administración de la composición farmacéutica se determinan según el tamaño y la condición del sujeto, según la práctica farmacéutica estándar. Por ejemplo, la dosis terapéuticamente eficaz se puede estimar inicialmente en ensayos de cultivo celular o en modelos animales tales como ratones, ratas, conejos, perros, cerdos o monos. También se puede utilizar un modelo animal para determinar el rango de

concentración y la vía de administración apropiados. Dicha información puede usarse entonces para determinar dosis y vías útiles para la administración en seres humanos. La dosificación exacta se determinará a la luz de factores relacionados con el sujeto que requiere tratamiento. La dosificación y la administración se ajustan para proporcionar niveles suficientes del compuesto activo o para mantener el efecto deseado. Los factores que se pueden tener en cuenta incluyen la gravedad del estado de la enfermedad, la salud general del sujeto, la edad, el peso y el sexo del sujeto, el tiempo y la frecuencia de la administración, la o las combinaciones de fármacos, las sensibilidades de reacción y la respuesta a la terapia.

5 En algunas realizaciones, la composición farmacéutica se administra a un sujeto a través de cualquier vía, incluyendo por vía oral, transdérmica, por inhalación, por vía intravenosa, intraarterial, intramuscular, aplicación directa a un sitio de herida, aplicación a un sitio quirúrgico, por vía intraperitoneal, por suppositorio, por vía subcutánea, intradérmica, transcutánea, por nebulización, por vía intrapleural, intraventricular, intraarticular, intraocular o intraespinal.

10 En algunas realizaciones, la dosificación de la composición farmacéutica es una dosis única o una dosis repetida. En algunas realizaciones, las dosis se proporcionan a un sujeto una vez al día, dos veces al día, tres veces al día o cuatro o más veces al día. En algunas realizaciones, se proporcionan aproximadamente 1 o más (tal como aproximadamente 15 2 o más, aproximadamente 3 o más, aproximadamente 4 o más, aproximadamente 5 o más, aproximadamente 6 o más, o aproximadamente 7 o más) dosis en una semana. En algunas realizaciones, se proporcionan múltiples dosis en el transcurso de días, semanas, meses o años. En algunas realizaciones, un curso de tratamiento es aproximadamente 1 o más dosis (tal como aproximadamente 2 o más dosis, aproximadamente 3 o más dosis, 20 aproximadamente 4 o más dosis, aproximadamente 5 o más dosis, aproximadamente 7 o más dosis, aproximadamente 10 o más dosis, aproximadamente 15 o más dosis, aproximadamente 25 o más dosis, aproximadamente 40 o más dosis, aproximadamente 50 o más dosis, o aproximadamente 100 o más dosis).

25 En algunas realizaciones, una dosis administrada de la composición farmacéutica es aproximadamente 1 µg de proteína por kg de masa corporal del sujeto o más (tal como aproximadamente 2 µg de proteína por kg de masa corporal del sujeto o más, aproximadamente 5 µg de proteína por kg de masa corporal del sujeto o más, aproximadamente 10 µg de proteína por kg de masa corporal del sujeto o más, aproximadamente 25 µg de proteína por kg de masa corporal del sujeto o más, aproximadamente 50 µg de proteína por kg de masa corporal del sujeto o más, 30 aproximadamente 100 µg de proteína por kg de masa corporal del sujeto o más, aproximadamente 250 µg de proteína por kg de masa corporal del sujeto o más, aproximadamente 500 µg de proteína por kg de masa corporal del sujeto o más, aproximadamente 1 mg de proteína por kg de masa corporal del sujeto o más, aproximadamente 2 mg de proteína por kg de masa corporal del sujeto o más, o aproximadamente 5 mg de proteína por kg de masa corporal del sujeto o más).

35 Para cualquier compuesto, la dosis terapéuticamente eficaz puede estimarse inicialmente en ensayos de cultivo celular o en modelos animales tales como ratones, ratas, conejos, perros, cerdos o monos. También se puede utilizar un modelo animal para determinar el rango de concentración y la vía de administración apropiados. Dicha información puede usarse entonces para determinar dosis y vías útiles para la administración en seres humanos. La dosificación exacta se determinará a la luz de factores relacionados con el sujeto que requiere tratamiento. La dosificación y la administración se ajustan para proporcionar niveles suficientes del compuesto activo o para mantener el efecto deseado. Los factores que pueden tenerse en cuenta incluyen la gravedad del estado de la enfermedad, la salud general del sujeto, la edad, el peso y el sexo del sujeto, el tiempo y la frecuencia de la administración, la o las combinaciones de fármacos, las sensibilidades de reacción y la respuesta a la terapia. Las composiciones farmacéuticas de acción prolongada se pueden administrar cada 3 a 4 días, cada semana o cada dos semanas, dependiendo de la semivida y la tasa de aclaramiento de la formulación particular. La frecuencia de la dosificación dependerá de los parámetros farmacocinéticos de la molécula en la formulación usada. Normalmente, una composición se administra hasta que se alcanza una dosificación que logra el efecto deseado. Por tanto, la 40 composición puede administrarse como una dosis única, o como dosis múltiples (a la misma o diferentes concentraciones/dosificaciones) a lo largo del tiempo, o como una infusión continua. De forma rutinaria se realiza un mayor refinamiento de la dosificación apropiada. Las dosificaciones apropiadas pueden determinarse mediante el uso de datos de respuesta a la dosis apropiados.

45

50 En algunas realizaciones, se pueden monitorizar uno o más biomarcadores o marcadores fisiológicos para el efecto terapéutico, incluyendo la activación o proliferación de las células T, la síntesis o producción de citoquinas (p. ej., producción de TNF- α , IFN- γ , IL-2), inducción de diversos marcadores de activación (p. ej., CD25, receptor de IL-2), inflamación, hinchazón o sensibilidad articular, nivel sérico de proteína C reactiva, producción de anticuerpos anti-cárgeno y/o respuesta(s) de anticuerpos dependientes de células T.

55 Una composición farmacéutica inyectable que comprende un excipiente o vehículo farmacéuticamente aceptable adecuado (p. ej., PBS) y una cantidad eficaz de una composición terapéutica de la invención puede administrarse por vía parenteral, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa, subdérmica, transdérmica, subcutánea o intradérmica a un paciente mamífero. La administración puede facilitarse mediante liposomas. Generalmente, la piel y el músculo son dianas preferidas para la administración de la composición terapéutica de la invención, mediante cualquier técnica adecuada. Por tanto, la administración de la composición terapéutica de la invención en o a través de la piel de un 60 sujeto mamífero (p. ej., un ser humano), es una característica de la invención. Dichas moléculas de la invención se pueden administrar en una disolución inyectable farmacéuticamente aceptable en o a través de la piel, p. ej., por vía

intramuscular o intraperitoneal. La administración también puede realizarse mediante dispositivos transdérmicos o, más típicamente, administración biológica de la composición terapéutica de la invención en, o a través de la piel del sujeto o en el músculo expuesto del sujeto mamífero.

- 5 Se conocen diversos medios para determinar si la administración de una composición terapéutica de la invención modula suficientemente la actividad inmunológica eliminando, secuestrando o inactivando las células inmunes que median o son capaces de mediar una respuesta inmune no deseada; inducir, generar o ajustar activar células inmunes que median o son capaces de mediar una respuesta inmune protectora; cambiar las propiedades físicas o funcionales de las células inmunes; o una combinación de estos efectos. Los ejemplos de mediciones de la modulación de la actividad inmunológica incluyen, pero no se limitan a, examen de la presencia o ausencia de poblaciones de células inmunes (usando citometría de flujo, inmunohistoquímica, histología, microscopía electrónica, reacción en cadena de la polimerasa (PCR)); medición de la capacidad funcional de las células inmunes, incluyendo la capacidad o resistencia para proliferar o dividirse en respuesta a una señal (tal como el uso de ensayos de proliferación de células T y análisis de pepscan basado en la incorporación de ^{3}H -timidina después de la estimulación con anticuerpo anti-CD3, anticuerpo anti-receptor de células T, anticuerpo anti-CD28, ionóforos de calcio, PMA, células presentadoras de antígeno 10 cargadas con un antígeno peptídico o proteico; ensayos de proliferación de células B); medición de la capacidad para matar o lisar otras células (tal como ensayos de células T citotóxicas); mediciones de las citoquinas, quimioquinas, moléculas de la superficie celular, anticuerpos y otros productos de las células (p. ej., mediante citometría de flujo, ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzimas, análisis de transferencia Western, análisis de micromatrizes de proteínas, análisis de inmunoprecipitación); medición de marcadores bioquímicos de activación de células inmunes o 15 vías de señalización dentro de las células inmunes (p. ej., análisis de inmunoprecipitación y transferencia Western de fosforilación de tirosina, serina o treonina, escisión de polipéptidos y formación o disociación de complejos de proteínas; análisis de matrices de proteínas; transcripción de ADN, perfil utilizando matrices de ADN o hibridación sustractiva); mediciones de muerte celular por apoptosis, necrosis u otros mecanismos (p. ej., tinción de anexina V, 20 ensayos TUNEL, electroforesis en gel para medir la formación de escaleras de ADN, histología; ensayos de caspasa 25 fluorogénicos, análisis de transferencia Western de sustratos de caspasa); medición de los genes, proteínas y otras moléculas producidas por las células inmunes (p. ej., análisis de transferencia Northern, reacción en cadena de la polimerasa, micromatrizes de ADN, micromatrizes de proteínas, electroforesis en gel bidimensional, análisis de transferencia Western, ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzimas, citometría de flujo); y medición de síntomas o 30 resultados clínicos tales como la mejora de enfermedades autoinmunes, neurodegenerativas y otras que implican proteínas o polipéptidos propios (puntuaciones clínicas, requisitos para el uso de terapias adicionales, estado funcional, estudios de imágenes) por ejemplo, midiendo la tasa de recidiva o gravedad de la enfermedad (utilizando puntuaciones clínicas conocidas por el experto en la técnica) en el caso de esclerosis múltiple, medición de glucosa en sangre en el caso de diabetes de tipo I o inflamación articular en el caso de artritis reumatoide.

35 En la presente memoria también se describen artículos de fabricación que comprenden las composiciones farmacéuticas descritas en la presente memoria en envases adecuados. Los envases adecuados para las composiciones (tales como las composiciones oftálmicas) descritas en la presente memoria son conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, viales (tales como viales sellados), recipientes, ampollas, botellas, frascos, envases flexibles (p. ej., bolsas Mylar selladas o de plástico), y similares. Estos artículos de fabricación se pueden esterilizar y/o sellar adicionalmente.

40 Se describen además kits que comprenden las composiciones farmacéuticas (o artículos de fabricación) descritas en la presente memoria, que pueden comprender además instrucciones sobre los métodos de uso de la composición, tales como los usos descritos en la presente memoria. Los kits descritos en la presente memoria también pueden incluir otros materiales deseables desde un punto de vista comercial y de usuario, incluyendo otros tampones, diluyentes, filtros, agujas, jeringas y prospectos con instrucciones para llevar a cabo cualquier método descrito en la 45 presente memoria.

VI. Aplicaciones terapéuticas

50 Se cree que las proteínas inmunomoduladoras de la invención tienen utilidad en una variedad de aplicaciones, que incluyen, pero no están limitadas a, métodos profilácticos o terapéuticos (colectivamente, una "composición terapéutica de la invención") para tratar una variedad de enfermedades del sistema inmune o afecciones en un mamífero en las 55 que la modulación o regulación del sistema inmune y las respuestas del sistema inmune es beneficiosa. Por ejemplo, la supresión de una respuesta inmune puede ser beneficiosa en métodos profilácticos y/o terapéuticos para inhibir el rechazo de un trasplante de tejido, célula u órgano de un donante por parte de un receptor. En un contexto terapéutico, el sujeto mamífero es típicamente uno con una enfermedad o afección del sistema inmune, y la administración se realiza para prevenir la progresión adicional de la enfermedad o afección. Por ejemplo, la administración de una 60 composición terapéutica de la invención a un sujeto que padece una enfermedad del sistema inmune (p. ej., una enfermedad autoinmune) puede dar lugar a la supresión o inhibición de dicho ataque del sistema inmune o respuestas biológicas asociadas con el mismo. Al suprimir este ataque del sistema inmune a los tejidos sanos del cuerpo, los síntomas físicos resultantes (p. ej., dolor, inflamación de las articulaciones, hinchazón o sensibilidad de las articulaciones) resultantes o asociados con dicho ataque a los tejidos sanos pueden disminuirse o aliviarse y el daño biológico y físico que se produce por o está asociado con el ataque del sistema inmune puede disminuirse, retrasarse o detenerse. En un contexto profiláctico, el sujeto puede tener, ser susceptible o creer que presenta una enfermedad, trastorno o afección del sistema inmune, y la administración se realiza típicamente para prevenir la progresión de la enfermedad, trastorno o

afección, inhibir o aliviar los síntomas, signos, o las respuestas biológicas asociadas con los mismos, prevenir el daño corporal que pueda producirse por ellos y/o mantener o mejorar el funcionamiento físico del sujeto.

- 5 La enfermedad o trastorno del sistema inmune del paciente puede ser o implicar, p. ej., pero no se limita a, enfermedad de Addison, alergia, alopecia areata, de Alzheimer, vasculitis asociada a anticuerpos anticitoplasma de neutrófilos (ANCA), espondilitis anquilosante, síndrome antifosfolípido (síndrome de Hughes), artritis, asma, aterosclerosis, placa aterosclerótica, enfermedad autoinmune (p. ej., lupus, AR, EM, enfermedad de Graves, etc.), anemia hemolítica autoinmune, hepatitis autoinmune, enfermedad del oído interno autoinmune, síndrome linfoproliferativo autoinmune, miocarditis autoinmune, ooforitis autoinmune, orquitis autoinmune, azoospermia, enfermedad de Behcet, enfermedad de Berger, penfigoide ampolloso, miocardiopatía, enfermedad cardiovascular, celiaquía/enfermedad celíaca, síndrome de disfunción inmune por fatiga crónica (CFIDS), polineuritis idiopática crónica, polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica, polineuropatía recidivante crónica (síndrome de Guillain-Barré), síndrome de Churg-Strauss (CSS), penfigoide cicatricial, enfermedad de las aglutininas frías (CAD), EPOC, síndrome de CREST, enfermedad de Crohn, dermatitis, herpetiformis, dermatomiositis, diabetes, lupus discoide, eccema, epidermólisis ampollosa adquirida, crioglobulinemia esencial mixta, síndrome de Evan, exoftalmos, fibromialgia, síndrome de Goodpasture, enfermedad o trastorno relacionado con injerto, enfermedad de Graves, EICH, tiroiditis de Hashimoto, fibrosis pulmonar idiopática, púrpura trombocitopénica idiopática (PTI), nefropatía por IgA, enfermedad o trastorno inmunoproliferativo (p. ej., psoriasis), enfermedad inflamatoria intestinal (EI), diabetes mellitus dependiente de insulina (IDDM), enfermedad pulmonar intersticial, diabetes juvenil, artritis juvenil, artritis idiopática juvenil (AIJ), enfermedad de Kawasaki, síndrome miasténico de Lambert-Eaton, liquen plano, lupus, nefritis lúpica, linfosititis linfocítica, enfermedad de Ménière, síndrome de Miller Fish/encefalomielorradiculopatía diseminada aguda, enfermedad mixta del tejido conectivo, esclerosis múltiple (EM), reumatismo muscular, encefalomielitis miálgica (ME), miastenia grave, inflamación ocular, pénfigo foliáceo, pénfigo vulgar, anemia perniciosa, poliarteritis nudosa, policondritis, síndromes poliglandulares (síndrome de Whitaker), polimialgia reumática, polimiositis, agammaglobulinemia primaria, cirrosis biliar primaria/colangiopatía autoinmune, psoriasis, artritis psoriásica, fenómeno de Raynaud, síndrome de Reiter/artritis reactiva, restenosis, fiebre reumática, enfermedad reumática, artritis reumatoide, sarcoidosis, síndrome de Schmidt, esclerodermia, síndrome de Sjögren, rechazo de trasplante de órganos sólidos (riñón, corazón, hígado, pulmón, etc.), síndrome del hombre rígido, lupus eritematoso sistémico (LES), escleroderma sistémico, arteritis de Takayasu, arteritis temporal/arteritis de células gigantes, tiroiditis, diabetes tipo 1, diabetes tipo 2, colitis ulcerosa, uveítis, vasculitis, vitíligo, granulomatosis de Wegener y prevenir o suprimir una respuesta inmune asociada con el rechazo de un tejido, célula, injerto u órgano de un donante por un sujeto receptor. Las enfermedades o trastornos relacionados con injertos incluyen la enfermedad de injerto contra huésped (GVDH), tal como la asociada con el trasplante de médula ósea, y los trastornos inmunes que se producen por o están asociados con el rechazo del trasplante de injerto de órganos, tejidos o células (p. ej., aloanjertos o xenoinjertos de tejidos o células), incluyendo, p. ej., injertos de piel, músculo, neuronas, islotes, órganos, células parenquimatosas del hígado, etc. Con respecto a un trasplante de tejido, célula, injerto u órgano sólido de un donante en un sujeto receptor, se cree que una composición terapéutica de la invención descrita en la presente memoria puede ser eficaz para prevenir el rechazo agudo de dicho trasplante en el receptor y/o para la terapia de mantenimiento a largo plazo para prevenir el rechazo de dicho trasplante en el receptor (p. ej., inhibiendo el rechazo del trasplante de células de los islotes productores de insulina de un donante en el sujeto receptor que padece diabetes).
- 10 40 Una composición terapéutica de la invención también se puede usar para inhibir el crecimiento de células cancerosas de mamíferos, particularmente humanas, como monoterapia (es decir, como un solo agente), en combinación con al menos un agente quimioterapéutico (es decir, una terapia de combinación), en combinación con una vacuna contra el cáncer, en combinación con un inhibidor de puntos de control inmunes y/o en combinación con radioterapia. En algunos aspectos de la presente descripción, el inhibidor de puntos de control inmunes es nivolumab, tremelimumab, pembrolizumab, ipilimumab o similares. Se administra una cantidad eficaz de una composición terapéutica para inhibir, detener o revertir la progresión de cánceres que son sensibles a la modulación de la actividad inmunológica por las proteínas inmunomoduladoras de la presente invención. Las células cancerosas humanas pueden tratarse *in vivo* o *ex vivo*. En el tratamiento *ex vivo* de un paciente humano, el tejido o los fluidos que contienen células cancerosas se tratan fuera del cuerpo y luego el tejido o los fluidos se reintroducen de nuevo en el paciente. En algunas realizaciones, el cáncer se trata en un paciente humano *in vivo* mediante la administración de la composición terapéutica al paciente. Por tanto, la presente invención proporciona métodos *ex vivo* e *in vivo* para inhibir, detener o revertir la progresión del tumor, o producir de otra manera un aumento estadísticamente significativo de la supervivencia libre de progresión (es decir, el período de tiempo durante y después del tratamiento en el que un paciente vive con un cáncer que no empeora), o supervivencia global (también llamada "tasa de supervivencia"; es decir, el porcentaje de personas en un grupo de estudio o tratamiento que están vivas durante un cierto período de tiempo después de que se les diagnosticó con o se les trató para el cáncer) en relación con el tratamiento con un control. Los cánceres que pueden tratarse mediante los métodos de la invención incluyen, pero no se limitan a, melanoma, cáncer de vejiga, malignidades hematológicas (leucemia, linfoma, mieloma), cáncer de hígado, cáncer de cerebro, cáncer renal, cáncer de mama, cáncer de páncreas (*adenocarcinoma*), cáncer colorrectal, cáncer de pulmón (cáncer de pulmón de células pequeñas y cáncer de pulmón de células no pequeñas), cáncer de bazo, cáncer de timo o células sanguíneas (es decir, leucemia), cáncer de próstata, cáncer testicular, cáncer de ovario, cáncer de uterino, carcinoma gástrico o sarcoma de Ewing.
- 15 45 50 55 60

VII. Realizaciones ejemplares

Entre las enseñanzas de la presente memoria se proporcionan realizaciones, que incluyen realizaciones con fines de

antecedentes:

Realización 1. Según la invención reivindicada, se proporciona una proteína inmunomoduladora, que comprende al menos un dominio de la superfamilia de inmunoglobulinas (IgSF) con afinidad modificada que no es de una inmunoglobulina que comprende una o más sustituciones de aminoácidos en un dominio de IgSF de tipo salvaje, en donde: el al menos un dominio de IgSF con afinidad modificada tiene una unión aumentada al menos a dos compañeros de unión afines en comparación con el dominio de IgSF de tipo salvaje; y el al menos un dominio de IgSF con afinidad modificada se une específicamente de forma no competitiva a los al menos dos compañeros de unión afines.

Realización 2. En algunas realizaciones adicionales de la realización 1, los al menos dos compañeros de unión afines son especies moleculares de la superficie celular expresadas en la superficie de una célula de mamífero.

Realización 3. En algunas realizaciones adicionales de la realización 2, las especies moleculares de la superficie celular se expresan en configuración cis o configuración trans.

Realización 4. En algunas realizaciones adicionales de la realización 2 o la realización 3, la célula de mamífero es una de las dos células de mamífero que forman una sinapsis inmunológica (IS) y cada una de las especies moleculares de la superficie celular se expresa en al menos una de las dos células de mamífero que forman la IS.

Realización 5. En algunas realizaciones adicionales de una cualquiera de las realizaciones 2-4, al menos una de las células de mamífero es un linfocito.

Realización 6. En algunas realizaciones adicionales de la realización 5, el linfocito es una célula NK o una célula T.

Realización 7. En algunas realizaciones adicionales de una cualquiera de las realizaciones 5-6, la unión del dominio de IgSF con afinidad modificada modula la actividad inmunológica del linfocito.

Realización 8. En algunas realizaciones adicionales de la realización 7, la proteína inmunomoduladora es capaz de efectuar una actividad inmunológica incrementada en comparación con la proteína de tipo salvaje que comprende el dominio de IgSF de tipo salvaje.

Realización 9. En algunas realizaciones adicionales de la realización 7, la proteína inmunomoduladora es capaz de efectuar una actividad inmunológica disminuida en comparación con la proteína de tipo salvaje que comprende el dominio de IgSF de tipo salvaje.

Realización 10. En algunas realizaciones adicionales de una cualquiera de las realizaciones 2-9, al menos una de las células de mamífero es una célula tumoral.

Realización 11. En algunas realizaciones adicionales de una cualquiera de las realizaciones 2-10, las células de mamífero son células humanas.

Realización 12. En algunas realizaciones adicionales de una cualquiera de las realizaciones 4-11, el dominio de IgSF con afinidad modificada es capaz de unirse específicamente a las dos células de mamífero que forman la IS.

Realización 13. En algunas realizaciones adicionales de una cualquiera de las realizaciones 1-12, el dominio de IgSF de tipo salvaje es de un miembro de la familia de IgSF de una familia seleccionada de la familia de proteínas reguladoras de señales (SIRP), familia semejante al receptor de activación expresado en células mieloídes (TREML), familia de moléculas de adhesión celular relacionadas con antígenos carcinoembrionarios (CEACAM), familia de lectinas similares a Ig de unión a ácido siálico (SIGLEC), familia de butirofilinas, familia B7, familia CD28, familia que contiene dominios de conjunto V y de inmunoglobulina (VSIG), familia de dominios de conjunto V transmembrana (VSTM), familia de complejos mayores de histocompatibilidad (MHC), familia de moléculas de activación linfocítica de señalización (SLAM), receptor semejante a inmunoglobulina leucocitaria (LIR), familia de nectina (Nec), familia semejante a nectina (NECL), familia relacionada con el receptor de poliovirus (PVR), familia de receptores desencadenantes de citotoxicidad natural (NCR), familia de inmunoglobulina y mucina de células T (TIM) o familia de receptores semejantes a inmunoglobulina de células asesinas (KIR).

Realización 14. Según la invención reivindicada, el dominio de IgSF de tipo salvaje de una cualquiera de las realizaciones 1-13 es de un miembro de IgSF seleccionado de CD80.

Realización 15. En algunas realizaciones adicionales de una cualquiera de las realizaciones 1-14, el dominio de IgSF de tipo salvaje es un miembro de IgSF humano.

Realización 16. En algunas realizaciones adicionales de una cualquiera de las realizaciones 1-15, el dominio de IgSF de tipo salvaje es un dominio IgV, un dominio IgC1, un dominio IgC2 o un fragmento de unión específico del mismo.

Realización 17. En algunas realizaciones adicionales de una cualquiera de las realizaciones 1-16, el dominio de IgSF con afinidad modificada es un dominio IgV con afinidad modificada, un dominio IgC1 con afinidad modificada o un dominio IgC2 con afinidad modificada o es un fragmento de unión específico del mismo que comprende una o más sustituciones de aminoácidos.

- Realización 18. En algunas realizaciones adicionales de una cualquiera de las realizaciones 1-17, la proteína inmunomoduladora comprende al menos dos dominios de IgSF con afinidad modificada que no son de inmunoglobulina.
- 5 Realización 19. En algunas realizaciones adicionales de la realización 18, los al menos dos dominios de IgSF con afinidad modificada que no son de inmunoglobulina comprenden cada uno una o más sustituciones de aminoácidos diferentes en el mismo dominio de IgSF de tipo salvaje.
- Realización 20. En algunas realizaciones adicionales de la realización 19, los al menos dos dominios de IgSF con afinidad modificada que no son de inmunoglobulina comprenden cada uno una o más sustituciones de aminoácidos en diferentes dominios de IgSF de tipo salvaje.
- 10 Realización 21. En algunas realizaciones adicionales de la realización 20, los diferentes dominios de IgSF de tipo salvaje son de diferentes miembros de la familia de IgSF.
- Realización 22. En algunas realizaciones adicionales de una cualquiera de las realizaciones 1-17, la proteína inmunomoduladora comprende solo un dominio de IgSF con afinidad modificada que no es de inmunoglobulina.
- 15 Realización 23. Según la invención reivindicada, la IgSF con afinidad modificada de una cualquiera de las realizaciones 1-22 comprende al menos un 85 % de identidad de secuencia con un dominio de IgSF de tipo salvaje o un fragmento de unión específico del mismo contenido en la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 1.
- Realización 24. En algunas realizaciones adicionales de la realización 23, la proteína inmunomoduladora comprende además una segunda IgSF con afinidad modificada, en donde el segundo dominio de IgSF con afinidad modificada comprende al menos un 85 % de identidad de secuencia con un dominio de IgSF de tipo salvaje o un fragmento de unión específico del mismo contenido en la secuencia de aminoácidos mostrada en cualquiera de las SEQ ID NO: 1-27.
- 20 Realización 25. Según la invención reivindicada, el dominio de IgSF de tipo salvaje de una cualquiera de las realizaciones 1-24 es un miembro de la familia B7.
- Realización 26. Según la invención reivindicada, el dominio de IgSF de tipo salvaje de una cualquiera de las realizaciones 1-25 es un dominio de CD80.
- 25 Realización 27. Según la invención reivindicada, el dominio de IgSF de tipo salvaje de una cualquiera de las realizaciones 1-26 es un dominio de CD80.
- Realización 28. Según la invención reivindicada, se proporciona una proteína inmunomoduladora, que comprende al menos un dominio de la superfamilia de inmunoglobulinas (IgSF) CD80 con afinidad modificada que comprende una o más sustituciones de aminoácidos en un dominio de IgSF CD80 de tipo salvaje, en donde el al menos un dominio de IgSF de CD80 con afinidad modificada tiene una unión aumentada al menos a dos compañeros de unión afines en comparación con el dominio de IgSF de CD80 de tipo salvaje.
- 30 Realización 29. Según la invención reivindicada, los compañeros de unión afines de la realización 27 o la realización 28 son CD28.
- Realización 30. En algunas realizaciones adicionales de una cualquiera de las realizaciones 27-29, el dominio de IgSF de tipo salvaje es un dominio IgV y/o el dominio de CD80 con afinidad modificada es un dominio IgV con afinidad modificada.
- 35 Realización 31. Según la invención reivindicada, el dominio con afinidad modificada de una cualquiera de las realizaciones 27-30 comprende al menos un 85 % de identidad de secuencia con un dominio de CD80 de tipo salvaje o un fragmento de unión específico del mismo contenido en la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 1.
- 40 Realización 32. En algunas realizaciones adicionales de una cualquiera de las realizaciones 1-31, el al menos un dominio de IgSF con afinidad modificada comprende al menos 1 y no más de veinte sustituciones de aminoácidos en el dominio de IgSF de tipo salvaje.
- Realización 33. En algunas realizaciones adicionales de una cualquiera de las realizaciones 1-32, el al menos un dominio de IgSF con afinidad modificada comprende al menos 1 y no más de diez sustituciones de aminoácidos en el dominio de IgSF de tipo salvaje.
- 45 Realización 34. En algunas realizaciones adicionales de una cualquiera de las realizaciones 1-33, el al menos un dominio de IgSF con afinidad modificada comprende al menos 1 y no más de cinco sustituciones de aminoácidos en el dominio de IgSF de tipo salvaje.
- Realización 35. En algunas realizaciones adicionales de una cualquiera de las realizaciones 1-34, el dominio de IgSF con afinidad modificada tiene al menos un 120 % de la afinidad de unión como su dominio de IgSF de tipo salvaje para cada uno de los al menos dos compañeros de unión afines.

- Realización 36. En algunas realizaciones adicionales de una cualquiera de las realizaciones 1-35, la proteína inmunomoduladora comprende además un dominio de IgSF sin afinidad modificada.
- Realización 37. En algunas realizaciones adicionales de una cualquiera de las realizaciones 1-36, la proteína inmunomoduladora es soluble.
- 5 Realización 38. En algunas realizaciones adicionales de una cualquiera de las realizaciones 1-37, la proteína inmunomoduladora carece de un dominio transmembrana o un dominio citoplásmico.
- Realización 39. En algunas realizaciones adicionales de una cualquiera de las realizaciones 1-38, la proteína inmunomoduladora comprende solo el dominio extracelular (ECD) o un fragmento de unión específico del mismo que comprende el dominio de IgSF con afinidad modificada.
- 10 Realización 40. En algunas realizaciones adicionales de una cualquiera de las realizaciones 1-39, la proteína inmunomoduladora está glicosilada o pegilada.
- Realización 41. En algunas realizaciones adicionales de una cualquiera de las realizaciones 1-40, la proteína inmunomoduladora está unida a un dominio de multimerización.
- Realización 42. En algunas realizaciones adicionales de una cualquiera de las realizaciones 1-41, la proteína inmunomoduladora está unida a un dominio Fc o una variante del mismo con función efectora reducida.
- 15 20 Realización 43. En algunas realizaciones adicionales de la realización 42, el dominio Fc es un dominio de IgG1, un dominio de IgG2 o es una variante del mismo con función efectora reducida.
- Realización 44. En algunas realizaciones adicionales de una cualquiera de las realizaciones 39-41, el dominio Fc es de mamífero, opcionalmente humano; o el dominio Fc variante comprende una o más modificaciones de aminoácidos en comparación con un dominio Fc no modificado que es de mamífero, opcionalmente humano.
- Realización 45. En algunas realizaciones adicionales de una cualquiera de las realizaciones 42-44, el dominio Fc o variante del mismo comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 226 o SEQ ID NO: 227 o una secuencia de aminoácidos que exhibe al menos un 85 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 226 o SEQ ID NO: 227.
- 25 Realización 46. En algunas realizaciones adicionales de una cualquiera de las realizaciones 38-41, la proteína inmunomoduladora está unida indirectamente mediante un enlazador.
- Realización 47. En algunas realizaciones adicionales de una cualquiera de las realizaciones 41-46, la proteína inmunomoduladora es un dímero.
- Realización 48. En algunas realizaciones adicionales de una cualquiera de las realizaciones 1-47, la proteína inmunomoduladora está unida a una membrana liposomal.
- 30 35 Realización 49. En la presente memoria también se describe una proteína inmunomoduladora, que comprende al menos dos dominios de la super familia de inmunoglobulinas (IgSF) que no son de inmunoglobulina, en donde: al menos uno de los dominios de IgSF modificados que no son de inmunoglobulina tiene una afinidad modificada para exhibir una unión alterada a su compañero de unión afín; y cada uno de los al menos dos dominios de IgSF modificados que no son de inmunoglobulina se une específicamente de forma independiente al menos a un compañero de unión afín diferente.
- Realización 50. En algunas realizaciones adicionales de la realización 49, cada uno de los al menos dos dominios de IgSF que no son de inmunoglobulina son dominios de IgSF con afinidad modificada, en donde el primer dominio de IgSF modificado que no es de inmunoglobulina comprende una o más sustituciones de aminoácidos en un primer dominio de IgSF de tipo salvaje y el segundo dominio de IgSF modificado que no es de inmunoglobulina comprende una o más sustituciones de aminoácidos en un segundo dominio de IgSF de tipo salvaje.
- 40 45 Realización 51. En algunas realizaciones adicionales de la realización 50, el primer dominio de IgSF modificado que no es de inmunoglobulina exhibe unión alterada al menos a uno de sus compañeros de unión afines en comparación con el primer dominio de IgSF de tipo salvaje; y el segundo dominio de IgSF modificado que no es de inmunoglobulina exhibe unión alterada al menos a uno de sus compañeros de unión afines en comparación con el segundo dominio de IgSF de tipo salvaje.
- Realización 52. En algunas realizaciones adicionales de una cualquiera de las realizaciones 49-51, los diferentes compañeros de unión afines son especies moleculares de la superficie celular expresadas en la superficie de una célula de mamífero.
- 50 Realización 53. En algunas realizaciones adicionales de la realización 52, las diferentes especies moleculares de la superficie celular se expresan en configuración cis o configuración trans.

- Realización 54. En algunas realizaciones adicionales de la realización 52 o la realización 53, la célula de mamífero es una de las dos células de mamífero que forman una sinapsis inmunológica (IS) y las diferentes especies moleculares de la superficie celular se expresan en al menos una de las dos células de mamífero que forman la IS.
- 5 Realización 55. En algunas realizaciones adicionales de una cualquiera de las realizaciones 52-54, al menos una de las células de mamífero es un linfocito.
- Realización 56. En algunas realizaciones adicionales de la realización 55, el linfocito es una célula NK o una célula T.
- Realización 57. En algunas realizaciones adicionales de la realización 55 o realización 56, la unión de la proteína inmunomoduladora a la célula modula la actividad inmunológica del linfocito.
- 10 Realización 58. En algunas realizaciones adicionales de la realización 57, la proteína inmunomoduladora es capaz de efectuar una actividad inmunológica incrementada en comparación con la proteína de tipo salvaje que comprende el dominio de IgSF de tipo salvaje.
- Realización 59. En algunas realizaciones adicionales de la realización 57, la proteína inmunomoduladora es capaz de efectuar una actividad inmunológica disminuida en comparación con la proteína de tipo salvaje que comprende el dominio de IgSF de tipo salvaje.
- 15 Realización 60. En algunas realizaciones adicionales de una cualquiera de las realizaciones 52-59, al menos una de las células de mamífero es una célula tumoral.
- Realización 61. En algunas realizaciones adicionales de una cualquiera de las realizaciones 52-60, las células de mamífero son células humanas.
- 20 Realización 62. En algunas realizaciones adicionales de una cualquiera de las realizaciones 54-61, la proteína inmunomoduladora es capaz de unirse específicamente a las dos células de mamífero que forman la IS.
- Realización 63. En algunas realizaciones adicionales de una cualquiera de las realizaciones 49-62, el primer y segundo dominios de IgSF modificados comprenden cada uno una o más sustituciones de aminoácidos en diferentes dominios de IgSF de tipo salvaje.
- 25 Realización 64. En algunas realizaciones adicionales de la realización 63, los diferentes dominios de IgSF de tipo salvaje son de diferentes miembros de la familia de IgSF.
- Realización 65. En algunas realizaciones adicionales de una cualquiera de las realizaciones 49-64, el primer y segundo dominios de IgSF modificados son combinaciones de tipo no salvaje.
- 30 Realización 66. En algunas realizaciones adicionales de una cualquiera de las realizaciones 49-65, el primer dominio de IgSF de tipo salvaje y el segundo dominio de IgSF de tipo salvaje son cada uno individualmente de un miembro de la familia de IgSF de una familia seleccionada de la familia de proteínas reguladoras de señales (SIRP), familia semejantes al receptor de activación expresado en células mieloídes (TREML), familia de moléculas de adhesión celular relacionadas con antígenos carcinoembrionarios (CEACAM), familia de lectinas similares a Ig de unión a ácido siálico (SIGLEC), familia de butirofilinas, familia B7, familia CD28, familia que contiene dominios de conjunto V y de inmunoglobulina (VSIG), familia de dominios de conjunto V transmembrana (VSTM), familia de complejos mayores de histocompatibilidad (MHC), familia de moléculas de activación linfocítica de señalización (SLAM), receptor semejante a inmunoglobulina leucocitaria (LIR), familia de nectina (Nec), familia semejante a nectina (NECL), familia relacionada con el receptor de poliovirus (PVR), familia de receptores desencadenantes de citotoxicidad natural (NCR), familia de inmunoglobulina y mucina de células T (TIM) o familia de receptores semejantes a inmunoglobulina de células asesinas (KIR).
- 35 Realización 67. En algunas realizaciones adicionales de una cualquiera de las realizaciones 49-66, el primer dominio de IgSF de tipo salvaje y el segundo dominio de IgSF de tipo salvaje son cada uno individualmente de un miembro de IgSF seleccionado de CD80, CD86, PD-L1, PD-L2, Ligando ICOS, B7-H3, B7-H4, CD28, CTLA4, PD-1, ICOS, BTLA, CD4, CD8-alfa, CD8-beta, LAG3, TIM-3, CEACAM1, TIGIT, PVR, PVRL2, CD226, CD2, CD160, CD200, CD200R o Nkp30.
- 40 Realización 68. En algunas realizaciones adicionales de una cualquiera de las realizaciones 49-67, el primer dominio de IgSF modificado y el segundo dominio de IgSF modificado comprenden, cada uno individualmente, al menos un 85 % de identidad de secuencia con un dominio de IgSF de tipo salvaje o un fragmento de unión específico del mismo contenido en la secuencia de aminoácidos mostrada en cualquiera de las SEQ ID NO: 1-27.
- 45 Realización 69. En algunas realizaciones adicionales de una cualquiera de las realizaciones 49-68, el primer y segundo dominio de IgSF de tipo salvaje, cada uno individualmente, es un miembro de la familia B7.
- 50 Realización 70. En algunas realizaciones adicionales de la realización 69, el primer y segundo dominio de IgSF de tipo salvaje, cada uno individualmente, es de CD80, CD86 o ICOSLG.
- Realización 71. En algunas realizaciones adicionales de una cualquiera de las realizaciones 49-68, el primer o segundo

dominio de IgSF de tipo salvaje es de un miembro de la familia B7 y el otro del primer o segundo dominio de IgSF de tipo salvaje es de otra familia de IgSF.

Realización 72. En algunas realizaciones adicionales de una cualquiera de las realizaciones 49-68 y 71, el primer y segundo dominio de IgSF de tipo salvaje es de ICOSLG y NKp30.

5 Realización 73. En algunas realizaciones adicionales de una cualquiera de las realizaciones 49-68 y 71, el primer y segundo dominio de IgSF de tipo salvaje es de CD80 y NKp30.

Realización 74. En algunas realizaciones adicionales de una cualquiera de las realizaciones 49-73, el primer y segundo dominio de IgSF de tipo salvaje, cada uno individualmente, es un miembro de IgSF humano.

10 Realización 75. En algunas realizaciones adicionales de una cualquiera de las realizaciones 49-74, el primer y segundo dominio de IgSF de tipo salvaje, cada uno individualmente, es un dominio IgV y un dominio IgC1, un dominio IgC2 o una unión específica del mismo.

Realización 76. En algunas realizaciones adicionales de una cualquiera de las realizaciones 49-75, el primer dominio no modificado que no es de inmunoglobulina y el segundo dominio modificado que no es de inmunoglobulina, cada uno individualmente, es un dominio IgV modificado, un dominio IgC1 modificado o un dominio IgC2 modificado o es un fragmento de unión específico del mismo que comprende la una o más sustituciones de aminoácidos.

15 Realización 77. En algunas realizaciones adicionales de una cualquiera de las realizaciones 49-76, al menos uno del primer dominio modificado que no es de inmunoglobulina o el segundo dominio modificado que no es de inmunoglobulina es un dominio IgV modificado.

20 Realización 78. En algunas realizaciones adicionales de una cualquiera de las realizaciones 49-77, el primer dominio de IgSF modificado que no es de inmunoglobulina y el segundo dominio de IgSF modificado que no es de inmunoglobulina, cada uno individualmente, comprende 1 y no más de veinte sustituciones de aminoácidos.

Realización 79. En algunas realizaciones adicionales de una cualquiera de las realizaciones 49-78, el primer dominio de IgSF modificado que no es de inmunoglobulina y el segundo dominio de IgSF modificado que no es de inmunoglobulina, cada uno individualmente, comprende 1 y no más de diez sustituciones de aminoácidos.

25 Realización 80. En algunas realizaciones adicionales de una cualquiera de las realizaciones 49-79, el primer dominio de IgSF modificado que no es de inmunoglobulina y el segundo dominio de IgSF modificado que no es de inmunoglobulina, cada uno individualmente, comprende 1 y no más de cinco sustituciones de aminoácidos.

30 Realización 81. En algunas realizaciones adicionales de una cualquiera de las realizaciones 49-80, al menos uno del primer o segundo dominio de IgSF modificado que no es de inmunoglobulina tiene entre un 10 % y 90 % de la afinidad de unión del dominio de IgSF de tipo salvaje para al menos uno de sus compañeros de unión afines.

Realización 82. En algunas realizaciones adicionales de una cualquiera de las realizaciones 49-81, al menos uno del primer o segundo dominio de IgSF modificado que no es de inmunoglobulina tiene al menos un 120 % de la afinidad de unión del dominio de IgSF de tipo salvaje para al menos uno de sus compañeros de unión afines.

35 Realización 83. En algunas realizaciones adicionales de una cualquiera de las realizaciones 49-80 y 82, el primer y segundo dominio de IgSF modificado que no es de inmunoglobulina tiene, cada uno individualmente, al menos un 120 % de la afinidad de unión del dominio de IgSF de tipo salvaje para al menos uno de sus compañeros de unión afines.

Realización 84. En algunas realizaciones adicionales de una cualquiera de las realizaciones 49-83, la proteína inmunomoduladora es soluble.

40 Realización 85. En algunas realizaciones adicionales de una cualquiera de las realizaciones 49-84, la proteína inmunomoduladora está glicosilada o pegilada.

Realización 86. En algunas realizaciones adicionales de una cualquiera de las realizaciones 49-85, la proteína inmunomoduladora está unida a un dominio de multimerización.

Realización 87. En algunas realizaciones adicionales de una cualquiera de las realizaciones 49-86, la proteína inmunomoduladora está unida a un dominio Fc o una variante del mismo con función efectora reducida.

45 Realización 88. En algunas realizaciones adicionales de la realización 87, el dominio Fc es un dominio de IgG1, un dominio de IgG2 o es una variante del mismo con función efectora reducida.

Realización 89. En algunas realizaciones adicionales de la realización 87 o la realización 88, el dominio Fc es de mamífero, opcionalmente humano; o el dominio Fc variante comprende una o más modificaciones de aminoácidos en comparación con un dominio Fc no modificado que es de mamífero, opcionalmente humano.

50 Realización 90. En algunas realizaciones adicionales de una cualquiera de las realizaciones 87-89, el dominio Fc o

variante del mismo comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 226 o SEQ ID NO: 227 o una secuencia de aminoácidos que exhibe al menos un 85 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 226 o SEQ ID NO: 227.

5 Realización 91. En algunas realizaciones adicionales de una cualquiera de las realizaciones 86-90, el polipéptido CD80 variante está unido indirectamente mediante un enlazador.

Realización 92. En algunas realizaciones adicionales de una cualquiera de las realizaciones 86-91, la proteína inmunomoduladora es un dímero.

Realización 93. En algunas realizaciones adicionales de una cualquiera de las realizaciones 49-92, la proteína inmunomoduladora comprende además uno o más dominios de IgSF que no son de inmunoglobulina adicionales que son iguales o diferentes del primer o segundo dominio de IgSF que no es de inmunoglobulina.

Realización 94. En algunas realizaciones adicionales de la realización 93, el uno o más dominios de IgSF que no son de inmunoglobulina adicionales es un dominio de IgSF con afinidad modificada.

Realización 95. En algunas realizaciones adicionales de una cualquiera de las realizaciones 49-94, la proteína inmunomoduladora está unida a una membrana liposomal.

15 Realización 96. En algunas realizaciones, se proporciona una molécula de ácido nucleico que codifica el polipéptido inmunomodulador de una cualquiera de las realizaciones 1-95.

Realización 97. En algunas realizaciones adicionales de la realización 96, el ácido nucleico es un ácido nucleico sintético.

Realización 98. En algunas realizaciones adicionales de la realización 96 o la realización 97, el ácido nucleico es ADNc.

20 Realización 99. En algunas realizaciones, se proporciona un vector, que comprende la molécula de ácido nucleico de cualquiera de las realizaciones 96-98.

Realización 100. En algunas realizaciones adicionales de la realización 99, el vector es un vector de expresión.

Realización 101. En algunas realizaciones, se proporciona una célula, que comprende el vector de la realización 99 o la realización 100.

25 Realización 102. En algunas realizaciones adicionales de la realización 101, la célula es una célula eucariota o una célula procariota.

Realización 103. En algunas realizaciones, se proporciona un método para producir una proteína inmunomoduladora, que comprende introducir la molécula de ácido nucleico de cualquiera de las realizaciones 96-98 o el vector de la realización 99 o la realización 100 en una célula huésped en condiciones para expresar la proteína en la célula.

30 Realización 104. En algunas realizaciones adicionales de la realización 103, el método comprende además aislar o purificar la proteína inmunomoduladora de la célula.

Realización 105. En algunas realizaciones, se proporciona una composición farmacéutica que comprende la proteína inmunomoduladora de cualquiera de las realizaciones 1-95.

Realización 106. En algunas realizaciones adicionales de la realización 105, la composición farmacéutica comprende un excipiente farmacéuticamente aceptable.

35 Realización 107. En algunas realizaciones adicionales de la realización 105 o la realización 106, la composición farmacéutica es estéril.

Realización 108. En la presente memoria también se describe un artículo de fabricación que comprende la composición farmacéutica de cualquiera de las realizaciones 105-107 en un vial.

Realización 109. En algunas realizaciones adicionales de la realización 108, el vial está sellado.

40 Realización 110. En la presente memoria también se describe un kit que comprende la composición farmacéutica de cualquiera de las realizaciones 105-107 e instrucciones para su uso.

Realización 111. En la presente memoria también se describe un kit que comprende el artículo de fabricación según la realización 108 o la realización 109, e instrucciones para su uso.

45 Realización 112. En algunas realizaciones, se proporciona una composición farmacéutica que comprende la proteína inmunomoduladora de cualquiera de las realizaciones 1-95 para su uso en un método para modular una respuesta inmune en un sujeto, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de la proteína inmunomoduladora de cualquiera de las realizaciones 1-95 al sujeto.

- Realización 113. En algunas realizaciones adicionales de la realización 112, la modulación de la respuesta inmune trata una enfermedad o afección en el sujeto.
- Realización 114. En algunas realizaciones adicionales de la realización 112 o la realización 113, la respuesta inmune se incrementa.
- 5 Realización 115. En algunas realizaciones adicionales de la realización 114, la enfermedad o afección es un tumor o cáncer.
- Realización 116. En algunas realizaciones adicionales de la realización 114 o la realización 115, la enfermedad o afección se selecciona de melanoma, cáncer de pulmón, cáncer de vejiga o una malignidad hematológica.
- 10 Realización 117. En algunas realizaciones adicionales de la realización 112 o la realización 113, la respuesta inmune se disminuye.
- Realización 118. En algunas realizaciones adicionales de la realización 117, la enfermedad o afección es una enfermedad o afección inflamatoria.
- Realización 119. En algunas realizaciones adicionales de la realización 117 o la realización 118, la enfermedad o afección se selecciona de la enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, esclerosis múltiple, asma, artritis reumatoide o 15 psoriasis.
- Realización 120. En la presente memoria también se describe un método para identificar una proteína inmunomoduladora con afinidad modificada, que comprende: a) poner en contacto una proteína modificada que comprende al menos un dominio de la superfamilia de inmunoglobulinas (IgSF) modificado que no es de inmunoglobulina o un fragmento de unión específico del mismo con al menos dos compañeros de unión afines en 20 condiciones capaces de efectuar la unión de la proteína con los al menos dos compañeros de unión afines, en donde el al menos un dominio de IgSF modificado comprende una o más sustituciones de aminoácidos en un dominio de IgSF de tipo salvaje; b) identificar una proteína modificada que comprende el dominio de IgSF modificado que tiene una unión aumentada al menos a uno de los dos compañeros de unión afines en comparación con una proteína que comprende el dominio de IgSF de tipo salvaje; y c) seleccionar una proteína modificada que comprende el dominio de IgSF modificado que se une de forma no competitiva a los al menos dos compañeros de unión afines, identificando 25 así la proteína inmunomoduladora con afinidad modificada.
- Realización 121. En algunas realizaciones adicionales de la realización 120, la etapa b) comprende identificar una proteína modificada que comprende un dominio de IgSF modificado que tiene una unión aumentada a cada uno de los al menos dos compañeros de unión afines en comparación con una proteína que comprende el dominio de tipo salvaje.
- 30 Realización 122. En algunas realizaciones adicionales de la realización 120 o la realización 121, antes de la etapa a), introducir una o más sustituciones de aminoácidos en el dominio de IgSF de tipo salvaje, generando así una proteína modificada que comprende el dominio de IgSF modificado.
- Realización 123. En algunas realizaciones adicionales de una cualquiera de las realizaciones 120-122, la proteína modificada comprende al menos dos dominios de IgSF modificados o fragmentos de unión específicos de los mismos, 35 en donde el primer dominio de IgSF comprende una o más sustituciones de aminoácidos en un primer dominio de IgSF de tipo salvaje y el segundo dominio de IgSF con afinidad modificada que no es de inmunoglobulina comprende una o más sustituciones de aminoácidos en un segundo dominio de IgSF de tipo salvaje.
- Realización 124. En algunas realizaciones adicionales de la realización 123, el primer y segundo dominio de IgSF con 40 afinidad modificada que no es de inmunoglobulina se unen cada uno específicamente al menos a un compañero de unión afín diferente.
- Realización 125. En algunas realizaciones, se proporciona una proteína inmunomoduladora de la invención reivindicada que comprende al menos un dominio de la superfamilia de inmunoglobulinas (IgSF) con afinidad modificada que no es de inmunoglobulina, en donde el dominio de IgSF con afinidad modificada se une específicamente de forma no competitiva al menos a dos especies moleculares de la superficie celular, en donde cada 45 una de las especies moleculares se expresa en al menos una de las dos células de mamífero que forman una sinapsis inmunológica (IS), en donde una de las células de mamífero es un linfocito y en donde la unión del dominio de IgSF con afinidad modificada modula la actividad inmunológica del linfocito.
- Realización 126. En algunas realizaciones adicionales de la realización 125, el dominio de IgSF con afinidad modificada se une específicamente a las dos células de mamífero que forman la IS.
- 50 Realización 127. En algunas realizaciones adicionales de la realización 125 o la realización 126, la proteína inmunomoduladora comprende al menos dos dominios de IgSF con afinidad modificada que no son de inmunoglobulina y la proteína inmunomoduladora se une específicamente a las dos células de mamífero que forman la IS.
- Realización 128. En algunas realizaciones adicionales de una cualquiera de las realizaciones 125-127, las especies moleculares de la superficie celular de IgSF son miembros de IgSF humanos.

Realización 129. Según la invención, el dominio de IgSF con afinidad modificada de una cualquiera de las realizaciones 125-128 comprende al menos un dominio de CD80 humano con afinidad modificada.

Realización 130. En algunas realizaciones adicionales de una cualquiera de las realizaciones 125-129, la proteína inmunomoduladora comprende un miembro de IgSF de mamífero con afinidad modificada.

5 Realización 131. Según la invención, el miembro de IgSF de mamífero con afinidad modificada de una cualquiera de las realizaciones 125-130 es CD80.

Realización 132. En algunas realizaciones adicionales de una cualquiera de las realizaciones 125-131, la actividad inmunológica se potencia.

10 Realización 133. En algunas realizaciones adicionales de una cualquiera de las realizaciones 125-132, la actividad inmunológica se suprime.

Realización 134. En algunas realizaciones adicionales de una cualquiera de las realizaciones 125-133, una de las dos células de mamífero es una célula tumoral.

Realización 135. En algunas realizaciones adicionales de una cualquiera de las realizaciones 125-134, el linfocito es una célula NK o una célula T.

15 Realización 136. En algunas realizaciones adicionales de una cualquiera de las realizaciones 125-135, las células de mamífero son células de ratón, rata, mono cynomologus o humanas.

Realización 137. En algunas realizaciones adicionales de una cualquiera de las realizaciones 125-136, el dominio de IgSF con afinidad modificada tiene entre un 10 % y un 90 % de la afinidad de unión del dominio de IgSF de tipo salvaje para al menos una de las dos especies moleculares de la superficie celular.

20 Realización 138. En algunas realizaciones adicionales de una cualquiera de las realizaciones 125-137, el dominio de IgSF con afinidad modificada se une específicamente de forma no competitiva a exactamente un miembro de IgSF.

Realización 139. En algunas realizaciones adicionales de una cualquiera de las realizaciones 125-138, el dominio de IgSF con afinidad modificada tiene al menos un 120 % de la afinidad de unión que su dominio de IgSF de tipo salvaje para al menos una de las dos especies moleculares de la superficie celular.

25 Realización 140. En algunas realizaciones adicionales de una cualquiera de las realizaciones 125-139, el dominio de IgSF con afinidad modificada es un dominio IgV, IgC1 o IgC2 con afinidad modificada.

Realización 141. En algunas realizaciones adicionales de una cualquiera de las realizaciones 125-140, el dominio de IgSF con afinidad modificada difiere en al menos una y no más de diez sustituciones de aminoácidos de su dominio de IgSF de tipo salvaje.

30 Realización 142. En algunas realizaciones adicionales de una cualquiera de las realizaciones 125-141, el dominio de IgSF con afinidad modificada difiere en al menos una y no más de cinco sustituciones de aminoácidos de su dominio de IgSF de tipo salvaje.

Realización 143. En algunas realizaciones adicionales de una cualquiera de las realizaciones 125-142, el dominio de IgSF con afinidad modificada es un dominio de IgSF CD80 humano.

35 Realización 144. En algunas realizaciones adicionales de una cualquiera de las realizaciones 125-143, la proteína inmunomoduladora comprende al menos dos dominios de IgSF con afinidad modificada, en donde los dominios de IgSF con afinidad modificada no son la misma especie de dominio de IgSF.

Realización 145. En algunas realizaciones adicionales de una cualquiera de las realizaciones 125-144, la proteína inmunomoduladora está unida covalentemente, directa o indirectamente, a un fragmento de anticuerpo cristalizable (Fc).

40 Realización 146. En algunas realizaciones adicionales de una cualquiera de las realizaciones 125-145, la proteína inmunomoduladora está en un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Realización 147. En algunas realizaciones adicionales de una cualquiera de las realizaciones 125-146, la proteína inmunomoduladora está glicosilada o pegilada.

45 Realización 148. En algunas realizaciones adicionales de una cualquiera de las realizaciones 125-147, la proteína inmunomoduladora es soluble.

Realización 149. En algunas realizaciones adicionales de una cualquiera de las realizaciones 125-148, la proteína inmunomoduladora está unida a una membrana liposomal.

Realización 150. En algunas realizaciones adicionales de una cualquiera de las realizaciones 125-149, la proteína inmunomoduladora se dimeriza mediante enlaces disulfuro intermoleculares.

- Realización 151. En algunas realizaciones adicionales de una cualquiera de las realizaciones 125-150, las especies moleculares de la superficie celular se expresan en configuración cis o configuración trans.
- Realización 152. En la presente memoria también se describe una proteína inmunomoduladora que comprende al menos dos dominios de la superfamilia de inmunoglobulinas (IgSF) con afinidad modificada que no son de inmunoglobulina, en donde los dominios de IgSF con afinidad modificada se unen cada uno específicamente a una especie molecular de la superficie celular diferente, en donde cada una de las especies moleculares se expresa en al menos una de las dos células de mamífero que forman una sinapsis inmunológica (IS), en donde una de las células de mamífero es un linfocito y en donde la unión del dominio de IgSF con afinidad modificada modula la actividad inmunológica del linfocito.
- 10 Realización 153. En algunas realizaciones adicionales de una cualquiera de las realizaciones 125-152, al menos uno de los dominios de IgSF con afinidad modificada se une competitivamente.
- Realización 154. En algunas realizaciones adicionales de una cualquiera de las realizaciones 125-153, los dominios de IgSF con afinidad modificada no son la misma especie de dominio de IgSF.
- 15 Realización 155. En algunas realizaciones adicionales de una cualquiera de las realizaciones 125-154, los dominios de IgSF con afinidad modificada son combinaciones de tipo no salvaje.
- Realización 156. En algunas realizaciones adicionales de una cualquiera de las realizaciones 125-155, las especies moleculares de la superficie celular son miembros de IgSF humano.
- Realización 157. En algunas realizaciones adicionales de una cualquiera de las realizaciones 125-156, los al menos dos dominios de IgSF con afinidad modificada son de al menos uno de: CD80, CD86, CD274, PDCD1LG2, ICOSLG, 20 CD276, VTCN1, CD28, CTLA4, PDCD1, ICOS, BTLA, CD4, CD8A, CD8B, LAG3, HAVCR2, CEACAM1, TIGIT, PVR, PVRL2, CD226, CD2, CD160, CD200 o CD200R1.
- Realización 158. En algunas realizaciones adicionales de una cualquiera de las realizaciones 125-157, la proteína inmunomoduladora comprende al menos dos miembros de IgSF de mamífero con afinidad modificada.
- Realización 159. En algunas realizaciones adicionales de una cualquiera de las realizaciones 125-158, los miembros de IgSF de mamífero son miembros de IgSF humano.
- Realización 160. En algunas realizaciones adicionales de una cualquiera de las realizaciones 125-159, los miembros de IgSF de mamífero son al menos dos de: CD80, CD86, CD274, PDCD1LG2, ICOSLG, CD276, VTCN1, CD28, CTLA4, PDCD1, ICOS, BTLA, CD4, CD8A, CD8B, LAG3, HAVCR2, CEACAM1, TIGIT, PVR, PVRL2, CD226, CD2, CD160, CD200 o CD200R1.
- 30 Realización 161. En algunas realizaciones adicionales de una cualquiera de las realizaciones 125-160, la actividad inmunológica se potencia.
- Realización 38. En algunas realizaciones adicionales de una cualquiera de las realizaciones 125-1, la actividad inmunológica se suprime.
- Realización 162. En algunas realizaciones adicionales de una cualquiera de las realizaciones 125-161, una de las dos células de mamífero es una célula tumoral.
- Realización 163. En algunas realizaciones adicionales de una cualquiera de las realizaciones 125-162, el linfocito es una célula NK o una célula T.
- Realización 164. En algunas realizaciones adicionales de una cualquiera de las realizaciones 125-163, las células de mamífero son células de ratón, rata, mono cynomologus o humanas.
- 40 Realización 165. En algunas realizaciones adicionales de una cualquiera de las realizaciones 125-164, al menos uno de los dos dominios de IgSF con afinidad modificada tiene entre un 10 % y un 90 % de la afinidad de unión del dominio de IgSF de tipo salvaje para al menos una de las especies moleculares de la superficie celular.
- Realización 166. En algunas realizaciones adicionales de una cualquiera de las realizaciones 125-165, al menos uno de los dos dominios de IgSF con afinidad modificada se une específicamente a exactamente una especie molecular de la superficie celular.
- 45 Realización 167. En algunas realizaciones adicionales de una cualquiera de las realizaciones 125-166, al menos uno de los dos dominios de IgSF con afinidad modificada tiene al menos un 120 % de la afinidad de unión como su dominio de IgSF de tipo salvaje para al menos una de las dos especies moleculares de la superficie celular.
- Realización 168. En algunas realizaciones adicionales de una cualquiera de las realizaciones 125-167, los dominios de IgSF con afinidad modificada son al menos uno de un dominio IgV, IgC1 o IgC2.

- Realización 169. En algunas realizaciones adicionales de una cualquiera de las realizaciones 125-168, cada uno de los al menos dos dominios de IgSF con afinidad modificada difiere en al menos una y no más de diez sustituciones de aminoácidos de su dominio de IgSF de tipo salvaje.
- 5 Realización 170. En algunas realizaciones adicionales de una cualquiera de las realizaciones 125-169, cada uno de los al menos dos dominios de IgSF con afinidad modificada difiere en al menos una y no más de cinco sustituciones de aminoácidos de su dominio de IgSF de tipo salvaje.
- Realización 171. En algunas realizaciones adicionales de una cualquiera de las realizaciones 125-170, la proteína inmunomoduladora está unida covalentemente, directa o indirectamente, a un fragmento de anticuerpo cristalizable (Fc).
- 10 Realización 172. En algunas realizaciones adicionales de una cualquiera de las realizaciones 125-171, la proteína inmunomoduladora está en un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- Realización 173. En algunas realizaciones adicionales de una cualquiera de las realizaciones 125-172, la proteína está glicosilada o pegilada.
- Realización 174. En algunas realizaciones adicionales de una cualquiera de las realizaciones 125-173, la proteína es soluble.
- 15 Realización 175. En algunas realizaciones adicionales de una cualquiera de las realizaciones 125-174, la proteína está unida a una membrana liposomal.
- Realización 176. En algunas realizaciones adicionales de una cualquiera de las realizaciones 125-175, la proteína se dimeriza mediante enlaces disulfuro intermoleculares.
- 20 Realización 177. En algunas realizaciones adicionales de una cualquiera de las realizaciones 125-176, las especies moleculares de la superficie celular se expresan en configuración cis o configuración trans.
- Realización 178. En algunas realizaciones adicionales de una cualquiera de las realizaciones 125-177, la proteína inmunomoduladora tiene al menos un 85 % de identidad de secuencia con una secuencia de aminoácidos seleccionada de las SEQ ID NO: 1-26, una combinación o un fragmento de la misma.
- 25 Realización 179. En algunas realizaciones adicionales de una cualquiera de las realizaciones 125-178, la proteína inmunomoduladora tiene al menos un 90 % de identidad de secuencia con una secuencia de aminoácidos seleccionada de las SEQ ID NO: 1-26, una combinación o un fragmento de la misma.
- Realización 180. En algunas realizaciones adicionales de una cualquiera de las realizaciones 125-179, la proteína inmunomoduladora tiene al menos un 95 % de identidad de secuencia con una secuencia de aminoácidos seleccionada de las SEQ ID NO: 1-26, una combinación o un fragmento de la misma.
- 30 Realización 181. En algunas realizaciones adicionales de una cualquiera de las realizaciones 125-180, la proteína inmunomoduladora tiene al menos un 99 % de identidad de secuencia con una secuencia de aminoácidos seleccionada de las SEQ ID NO: 1-26, una combinación o un fragmento de la misma.
- Realización 182. En algunas realizaciones adicionales de una cualquiera de las realizaciones 125-181, la proteína inmunomoduladora comprende además una segunda proteína inmunomoduladora, en donde la segunda proteína inmunomoduladora tiene al menos un 85 % de identidad de secuencia con una secuencia de aminoácidos seleccionada de las SEQ ID NO: 1-26 o un fragmento de la misma.
- 35 Realización 183. En algunas realizaciones adicionales de una cualquiera de las realizaciones 125-182, la proteína inmunomoduladora comprende además una segunda proteína inmunomoduladora, en donde la segunda proteína inmunomoduladora tiene al menos un 90 % de identidad de secuencia con una secuencia de aminoácidos seleccionada de las SEQ ID NO: 1-26 o un fragmento de la misma.
- 40 Realización 184. En algunas realizaciones adicionales de una cualquiera de las realizaciones 125-183, la proteína inmunomoduladora comprende además una segunda proteína inmunomoduladora, en donde la segunda proteína inmunomoduladora tiene al menos un 95 % de identidad de secuencia con una secuencia de aminoácidos seleccionada de las SEQ ID NO: 1-26 o un fragmento de la misma.
- 45 Realización 185. En algunas realizaciones adicionales de una cualquiera de las realizaciones 125-184, la proteína inmunomoduladora comprende además una segunda proteína inmunomoduladora, en donde la segunda proteína inmunomoduladora tiene al menos un 99 % de identidad de secuencia con una secuencia de aminoácidos seleccionada de las SEQ ID NO: 1-26 o un fragmento de la misma.
- 50 Realización 186. En algunas realizaciones, se proporciona un ácido nucleico recombinante que codifica una cualquiera de las proteínas inmunomoduladoras de las realizaciones 125-185.
- Realización 187. En algunas realizaciones, se proporciona un vector de expresión recombinante que comprende un

ácido nucleico de la realización 186.

Realización 188. En algunas realizaciones, se proporciona una célula huésped recombinante que comprende el vector de expresión de la realización 187.

5 Realización 189. En algunas realizaciones, se proporciona un método para preparar una proteína inmunomoduladora de una cualquiera de las realizaciones 125-185, que comprende cultivar la célula huésped recombinante en condiciones que expresan la proteína inmunomoduladora, expresar la proteína inmunomoduladora codificada por el vector de expresión recombinante en la misma, y purificar la proteína inmunomoduladora recombinante expresada por la misma.

10 Realización 190. En algunas realizaciones, se proporciona un método para tratar a un paciente mamífero que necesita una respuesta inmunológica potenciada o suprimida mediante la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de proteína inmunomoduladora de una cualquiera de las realizaciones 125-185.

Realización 191. En algunas realizaciones adicionales de la realización 190, la respuesta inmunológica potenciada trata el melanoma, cáncer de pulmón, cáncer de vejiga o una malignidad hematológica en el paciente.

Realización 192. En algunas realizaciones adicionales de la realización 190, la respuesta inmunológica suprimida trata la enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, esclerosis múltiple, asma, artritis reumatoide o psoriasis en el paciente.

15 **VIII. Ejemplos**

Los siguientes ejemplos se incluyen solo para fines ilustrativos y no pretenden limitar el alcance de la invención.

20 Los Ejemplos 1-8 describen el diseño, la creación y el cribado de proteínas inmunomoduladoras con CD80 (B7-1), CD86 (B7-2), ICOSL y NKp30 con afinidad modificada, que son componentes de la sinapsis inmune (IS) que han demostrado un papel dual tanto en la activación como en la inhibición inmunes. Estos ejemplos demuestran que la afinidad modificada de los dominios de IgSF produce proteínas que pueden actuar tanto para aumentar como para disminuir la actividad inmunológica. Este trabajo también describe las diversas combinaciones de esos dominios fusionados en pares (es decir, apilados) para formar una proteína inmunomoduladora de Tipo II para lograr la actividad inmunomoduladora.

Ejemplo 1

25 Generación de construcciones de ADN mutante de dominios de IgSF

El Ejemplo 1 describe la generación de construcciones de ADN mutante de dominios de IgSF CD80, CD86, ICOSL y NKp30 humanos para la traducción y expresión en la superficie de levadura como bibliotecas de presentación en levadura.

A. Bibliotecas degeneradas

30 Para las bibliotecas que se dirigen a residuos específicos de la proteína diana para la aleatorización completa o parcial con codones degenerados, los ADN codificantes de los dominios extracelulares (ECD) de CD80 humano (SEQ ID NO: 28), ICOSL (SEQ ID NO: 32) y NKp30 (SEQ ID NO: 54) se pidieron a Integrated DNA Technologies (Coralville, IA) como un conjunto de oligonucleótidos superpuestos de hasta 80 pares de bases (pb) de longitud. Para generar una biblioteca de diversas variantes de cada ECD, los oligonucleótidos contenían codones degenerados deseados en las posiciones de aminoácidos deseadas. Se generaron codones degenerados usando un algoritmo en la URL rosettadesign.med.unc.edu/SwiftLib/.

35 En general, las posiciones para mutar y degenerar codones se eligieron de la siguiente manera: se usaron estructuras cristalinas (CD80, NKp30) o modelos de homología (ICOSL) de los pares diana-ligando de interés para identificar los residuos de contacto del ligando, así como los residuos que están en la interfaz de la interacción de las proteínas.

40 Este análisis se realizó utilizando un visor de estructuras disponible en la URL: spdbv.vital-it.ch). Por ejemplo, una estructura cristalina para CD80 unida a CTLA4 está disponible públicamente en la URL: www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=1I8L y se diseñó una biblioteca dirigida basada en la interfaz CD80: CTLA4 para la selección de ligantes mejorados para CTLA4. Sin embargo, no hay estructuras de CD80 disponibles con los ligandos CD28 y PDL1, por lo que también se utilizó la misma biblioteca para seleccionar los ligantes de CD28 (se une a la misma región en CD80 que CTLA4) y PDL1 (no se sabe si PDL1 se une al mismo sitio que CTLA4).

45 La siguiente etapa en el diseño de la biblioteca fue el alineamiento de secuencias de CD80, ICOSL o NKp30 humanas, de ratones, ratas y monos para identificar los residuos conservados. En base a este análisis, los residuos diana conservados se mutaron con codones degenerados que solo especificaban cambios conservativos de aminoácidos más el residuo de tipo salvaje. Los residuos que no estaban conservados se mutaron de manera más agresiva, pero también se incluyó el residuo de tipo salvaje. Se utilizaron codones degenerados que también codificaban el residuo de tipo salvaje para evitar la mutagénesis excesiva de la proteína diana. Por la misma razón, solo se seleccionaron hasta 20 posiciones para mutagénesis a la vez. Estos residuos eran una combinación de residuos de contacto y residuos de interfaz sin contacto.

Los oligonucleótidos se disolvieron en agua estéril, se mezclaron en proporciones equimolares, se calentaron hasta 95 °C durante cinco minutos y se enfriaron lentamente hasta temperatura ambiente para la hibridación. A continuación, se utilizaron cebadores de oligonucleótidos específicos de ECD que se hibridan al inicio y al final de los ECD, respectivamente, para generar el producto de PCR. Se usaron entonces oligonucleótidos específicos de ECD que se

5 respectivamente, para generar el producto de PCR de acuerdo a las instrucciones de la mezcla de PCR que se superponen en 40-50 pb con una versión modificada del vector de clonación pBYDS03 (Life Technologies USA), más allá e incluyendo los sitios de clonación BamH1 y Kpn1, para amplificar 100 ng de producto de PCR de la etapa anterior para generar un total de 5 μ g de ADN. Ambas PCR se realizaron mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando la mezcla maestra de PCR OneTaq 2x (New England Biolabs, EE. UU.). Los segundos productos de PCR se purificaron usando un kit de purificación de PCR (Qiagen, Alemania) y se resuspendieron en agua desionizada estéril.

10 Para preparar la inserción de la biblioteca, se digirió una versión de presentación de levadura modificada del vector pBYDS03 con las enzimas de restricción BamH1 y Kpn1 (New England Biolabs, EE. UU.) y el fragmento de vector grande se purificó en gel y se disolvió en agua desionizada estéril. Se generó ADN listo para la electroporación para la siguiente etapa mezclando 12 µg de ADN de biblioteca con 4 µg de vector linealizado en un volumen total de 50 µl de agua desionizada y estéril. Una forma alternativa de generar bibliotecas dirigidas fue llevar a cabo mutagénesis dirigida a sitio (kit Multisite, Agilent, EE. UU.) de los ECD diana con oligonucleótidos que contenían codones degenerados. Este enfoque se utilizó para generar sub-bibliotecas que solo se dirigen a tramos específicos de proteína diana para mutagénesis. En estos casos, las sub-bibliotecas se mezclaron antes de continuar con las etapas de selección. En general, los tamaños de las bibliotecas estaban en el rango de 10E7 a 10E8 clones, excepto que las sub-bibliotecas estaban solo en el rango de 10E4 a 10E5. Se generaron bibliotecas grandes para CD80, ICOSL, CD86 y NKp30. Se generaron sub-bibliotecas para CD80, ICOSL y NKp30.

B. Bibliotecas aleatorias

25 También se construyeron bibliotecas aleatorias para identificar variantes del ECD de CD80 (SEQ ID NO: 28), CD86 (SEQ ID NO: 29), ICOSL (SEQ ID NO: 32) y NKp30 (SEQ ID NO: 54). El ADN que codifica los ECD de tipo salvaje se clonó entre los sitios BamH1 y Kpn1 del vector de presentación en levadura pBYDS03 modificado y luego se liberaron usando las mismas enzimas de restricción. El ADN liberado se mutagenizó entonces con el kit Genemorph II (Agilent, EE. UU.) para generar un promedio de tres a cinco cambios de aminoácidos por variante de biblioteca. El ADN mutagenizado se amplificó entonces mediante PCR de dos etapas y se procesó adicionalmente como se ha descrito anteriormente para las bibliotecas dirigidas.

Ejemplo 2

30 Introducción de bibliotecas de ADN en levadura

El Ejemplo 2 describe la introducción de bibliotecas de ADN de CD80, CD86, ICOSL y NKp30 en levadura.

Para introducir ADN de biblioteca aleatoria y degenerada en levadura, se prepararon células competentes para electroporación de la cepa de levadura BJ5464 (ATCC.org; ATCC número 208288) y se sometieron a electroporación en un Gene Pulser II (Biorad, EE. UU.) con el ADN listo para electroporación de la etapa anterior esencialmente como se describe (Colby, D.W. et al. 2004 *Methods Enzymology* 388, 348-358). La única excepción es que las células transformadas se crecieron en medio SCD-Leu selectivo mínimo no inductor para acomodar el marcador selectivo LEU2 portado por el plásmido pBYDS03 modificado.

40 El tamaño de la biblioteca se determinó sembrando en placas diluciones de células recién recuperadas en placas de agar SCD-Leu y extrapolando entonces el tamaño de la biblioteca a partir del número de colonias individuales de la siembra en placas que generó al menos 50 colonias por placa. El resto del cultivo electroporado se creció hasta la saturación y las células de este cultivo se subcultivaron en el mismo medio una vez más para minimizar la fracción de células sin transformar. Para mantener la diversidad de la biblioteca, esta etapa de subcultivo se llevó a cabo utilizando un inóculo que contenía al menos 10x veces más células que el tamaño de la biblioteca calculado. Las células del segundo cultivo saturado se resuspendieron en medio fresco que contenía glicerol estéril al 25 % (peso/volumen) hasta una densidad de 10E10/ml y se congelaron y almacenaron a -80 °C (preparación madre de biblioteca congelada).

45

Un litro de medio SCD-Leu consiste en 14,7 gramos de citrato de sodio, 4,29 gramos de monohidrato de ácido cítrico, 20 gramos de dextrosa, 6,7 gramos de base nitrogenada de levadura de la marca Difco y 1,6 gramos de suplemento de medio selectivo sintético de levadura sin leucina. El medio se esterilizó por filtración antes de su uso usando un dispositivo de filtro de vacío de 0,2 μ M.

50 El tamaño de la biblioteca se determinó sembrando en placas diluciones de células recién recuperadas en placas de agar SCD-Leu y extrapolando entonces el tamaño de la biblioteca a partir del número de colonias individuales de una siembra en placa que genera al menos 50 colonias por placa.

55 Para segregar el plásmido de las células que contienen dos o más clones de bibliotecas diferentes, se tomaron varias células correspondientes a 10 veces el tamaño de la biblioteca del cultivo SCD-Leu de toda la noche y se subcultivaron 1/100 en medio SCD-Leu reciente y se crecieron toda la noche. Las células de este cultivo de toda la noche se resuspendieron en glicerol estéril al 25 % (peso/volumen) hasta una densidad de 10E10/ml y se congelaron y almacenaron a -80 °C (preparación madre de biblioteca congelada).

Ejemplo 3

Selección de levaduras

El Ejemplo 3 describe la selección de levaduras que expresan variantes con afinidad modificada de CD80, CD86, ICOSL y NKp30.

- 5 Se descongeló un número de células igual al menos a 10 veces el tamaño de la biblioteca a partir de preparaciones madre de biblioteca individuales, se suspendieron hasta $0,1 \times 10^6$ células/ml en medio SCD-Leu no inductor y se crecieron toda la noche. Al día siguiente, se centrifugó un número de células igual a 10 veces el tamaño de la biblioteca a 2.000 RPM durante dos minutos y se resuspendieron hasta $0,5 \times 10^6$ células/ml en medio SCDG-Leu inductor. Un litro del medio de inducción SCDG-Leu consiste en 5,4 gramos de Na_2HPO_4 , 8,56 gramos de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 10 20 gramos de galactosa, 2,0 gramos de dextrosa, 6,7 gramos de base nitrogenada de levadura Difco y 1,6 gramos de suplemento de medio selectivo sintético de levadura sin leucina disuelto en agua y esterilizado a través de un dispositivo de filtro de membrana de 0,22 μm . El cultivo se creció durante dos días a 20 °C para inducir la expresión de las proteínas de la biblioteca en la superficie de las células de levaduras.
- 15 Las células se procesaron con perlas magnéticas para reducir los no ligantes y enriquecer todas las variantes de CD80, CD86, ICOSL o NKp30 con la capacidad de unirse a sus proteínas de contraestructura recombinantes exógenas. Por ejemplo, se seleccionaron bibliotecas de CD80 dirigidas o aleatorias de levadura frente a cada uno de CD28, CTL-4, PD-L1, ICOS y B7-H6 por separado. Esto fue seguido entonces por dos o tres rondas de clasificación por citometría de flujo usando tinción de proteína de contraestructura exógena para enriquecer la fracción de células de levadura que muestra ligantes mejorados. El enriquecimiento con perlas magnéticas y las selecciones por citometría de flujo son esencialmente como se describe en Keith D. Miller, 1 Noah B. Pefaur, 2 y Cheryl L. Baird1 Current Protocols in Cytometry 4.7.1-4.7.30, julio de 2008.

Con las bibliotecas de CD80, CD86, ICOSL y NKp30, las proteínas del ligando diana se obtuvieron de R&D Systems (EE. UU.) como sigue: rCD28.Fc humano (es decir, proteína de fusión CD28-Fc recombinante), rPDL1.Fc, rCTLA4.Fc, rICOS.Fc y rB7H6.Fc. Las perlas magnéticas de estreptavidina se obtuvieron de New England Biolabs, EE. UU. Para la biotinilación de la proteína de contraestructura, se utilizó el kit de biotinilación no. de catálogo 21955, Life Technologies, EE. UU. Para la clasificación por citometría de flujo de dos colores, se utilizó un clasificador Becton Dickinson FACS Aria II. Los niveles de presentación de CD80, CD86, ICOSL o NKp30 se monitorizaron con un anticuerpo anti-hemaglutinina marcado con Alexafluor 488 (Life Technologies, EE. UU.). Las proteínas de fusión de Fc de unión a ligando rCD28.Fc, rCTLA4.Fc, rPDL1.Fc, rICOS.Fc o rB7-H6.Fc se detectaron con Fab de cabra específico de Ig humana conjugado con PE (Jackson ImmunoResearch, EE. UU.). Los dobletes de levaduras se eliminaron usando parámetros de dispersión directa (FSC)/dispersión lateral (SSC), y las puertas de clasificación se basaron en una mayor unión de ligando detectada en FL4 que poseía una unión de expresión de etiqueta más limitada en FL1.

35 Los resultados de levadura de las clasificaciones de la citometría de flujo se ensayaron para determinar una mayor afinidad de unión específica. La levadura de salida de clasificación se expandió y se volvió a inducir para expresar las variantes de dominio de IgSF con afinidad modificada particulares que codifican. A continuación, esta población se puede comparar con la cepa de levadura de tipo salvaje parental, o con cualquier otro resultado seleccionado, tal como la población de levadura de salida de perlas, mediante citometría de flujo.

40 Para ICOSL, los resultados de la segunda clasificación (F2) se compararon con la levadura ICOSL parental para la unión de cada uno de rICOS.Fc, rCD28.Fc y rCTLA4.Fc mediante la tinción doble de cada población con la expresión de la etiqueta anti-HA (hemaglutinina) y el secundario anti-Fc humano secundaria para detectar la unión del ligando.

45 En el caso de las variantes de levadura ICOSL seleccionadas para la unión a ICOS, los resultados de la clasificación F2 proporcionaron valores de intensidad de fluorescencia media (MFI) de 997, cuando se tiñeron con rICOS.Fc 5,6 nM, mientras que la MFI de la cepa ICOSL parental se midió en 397 cuando se tiñó con la misma concentración de rICOS.Fc. Esto representa una mejora de aproximadamente tres veces de la unión promedio en este grupo de clones seleccionado de F2, y se predice que los clones individuales de ese grupo tendrán una MFI/afinidad mucho más mejorada cuando se ensayan individualmente.

50 En el caso de las variantes de levadura ICOSL seleccionadas para la unión a CD28, los resultados de la clasificación F2 proporcionaron valores de MFI de 640 cuando se tiñeron con rCD28.Fc 100 nM, mientras que la MFI de la cepa ICOSL parental se midió a 29 cuando se tiñeron con la misma concentración de rCD28.Fc (mejora de 22 veces). En el caso de las variantes de levadura ICOSL seleccionadas para la unión a CTLA4, los resultados de la clasificación F2 proporcionaron valores de MFI de 949 cuando se tiñeron con rCTLA4.Fc 100 nM, mientras que la MFI de la cepa ICOSL parental se midió a 29 cuando se tiñó con la misma concentración de rCTLA4.Fc (mejora 32 veces).

55 En el caso de las variantes de levadura NKp30 seleccionadas para la unión a B7-H6, los resultados de la clasificación F2 proporcionaron valores de MFI de 533 cuando se tiñeron con rB7H6.Fc 16,6 nM, mientras que la MFI de la cepa parental NKp30 se midió a 90 cuando se tiñó con la misma concentración de rB7H6.Fc (mejora de 6 veces).

Es importante destacar que las MFI de todas los resultados de F2 descritas anteriormente cuando se midieron con el anticuerpo anti-etiqueta HA en FL1 no aumentaron y, a veces, disminuyeron en comparación con las cepas de tipo

salvaje, lo que indica que el aumento de la unión no fue una función del aumento de la expresión de las variantes seleccionadas. en la superficie de la levadura, y validaron las estrategias de activación de seleccionar únicamente expresores medios a bajos con alta unión a ligando.

Ejemplo 4

5 Reformateo de los resultados de selección como fusiones de Fc y en diversos tipos de proteínas inmunomoduladoras

El Ejemplo 4 describe el reformateo de los resultados de selección como proteínas inmunomoduladoras que contienen un dominio extracelular (ECD) con afinidad modificada (variante) de CD80 o ICOSL, fusionado a una molécula de Fc (moléculas de fusión ECD-Fc variantes).

10 Las células de salida de las clasificaciones finales de citometría de flujo CD80 e ICOSL se crecieron hasta la densidad terminal en medio SCD-Leu. Los ADN plasmídicos de cada salida se aislaron usando un kit de aislamiento de ADN plasmídico de levadura (Zymoresearch, EE. UU.). Para las fusiones de Fc, se utilizaron cebadores de PCR con sitios de restricción añadidos adecuados para la clonación en el vector de fusión Fc de elección para amplificar por lotes, a partir de las preparaciones de ADN plasmídico, los ADN codificantes de los ECD diana mutantes. Después de la digestión por restricción, los productos de PCR se ligaron en un vector de fusión de Fc apropiado seguido de la transformación química en la cepa XL1 Blue de E. Coli (Agilent, EE.UU.) o NEB5alpha (New England Biolabs) según las instrucciones del proveedor. Un ejemplo de un vector de fusión de Fc es pFUSE-hlgG1-Fc2 (Invivogen, EE.UU.).

15 Las diluciones de las reacciones de transformación se sembraron en placas de agar LB que contenían 100 µg/ml de carbenicilina (Teknova, EE. UU.) para generar colonias individuales. A continuación, se crecieron hasta 96 colonias de cada transformación en placas de 96 pocillos hasta la saturación toda la noche a 37 °C en caldo LB (Teknova no. de catálogo L8112) y se envió una pequeña parte alícuota de cada pocillo para la secuenciación del ADN del inserto de ECD con el fin de identificar la o las mutaciones en todos los clones. La preparación de la muestra para la secuenciación del ADN se llevó a cabo utilizando protocolos proporcionados por el proveedor del servicio (Genewiz; South Plainfield, NJ). Después de la extracción de la muestra para la secuenciación del ADN, se añadió glicerol a los cultivos restantes para obtener un contenido final de glicerol del 25 % y las placas se almacenaron a -20 °C para su uso futuro como placas maestras (véase más abajo). Alternativamente, las muestras para la secuenciación de ADN se generaron mediante réplica de placas de cultivos líquidos crecidos en placas de agar sólido utilizando un replicador de 96 pocillos desechable (VWR, EE. UU.). Estas placas se incubaron toda la noche para generar parches de crecimiento y las placas se enviaron a Genewiz según lo especificado por Genewiz.

20 30 Despues de identificar los clones de interés a partir del análisis de los datos de secuenciación de ADN generados por Genewiz, los clones de interés se recuperaron de las placas maestras y se crecieron individualmente hasta su densidad en 5 ml de caldo LB líquido que contenía 100 µg/ml de carbenicilina (Teknova, EE. UU.) y se usaron entonces 2 ml de cada cultivo para la preparación de aproximadamente 10 µg de ADN plasmídico miniprep de cada clon usando un kit estándar tal como el kit Pureyield (Promega). La identificación de los clones de interés implicó generalmente las siguientes etapas. Primero, los archivos de datos de secuencias de ADN se descargaron del sitio web de Genewiz. 35 Todas las secuencias se curaron entonces manualmente para que comiencen al inicio de la región codificante de ECD. Las secuencias curadas se tradujeron por lotes utilizando un programa adecuado disponible en la URL: www.ebi.ac.uk/Tools/st/emboss_transeq/. Las secuencias traducidas se alinearon entonces usando un programa adecuado disponible en la URL: multalin.toulouse.inra.fr/multalin/multalin.html.

40 45 Los clones de interés se identificaron entonces usando los siguientes criterios: 1.) un clon idéntico aparece al menos dos veces en el alineamiento y 2.) una mutación aparece al menos dos veces en el alineamiento y preferiblemente en clones distintos. Los clones que cumplen con al menos uno de estos criterios fueron clones que se habían enriquecido con nuestro proceso de clasificación debido a una unión mejorada.

50 Para generar proteínas inmunomoduladoras que contienen un ECD de CD80 o ICOSL con al menos un dominio con afinidad modificada, se generó la molécula de ácido nucleico codificante para codificar una proteína diseñada de la siguiente manera: péptido señal seguido de ECD variante (mutante) seguido de un enlazador de tres alaninas (AAA) seguido de un Fc de IgG1 humana que contiene la mutación N82G con referencia al Fc de IgG1 humana de tipo salvaje mostrado en la SEQ ID NO: 226. Dado que la construcción no incluye ninguna cadena ligera de anticuerpo que pueda formar un enlace covalente con una cisteína, el Fc de IgG1 humana también contiene el reemplazo de los residuos de cisteína a un residuo de serina en la posición 5 (C5S) en comparación con el Fc de tipo salvaje o no modificado mostrado en la SEQ ID NO: 226.

Además, el Ejemplo 8 a continuación describe proteínas inmunomoduladoras adicionales que se generaron como construcciones apiladas que contienen al menos dos dominios con afinidad modificada diferentes de moléculas de CD80, CD86, ICOSL y NKp30 variantes identificadas unidas entre sí y fusionadas a un Fc.

Ejemplo 5

55 Expresión y purificación de fusiones de Fc

El Ejemplo 5 describe la expresión y purificación de alto rendimiento de proteínas de fusión de Fc que contienen ECD

variante de CD80, CD86, ICOSL y Nkp30.

Se produjeron proteínas de fusión de Fc variantes recombinantes con el sistema de expresión Expi293 (Invitrogen, EE. UU.). Se añadieron 4 µg de cada ADN plasmídico de la etapa anterior a 200 µl de Opti-MEM (Invitrogen, EE. UU.) al mismo tiempo que se añadieron por separado 10,8 µl de ExpiFectamina a otros 200 µl de Opti-MEM. Despues de

5 5 minutos, los 200 µl de ADN plasmídico se mezclaron con los 200 µl de ExpiFectamina y se incubaron adicionalmente durante 20 minutos más antes de añadir esta mezcla a las células. Se dispensaron diez millones de células Expi293 en pocillos separados de una placa de crecimiento de 24 pocillos profundos, de fondo cónico y estéril de 10 ml (Thomson Instrument Company, EE. UU.) en un volumen de 3,4 ml de medio Expi293 (Invitrogen, EE. UU.). Las placas se agitaron durante 5 días a 120 RPM en una incubadora de cultivo de células de mamíferos ajustada al 95 % de 10 humedad y al 8 % de CO₂. Despues de una incubación de 5 días, las células se sedimentaron y se retiraron los sobrenadantes del cultivo.

La proteína se purificó de los sobrenadantes usando un kit de purificación de proteína A de 96 pocillos de alto rendimiento usando el protocolo del fabricante (número de catálogo 45202, Life Technologies, EE. UU.). Se cambió el 15 tampón de las fracciones de elución resultantes a PBS utilizando una placa de desalación por rotación Zeba de 96 pocillos (número de catálogo 89807, Life Technologies, EE. UU.) usando el protocolo del fabricante. La proteína purificada se cuantificó utilizando la absorbancia de 280 nm medida con un instrumento Nanodrop (Thermo Fisher Scientific, EE. UU.), y la pureza de la proteína se evaluó cargando 5 µg de proteína en geles de poliacrilamida prefabricados NUPAGE (Life Technologies, EE. UU.) en condiciones desnaturalizantes y reductoras y subsiguiente electroforesis en gel. Las proteínas se visualizaron en el gel usando tinción de Coomassie estándar.

20 Ejemplo 6

Evaluación de la unión y actividad de moléculas que contienen dominios de IgSF maduradas por afinidad

A. Unión a contraestructuras expresadas en células

Este Ejemplo describe estudios de unión de las fusiones de Fc para mostrar la especificidad y afinidad de las proteínas inmunomoduladoras variantes del dominio CD80 e ICOSL para compañeros de unión afines.

25 Para producir células que expresan compañeros de unión afines, se diseñaron construcciones de expresión de superficie de mamíferos de longitud completa para cada uno de CD28, CTLA4, PD-L1, ICOS y B7-H6 humanos en el vector de expresión pcDNA3.1 (Life Technologies) y se obtuvieron de Genscript, EE. UU. Los estudios de unión se llevaron a cabo utilizando el sistema de transfección transitoria Expi293F (Life Technologies, EE. UU.) descrito anteriormente. Se determinó el número de células necesario para el experimento y se realizó la escala apropiada de 30 transfección de 30 ml utilizando el protocolo sugerido por el fabricante. Para cada transfección de CD28, CTLA-4, PD-L1, ICOS, B7-H6 o simulacro de 30 ml, se incubaron 75 millones de células Expi293F con 30 µg de ADN de la construcción de expresión y 1,5 ml de reactivo ExpiFectamina 293 diluido durante 48 horas, momento en el que las células se recogieron para la tinción.

35 Para la tinción mediante citometría de flujo, se sembraron en placas 200.000 células de la transfección transitoria apropiada o control negativo en placas de fondo redondo de 96 pocillos. Las células se sedimentaron y se resuspendieron en tampón de tinción (PBS (disolución salina tamponada con fosfato), BSA al 1 % (albúmina de suero bovino) y azida sódica al 0,1 %) durante 20 minutos para bloquear la unión no específica. Posteriormente, las células se centrifugaron de nuevo y se resuspendieron en tampón de tinción que contenía proteína inmunomoduladora variante de 100 nM a 1 nM, dependiendo del experimento de cada proteína de fusión Fc variante CD80 candidata, Fc 40 variante ICOSL o Fc variante IgSF apilada en 50 µl. La tinción primaria se realizó en hielo durante 45 minutos, antes de lavar las células en tampón de tinción dos veces. Se diluyó Fc antihumano conjugado con PE (Jackson ImmunoResearch, EE. UU.) 1: 150 en 50 µl de tampón de tinción y se añadió a las células y se incubó otros 30 minutos en hielo. El anticuerpo secundario se eliminó por lavado dos veces, las células se fijaron en formaldehído al 4 %/PBS y las muestras se analizaron en un citómetro de flujo FACScan (Becton Dickinson, EE. UU.).

45 Se calculó la intensidad de fluorescencia media (MFI) para cada transfectante y línea parental negativa con el software Cell Quest Pro (Becton Dickinson, EE. UU.).

B. Caracterización de la bioactividad

Este Ejemplo describe adicionalmente la caracterización de la bioactividad de la proteína variante de fusión de Fc en ensayos in vitro de células T primarias humanas.

50 1. Reacción de linfocitos mixtos (MLR)

Se ensayó la bioactividad de rICOSL.Fc o rCD80.Fc soluble en una reacción de linfocitos mixtos (MLR) humanos. Se generaron células dendríticas (DC) primarias humanas cultivando monocitos aislados de PBMC (BenTech Bio, EE. UU.) in vitro durante 7 días con 500U/ml de rIL-4 (R&D Systems, EE. UU.) y 250U/ml de rGM-CSF (R&D Systems, EE. UU.) en medio Ex-Vivo 15 (Lonza, Suiza). Se cocultivaron 10.000 DC maduradas y 100.000 células T CD4+ alógénicas purificadas (BenTech Bio, EE. UU.) con proteínas de fusión ICOSL o CD80 Fc variante y controles en placas de fondo

redondo de 96 pocillos en un volumen final de 200 μ l de medio Ex-Vivo 15. El día 5, se analizó la secreción de IFN-gamma en los sobrenadantes de los cultivos utilizando el kit de ELISA de IFN-gamma humano DuoSet (R&D Systems, EE. UU.). La densidad óptica se midió con el lector de microplacas de ELISA VMax (Molecular Devices, EE. UU.) y se cuantificó frente al estándar rIFN-gamma titulado incluido en el kit IFN-gamma Duo-set (R&D Systems, EE. UU.).

5 2. Ensayo de coinmovilización con anti-CD3

La bioactividad coestimuladora de las variantes de fusión ICOSL y CD80 Fc se determinó en ensayos de coinmovilización anti-CD3. Se diluyó anti-CD3 humano de ratón 1 nM o 4 nM (OKT3, Biolegends, EE. UU.) en PBS con proteínas variantes de rICOSL.Fc o rCD80.Fc de 1 nM a 80 nM. Esta mezcla se añadió a placas de cultivo tisular de 96 pocillos de fondo plano tratadas (Corning, EE. UU.) toda la noche para facilitar la adherencia de las proteínas estimulantes a los pocillos de la placa. Al día siguiente, la proteína no unida se eliminó por lavado de las placas y se añadieron 100.000 células T humanas generales purificadas (BenTech Bio, EE. UU.) o el clón BC3 de células T humanas (Astarte Biologics, EE. UU.) a cada pocillo en un volumen final de 200 μ l de medio Ex-Vivo 15 (Lonza, Suiza). Las células se cultivaron 3 días antes de recoger los sobrenadantes de los cultivos y medir los niveles de IFN-gamma humano con el kit de ELISA DuoSet (R&D Systems, EE. UU.) como se ha mencionado anteriormente.

10 15 C. Resultados

Los resultados de los estudios de unión y actividad para las variantes ensayadas ejemplares se muestran en las Tablas 6-8. En particular, la Tabla 6 indica sustituciones de aminoácidos en el dominio de IgSF ejemplares (reemplazos) en el ECD de CD80 seleccionado en el cribado para la maduración por afinidad contra la estructura afín respectiva CD28. La Tabla 7 indica sustituciones de aminoácidos en el dominio de IgSF ejemplares (reemplazos) en el ECD de CD80 seleccionado en el cribado para la maduración por afinidad contra la estructura afín respectiva PD-L1. La Tabla 8 indica sustituciones de aminoácidos en el dominio de IgSF ejemplares (reemplazos) en el ECD de ICOSL seleccionado en el cribado para la maduración por afinidad contra las estructuras afines respectivas ICOS y CD28. Para cada tabla, las sustituciones de aminoácidos ejemplares se designan por el número de la posición del aminoácido correspondiente a la secuencia de ECD no modificada de referencia respectiva como sigue. Por ejemplo, la secuencia de ECD no modificada de referencia en las Tablas 6 y 7 es la secuencia de ECD de CD80 no modificada mostrada en la SEQ ID NO: 28 y la secuencia de ECD no modificada de referencia en la Tabla 8 es la secuencia de ECD de ICOSL no modificada (SEQ ID NO: 32). La posición del aminoácido se indica en el medio, con el aminoácido no modificado correspondiente (p. ej., de tipo salvaje) enumerado antes del número y la sustitución de aminoácido variante identificada enumerada después del número. La columna 2 muestra el identificador de SEQ ID NO para la variante de ECD para cada variante de molécula de fusión de ECD-Fc.

30 También se muestra la actividad de unión medida por el valor de intensidad de fluorescencia media (MFI) para la unión de cada molécula de fusión de variante de Fc a células preparadas por ingeniería para expresar el ligando de contraestructura afín y la relación de la MFI en comparación con la unión de la correspondiente molécula de fusión ECD-Fc no modificada que no contiene la o las sustituciones de aminoácidos al mismo ligando de contraestructura expresado en las células. También se muestra la actividad funcional de las moléculas de fusión de Fc variante para modular la actividad de las células T en base a los niveles calculados de IFN-gamma en los sobrenadantes de los cultivos (pg/ml) generados ya sea i) con la molécula de fusión variante ECD-Fc indicada coinmovilizada con anti-CD3 o ii) con la molécula de fusión variante ECD-Fc indicada en un ensayo MLR. Las Tablas también representan la relación de IFN-gamma producido por cada variante de ECD-Fc en comparación con el correspondiente ECD-Fc sin modificar en ambos ensayos funcionales.

40 Como se muestra, las selecciones dieron como resultado la identificación de varias variantes de dominio de IgSF de CD80 o ICOSL que tenían la afinidad modificada para exhibir una unión aumentada para al menos uno, y en algunos casos más de uno, ligando de contraestructura afín. Además, los resultados mostraron que la modificación de la afinidad de las moléculas variantes también exhibió actividades mejoradas tanto para aumentar como para disminuir la actividad inmunológica dependiendo del formato de la molécula. Por ejemplo, la coinmovilización del ligando proporciona probablemente una interacción multivalente con la célula para agrupar o aumentar la avidez para favorecer la actividad agonista y aumentar la activación de las células T en comparación con la molécula de ECD-Fc no modificada (p. ej., de tipo salvaje) que no contiene el o los reemplazos de aminoácidos. Sin embargo, cuando la molécula se proporciona como una molécula de Fc bivalente en disolución, las mismas variantes del dominio de IgSF exhibieron una actividad antagonista para disminuir la activación de las células T en comparación con la molécula ECD-Fv no modificada (p. ej., de tipo salvaje) que no contiene el o los reemplazos de aminoácidos.

Tabla 6: Variantes de CD80 seleccionadas frente a CD28. Secuencias de las moléculas, datos de unión y datos de bioactividad coestimuladora.

Mutación(es) de CD80	SEQ ID NO (ECD)	Unión			Coinmovilización con anti-CD3	MLR
		CD28 MFI (relación parental)	CTLA-4 MFI (relación parental)	PD-L1 MFI (relación parental)		
L70Q/A91G	55	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/1118A/T120S/T130A	57	123 (1,29)	226 (1,09)	7 (0,10)	86 (1,03)	741 (0,86)
V4M/L70Q/A91G/T120S/T130A	58	89 (0,94)	263 (1,26)	6 (0,09)	139 (1,67)	991 (1,14)
L70Q/A91G/T120S/T130A	59	106 (1,12)	263 (1,26)	6 (0,09)	104 (1,25)	741 (0,86)
V20L/L70Q/A91S/T120S/T130A	60	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/T120S/T130A	62	120 (1,27)	193 (0,93)	6 (0,08)	98 (1,05)	736 (0,85)
A91G/T120S/T130A	63	84 (0,89)	231 (1,11)	44 (0,62)	276 (3,33)	714 (0,82)
L70R/A91G/T120S/T130A	64	125 (1,32)	227 (1,09)	6 (0,09)	105 (1,26)	702 (0,81)
L70Q/E81A/A91G/T120S/1127T/T130A	65	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/E95K/T120S/T130A	67	32 (0,34)	65 (0,31)	6 (0,08)	120 (1,44)	834 (0,96)
N63S/L70Q/A91G/T120S/T130A	68	124 (1,30)	165 (0,79)	6 (0,08)	116 (1,39)	705 (0,81)
K36E/I67T/L70Q/A91G/T120S/T130A/N152T	69	8 (0,09)	21 (0,10)	5 (0,08)	53 (0,63)	852 (0,98)
E52G/L70Q/A91G/T120S/T130A	70	113 (1,19)	245 (1,18)	6 (0,08)	94 (1,13)	874 (1,01)
K37E/F59S/L70Q/A91G/T120S/T130A	71	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/T120S/T130A	75	111 (1,17)	222 (1,07)	12 (0,18)	120 (1,44)	744 (0,86)

Tabla 6: Variantes de CD80 seleccionadas frente a CD28. Secuencias de las moléculas, datos de unión y datos de bioactividad coestimuladora.

Mutación(es) de CD80	SEQ ID NO (ECD)	Unión			Coinmovilización con anti-CD3	MLR
		CD28 MFI (relación parental)	CTLA-4 MFI (relación parental)	PD-L1 MFI (relación parental)		
K54M/A91G/T120S	76	68 (0,71)	131 (0,63)	5 (0,08)	152 (1,83)	685 (0,79)
M38T/L70Q/E77G/A91G/T120S/T130A/N152T	77	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/L70Q/A91G/T120S/T130A	79	85 (0,89)	85 (0,41)	6 (0,08)	288 (3,47)	782 (0,90)
V68A/110A	80	103 (1,08)	233 (1,12)	48 (0,68)	163 (1,96)	861 (0,99)
S66H/D90G/T110A/F116L	81	33 (0,35)	121 (0,58)	11 (0,15)	129 (1,55)	758 (0,88)
R29H/E52G/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/T120S	84	98 (1,03)	160 (0,77)	5 (0,08)	1.751 (21,1)	794 (0,92)
L70Q/A91G/T110A/T120S/T130A	85	8 (0,09)	14 (0,07)	5 (0,07)	77 (0,93)	656 (0,76)
M38V/T41D/M43I/W50G/D76G/V83A/K89E/T120S/T130A	86	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/T41G/T130A/P137L/N152T	88	6 (0,06)	6 (0,03)	5 (0,08)	104 (1,25)	711 (0,82)
I67F/L70R/E88G/A91G/T120S/T130A	89	5 (0,05)	6 (0,03)	6 (0,08)	62 (0,74)	1.003 (1,16)
E24G/L25P/L70Q/T120S	90	26 (0,27)	38 (0,18)	8 (0,11)	101 (1,21)	969 (1,12)
A91G/F92L/F108L/T120S	91	50 (0,53)	128 (0,61)	16 (0,11)	59 (0,71)	665 (0,77)
CD80 WT	28	95 (1,00)	208 (1,00)	70 (1,00)	83 (1,00)	866 (1,00)

Tabla 7: Variantes de CD80 seleccionadas frente a PD-L1. Secuencias de las moléculas, datos de unión y datos de bioactividad coestimuladora.

Mutación(es) de CD80	SEQ ID NO (ECD)	Unión			Coinmovilización con anti-CD3	MLR
		CD28 MFI (relación parental)	CTLA-4 MFI (relación parental)	PD-L1 MFI (relación parental)		
R29D/Y31L/Q33H/K36	92	1.071	1.089	37.245	387	5.028

Tabla 7: Variantes de CD80 seleccionadas frente a PD-L1. Secuencias de las moléculas, datos de unión y datos de bioactividad coestimuladora.

Mutación(es) de CD80	SEQ ID NO (ECD)	Unión			Coinmovilización con anti-CD3	MLR
		CD28 MFI (relación parental)	CTLA-4 MFI (relación parental)	PD-L1 MFI (relación parental)		
G/M38I/T41A/M43R/M 47T/E81V/L85R/K89N/ A91T/F92P/K93V/R94L /I118T/N149S		(0,08)	(0,02)	(2,09)	(0,76)	(0,26)
R29D/Y31L/Q33H/K36 G/M38I/T41A/M43R/M 47T/E81V/L85R/K89N/ A91T/F92P/K93V/R94L /N144S/N149S	93	1.065 (0,08)	956 (0,02)	30.713 (1,72)	400 (0,79)	7.943 (0,41)
R29D/Y31L/Q33H/K36 G/M38I/T41A/M42T/M4 3R/M47T/E81V/L85R/K 89N/A91T/F92P/K93V/ R94L/L148S/N149S	94	926 (0,07)	954 (0,02)	47.072 (2,64)	464 (0,91)	17387 (0,91)
E24G/R29D/Y31L/Q33 H/K36G/M38I/T41A/M4 3R/M47T/F59L/E81V/L 85R/K89N/A91T/F92P/ K93V/R94L/H96R	95	1.074 (0,08)	1.022 (0,02)	1.121 (0,06)	406 (0,80)	13.146 (0,69)
R29D/Y31L/Q33H/K36 G/M38I/T41A/M43R/M 47T/E81V/L85R/K89N/ A91T/F92P/K93V/R94L /N149S	96	1.018 (0,08)	974 (0,02)	25.434 (1,43)	405 (0,80)	24.029 (1,25)
R29V/M43Q/E81R/L85 I/K89R/D90L/A91E/F92 N/K93Q/R94G	97	1.029 (0,08)	996 (0,02)	1.575 (0,09)	342 (0,67)	11.695 (0,61)
T41I/A91G	98	17.890 (1,35)	50.624 (1,01)	12.562 (0,70)	433 (0,85)	26.052 (1,36)
K89R/D90K/A91G/F92 Y/K93R/N122S/N178S	99	41.687 (3,15)	49.429 (0,99)	20.140 (1,13)	773 (1,52)	6.345 (0,33)
K89R/D90K/A91G/F92 Y/K93R	100	51.663 (3,91)	72.214 (1,44)	26.405 (1,48)	1.125 (2,21)	9.356 (0,49)
K36G/K37Q/M38I/F59L /E81V/L85R/K89N/A91 T/F92P/K93V/R94L/E9 9G/T130A/N149S	101	1.298 (0,10)	1.271 (0,03)	3.126 (0,18)	507 (1,00)	3.095 (0,16)
AE88D/K89R/D90K/A9 1G/F92Y/K93R	102	31.535 (2,38)	50.868 (1,02)	29.077 (1,63)	944 (1,85)	5.922 (0,31)
K36G/K37Q/M38I/L40 M	103	1.170 (0,09)	1.405 (0,03)	959 (0,05)	427 (0,84)	811 (0,04)
K36G	104	29.766 (2,25)	58.889 (1,18)	20.143 (1,13)	699 (1,37)	30.558 (1,59)
CD80 WT	28	13.224 (1,00)	50.101 (1,00)	17.846 (1,00)	509 (1,00)	19.211 (1,00)

Tabla 8: Variantes de ICOSL seleccionadas frente a CD28 o ICOS. Secuencias de las moléculas, datos de unión y datos de bioactividad coestimuladora.

Mutación(es) de ICOSL	SEQ ID NO (ECD)	Unión		Coinmovilización con anti-CD3	MLR
		ICOS DO (relación parental)	CD28 MFI (relación parental)		
N52S	109	1,33 (1,55)	162 (9,00)	1.334 (1,93)	300 (0,44)
N52H	110	1,30 (1,51)	368 (20,44)	1.268 (1,83)	39 (0,06)
N52D	111	1,59 (1,85)	130 (7,22)	1.943 (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)	2.199 (3,18)	25 (0,04)
N52S/Y146C/Y152C	114	1,26 (1,47)	39 (2,17)	1.647 (2,38)	152 (0,22)
N52H/C198R	115	1,16 (1,35)	363 (20,17)	744* (2,15*)	ND (ND)
N52H/C140D/T225A	116	ND	154	522*	ND
		(ND)	(8,56)	(1,51*)	(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*)	1.617 (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)	1.427 (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)	1.192 (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	48	386*	771

Tabla 8: Variantes de ICOSL seleccionadas frente a CD28 o ICOS. Secuencias de las moléculas, datos de unión y datos de bioactividad coestimuladora.

Mutación(es) de ICOSL	SEQ ID NO (ECD)	Unión		Coinmovilización con anti-CD3	MLR
		ICOS DO (relación parental)	CD28 MFI (relación parental)	IFN-gamma pg/ml (relación parental)	Niveles de IFN-gamma pg/ml (relación parental)
		(1,88)	(2,67)	(1,12*)	(1,12)
N52D/S54P	131	1,50	38	476*	227
		(1,74)	(2,11)	(1,38*)	(0,33)
N52K/L208P	132	1,91 (2,22)	291 (16,17)	1.509 (2,18)	137 (0,20)
N52S/Y152H	133	0,85 (0,99)	68 (3,78)	2.158 (3,12)	221 (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)	2.216 (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)	1.996 (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)
ICOSL WT	32	0,86 (1,00)	18 (1,00)	692/346* (1,00)	687 (1,00)

*: Relación parental calculada usando 346 pg/ml de IFN-gamma para ICOSL WT

Ejemplo 7

Ensayo de competición de unión de ligandos

Como se muestra en el Ejemplo 6, varias moléculas variantes de CD80 exhibieron una unión mejorada a uno o ambos de CD28 y PD-L1. Para evaluar adicionalmente la actividad de unión de CD80 a los ligandos CD28 y PD-L1, este Ejemplo describe un ensayo de competición de ligandos que evalúa la naturaleza no competitiva de variantes de CD80 ejemplares para unirse tanto a CD28 como a PD-L1.

Se estableció un ensayo de unión basado en ELISA incorporando la variante de ECD de CD80 A91G-Fc unida a placa para evaluar la capacidad de CD80 para unirse simultáneamente a CD28 y PD-L1. Se recubrieron placas de ELISA Maxisorp de 96 pocillos (Nunc, EE. UU.) toda la noche con una concentración 100 nM de proteína de fusión variante de ECD de CD80 A91G-Fc recombinante humana en PBS. Al día siguiente, la proteína no unida se retiró por lavado y la placa se bloqueó con albúmina de suero bovino al 1 % (Millipore, EE. UU.)/PBS durante 1 hora a temperatura ambiente. Este reactivo de bloqueo se retiró lavando tres veces con PBS/Tween al 0,05 %, que incluyó una incubación de dos minutos en un agitador de plataforma para cada lavado.

- En un brazo del ensayo de competición, se incubó CD80 con CD28, y luego se evaluó la unión competitiva de CD80 unido a CD28 en presencia de las otras contraestructuras de ligando de CD80 conocidas PD-L1 o CTLA-4 o ligando de control negativo PD-L2. Específicamente, la proteína de fusión de CD28 Fc humana recombinante biotinilada (rCD28.Fc; R&D Systems) se tituló en los pocillos comenzando a 10 nM, diluyendo para ocho puntos con diluciones 1:2 en un volumen de 25 µl. Inmediatamente después de añadir la rCD28.Fc biotinilada, se añadieron a los pocillos los ligantes competitivos no marcados, proteína recombinante humana PD-L1 monomérica etiquetada con his, proteína recombinante humana CTLA-4 monomérica etiquetada con his, o una proteína de fusión PD-L2 Fc recombinante humana de control negativo (R&D Systems) a 2.000/1.000/500 nM respectivamente en un volumen de 25 µl para un volumen final de 50 µl. Estas proteínas se incubaron juntas durante una hora antes de repetir las tres etapas de lavado

como se ha descrito anteriormente.

Después del lavado, se diluyeron 2,5 ng por pocillo de estreptavidina conjugada con HRP (Jackson Immunoresearch, EE. UU.) en BSA al 1 %/PBS y se añadieron a los pocillos para detectar rCD28.Fc biotinilada unida. Después de una hora de incubación, los pocillos se lavaron de nuevo tres veces como se ha descrito anteriormente. Para detectar la señal, se añadieron 50 μ l de sustrato TMB (Pierce, EE. UU.) a los pocillos tras el lavado y se incubó durante 7 minutos, antes de añadir 50 μ l de disolución de parada de ácido sulfúrico 2M. La densidad óptica se determinó en un lector de microplacas Emax Plus (Molecular Devices, EE. UU.). Los valores de densidad óptica se representaron gráficamente en Prism (Graphpad, EE. UU.).

Los resultados se muestran en la FIG. 1A. Los resultados mostraron una unión disminuida de rCD28.Fc biotinilada a la proteína de fusión variante de ECD de CD80 A91G-Fc con titulación de la rCD28.Fc. Cuando se realizó la unión de rCD28.Fc en presencia de la proteína de control no competitiva, rPDL2, no hubo disminución en la unión de CD28 para CD80 (triángulo sólido). Por el contrario, una proteína de control competitiva, rCTLA-4, cuando se incubó con CD28.Fc, dio como resultado una disminución de la unión de CD28 para CD80 como se esperaba (línea x). Cuando se incubó PD-L1 recombinante con CD28.Fc, no se observó disminución en la unión de CD28 a CD80, lo que demostró que los epítopos de CD28 y PD-L1 para CD80 no son competitivos. La unión de la proteína PD-L1 recombinante usada en el ensayo de competición de CD28 a CD80 se confirmó incubando la PD-L1 biotinilada en presencia de rCD28.Fc no biotinilada (cuadrado).

También se estableció la competencia inversa en la que se incubó CD80 con PD-L1, y se evaluó entonces la unión competitiva de CD80 unido a PD-L1 en presencia de las otras contraestructuras de ligando de CD80 conocidas CD28 o CTLA-4 o el ligando de control negativo PD-L2. Específicamente, el ensayo se realizó titulando la proteína monomérica PD-L1-his humana recombinante biotinilada en pocillos que contenían la variante de CD80 recombinante. Debido a que la unión es más débil con este ligando, las titulaciones comenzaron a 5.000 nM con diluciones similares 1:2 en ocho puntos en 25 μ L. Cuando se utilizó rPD-L1-his para detectar la unión, se añadieron los ligandos competitivos rCD28.Fc humana, rCTLA-4.Fc humana o el rPD-L2.Fc humano a una concentración final de 2,5 nM en 25 μ l para un volumen total de 50 μ l. Los lavados, la detección y las mediciones de DO posteriores fueron los mismos que los descritos anteriormente.

Los resultados se muestran en la FIG. 1B. La unión de PD-L1-his titulada sola confirmó que PD-L1 se unía a la molécula de fusión variante de ECD de CD80 A91G-Fc inmovilizada en la placa (cuadrado). Cuando se realizó la unión de PD-L1-his en presencia de la proteína de control no competitiva, rPDL2, no hubo disminución en la unión de PD-L1 para CD80 (triángulo). La proteína de control competitiva de CD28, rCTLA-4, cuando se incubó con PD-L1-his, no dio como resultado una disminución de la unión de PD-L1 para CD80 (línea x), aunque CTLA-4 es competitiva para CD28. Este resultado demostró además la falta de competencia entre CD28 y PD-L1 por la unión a CD80. Finalmente, cuando se incubó PD-L1-his con CD28.Fc, no se observó disminución en la unión de PD-L1 a CD80, lo que demostró que los epítopos de CD28 y PD-L1 para CD80 no son competitivos.

Por lo tanto, los resultados mostraron que CTLA-4, pero no PD-L1 o el control negativo PD-L2, competían por la unión de CD28 a CD80 (FIG. 1A) y que CD28, CTLA-4 y PD-L2 no competían para la unión de PD-L1 a CD80 (FIG. 1B). Por tanto, estos resultados demostraron que CD28 y PD-L1 son ligantes no competitivos de CD80, y que esta unión no competitiva puede demostrarse independientemente de qué ligando se esté detectando en el ELISA.

Ejemplo 8

Generación y evaluación de moléculas apiladas que contienen diferentes dominios con afinidad modificada

Se usaron moléculas variantes seleccionadas descritas anteriormente a las que se modificó la afinidad para uno o más ligandos de contraestructura para generar una molécula "apilada" (es decir, proteína inmunomoduladora de Tipo II) que contenía dos o más dominios de IgSF con afinidad modificada. Las construcciones apiladas se obtuvieron como bloques de genes (Integrated DNA Technologies, Coralville, IA) que codifican el apilamiento en un formato que permite su fusión a Fc mediante ensamblaje estándar de Gibson utilizando un kit de ensamblaje Gibson (New England Biolabs).

La molécula de ácido nucleico codificante de todos los apilamientos se generó para codificar una proteína diseñada de la siguiente manera: péptido señal, seguido de la primera IgV variante de interés, seguido de un enlazador de 15 aminoácidos que se compone de tres restos GGGGS (G4S) (SEQ ID NO: 228), seguido del segundo IgV de interés, seguido de dos enlazadores GGGGS (SEQ ID NO: 229) seguido de tres alaninas (AAA), seguido de un Fc de IgG1 humana como se ha descrito anteriormente. Para maximizar la posibilidad de un plegamiento correcto de los dominios de IgV en cada apilamiento, el primer IgV estaba precedido de todos los residuos que normalmente se encuentran en la proteína de tipo salvaje entre este IgV y el péptido señal (secuencia principal). De manera similar, el primer IgV estaba seguido de todos los residuos que normalmente lo conectan en la proteína de tipo salvaje al siguiente dominio de Ig (típicamente un dominio IgC) o si dicho segundo dominio IgV está ausente, los residuos que lo conectan al dominio transmembrana (secuencia final). Se aplicó el mismo principio de diseño al segundo dominio IgV excepto que cuando ambos dominios IgV se derivaron de la misma proteína parental (p. ej., un IgV de CD80 apilado con otro IgV de CD80), el enlazador entre ambos no se duplicó.

La Tabla 9 muestra el diseño de construcciones apiladas ejemplares. Las moléculas apiladas ejemplares mostradas

en la Tabla 9 contienen los dominios IgV como se indica y adicionalmente secuencias líder o finales como se ha descrito anteriormente. En la tabla, los siguientes componentes están presentes en orden: péptido señal (SP; SEQ ID NO: 225), dominio 1 de IgV (IgV1), secuencia final 1 (TS1), enlazador 1 (LR1; SEQ ID NO: 228), dominio 2 de IgV (IgV2), secuencia final 2 (TS2), enlazador 2 (LR2; SEQ ID NO: 230) y dominio Fc (SEQ ID NO: 226 que contiene la sustitución de aminoácidos C5S/N82G). En algunos casos, está presente una secuencia líder 1 (LS1) entre el péptido señal e IgV1 y, en algunos casos, está presente una secuencia líder 2 (LS2) entre el enlazador e IgV2.

Tabla 9: Secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO) de componentes de construcciones apiladas ejemplares

	SP	Primer dominio			Segundo dominio			LR2	Fc
		LS1	IgV1	TS1	LS2	IgV2	TS2		
Nkp30 WT ICOSL WT	+	-	SEQ ID NO: 214	SEQ ID NO: 235	+	-	SEQ ID NO: 196	SEQ ID NO: 233	+
Nkp30_30V/A60V/S64P/S86G	+	-	SEQ ID NO: 215	SEQ ID NO: 235	+	-	SEQ ID NO: 212	SEQ ID NO: 233	+
ICOSL N52S/N57Y/H94D/L96F/Q100R	+	-	SEQ ID NO: 215	SEQ ID NO: 235	+	-	SEQ ID NO: 199	SEQ ID NO: 233	+
Nkp30_30V/A60V/S64P/S86G	+	-	SEQ ID NO: 215	SEQ ID NO: 235	+	-	SEQ ID NO: 201	SEQ ID NO: 233	+
ICOSL N52D	+	-	SEQ ID NO: 196	SEQ ID NO: 233	+	-	SEQ ID NO: 214	SEQ ID NO: 235	+
Nkp30 WT	+	-	SEQ ID NO: 199	SEQ ID NO: 233	+	-	SEQ ID NO: 215	SEQ ID NO: 235	+
ICOSL N52D	+	-	SEQ ID NO: 201	SEQ ID NO: 233	+	-	SEQ ID NO: 215	SEQ ID NO: 235	+
Nkp30_30V/A60V/S64P/S86G	+	-	SEQ ID NO: 199	SEQ ID NO: 233	+	-	SEQ ID NO: 214	SEQ ID NO: 235	+
ICOSL N52H/N57Y/Q100P	+	-	SEQ ID NO: 214	SEQ ID NO: 235	+	-	SEQ ID NO: 215	SEQ ID NO: 235	+
Nkp30_30V/A60V/S64P/S86G	+	-	SEQ ID NO: 214	SEQ ID NO: 235	+	-	SEQ ID NO: 215	SEQ ID NO: 235	+
Dominio 1: Nkp30 WT	+	-	SEQ ID NO: 214	SEQ ID NO: 235	+	-	SEQ ID NO: 152	SEQ ID NO: 231	+
Dominio 2: CD80 WT	+	-	SEQ ID NO: 214	SEQ ID NO: 235	+	-	SEQ ID NO: 220	SEQ ID NO: 237	+
Dominio 1: Nkp30 WT	+	-	SEQ ID NO: 215	SEQ ID NO: 235	+	-	SEQ ID NO: 192	SEQ ID NO: 231	+
Dominio 2: CD86 WT	+	-	SEQ ID NO: 215	SEQ ID NO: 235	+	-	SEQ ID NO: 175	SEQ ID NO: 231	+
Dominio 1: Nkp30 L30V/A60V/S64P/S86G	+	-	SEQ ID NO: 152	SEQ ID NO: 231	+	-	SEQ ID NO: 214	SEQ ID NO: 235	+
Dominio 2: CD80 R29H/Y31H/T41G/Y87N/E88G/K89E/D90N/A91G/P109S	+	-	SEQ ID NO: 215	SEQ ID NO: 235	+	-	SEQ ID NO: 214	SEQ ID NO: 235	+
Dominio 1: Nkp30 L30V/A60V/S64P/S86G	+	-	SEQ ID NO: 152	SEQ ID NO: 231	+	-	SEQ ID NO: 214	SEQ ID NO: 235	+
Dominio 2: CD80 I67T/L70Q/A91G/T120S	+	-	SEQ ID NO: 215	SEQ ID NO: 235	+	-	SEQ ID NO: 175	SEQ ID NO: 231	+
Dominio 1: Nkp30 L30V/A60V/S64P/S86G	+	-	SEQ ID NO: 152	SEQ ID NO: 231	+	-	SEQ ID NO: 221	SEQ ID NO: 236	+
Dominio 2: Nkp30 H90L/Q102 H	+	-	SEQ ID NO: 152	SEQ ID NO: 231	+	-	SEQ ID NO: 192	SEQ ID NO: 231	+
Dominio 1: CD86 WT	+	-	SEQ ID NO: 220	SEQ ID NO: 237	+	-	SEQ ID NO: 214	SEQ ID NO: 235	+
Dominio 2: Nkp30 WT	+	-	SEQ ID NO: 192	SEQ ID NO: 231	+	-	SEQ ID NO: 215	SEQ ID NO: 235	+
Dominio 1: CD86 WT	+	-	SEQ ID NO: 175	SEQ ID NO: 235	+	-	SEQ ID NO: 214	SEQ ID NO: 235	+
Dominio 2: Nkp30 WT	+	-	SEQ ID NO: 175	SEQ ID NO: 235	+	-	SEQ ID NO: 215	SEQ ID NO: 235	+
Dominio 1: CD80 R29HY31HT41G/Y87N/E88G/K89E/D90N/A91G/P109S	+	-	SEQ ID NO: 192	SEQ ID NO: 231	+	-	SEQ ID NO: 214	SEQ ID NO: 235	+
Dominio 2: Nkp30 L30V/A60V/S64P/S86G	+	-	SEQ ID NO: 175	SEQ ID NO: 235	+	-	SEQ ID NO: 215	SEQ ID NO: 235	+
Dominio 1: CD80 I67T/L70Q/A91G/T120S	+	-	SEQ ID NO: 152	SEQ ID NO: 231	+	-	SEQ ID NO: 214	SEQ ID NO: 235	+

Tabla 9: Secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO) de componentes de construcciones apiladas ejemplares

	SP	Primer dominio			Segundo dominio			LR2	Fc
		LS1	IgV1	TS1	LS2	IgV2	TS2		
Dominio 2: NKp30 L30V/A60V/S64P/S86G		SEQ ID NO: SEQ ID NO: 236		231		215	235		
Dominio 1: CD86 Q35H/H90L/Q102H	+	SEQ ID NO: SEQ ID NO: 221	SEQ ID NO: 237	+	-	SEQ ID NO: 215	SEQ ID NO: 235	+	+
Dominio 2: NKp30 L30V/A60V/S64P/S86G									
Dominio 1: CD80 WT	+	-	SEQ ID NO: 152	SEQ ID NO: 231	+	-	SEQ ID NO: 196	SEQ ID NO: 233	+
Dominio 2: ICOSL WT									
Dominio 1: CD80 WT	+	-	SEQ ID NO: 152	SEQ ID NO: 231	+	SEQ ID NO: 236	SEQ ID NO: 220	SEQ ID NO: 237	+
Dominio 2: CD80 WT									
Dominio 1: CD86 WT	+	-	SEQ ID NO: 152	SEQ ID NO: 231	+	-	SEQ ID NO: 152	SEQ ID NO: 231	+
Dominio 2: CD86 WT									
Dominio 1: CD80 E88D/K89R/D90K/A91G/F92Y/K93R	+	-	SEQ ID NO: 189	SEQ ID NO: 231	+	-	SEQ ID NO: 192	SEQ ID NO: 231	+
Dominio 2: CD80 R29H/Y31H/T41G/Y87N/E88G/K89E/D90N/A91G/P109S									
Dominio 1: CD80 A12T/H18L/N43V/F59L/E77K/P109S/I118T	+	-	SEQ ID NO: 193	SEQ ID NO: 231	+	-	SEQ ID NO: 192	SEQ ID NO: 231	+
Dominio 2: CD80 R29H/Y31H/T41G/Y87N/E88G/K89E/D90N/A91G/P109S									
Dominio 1: CD80 A12T/H18L/N43V/F59L/E77K/P109S/I118T	+	-	SEQ ID NO: 193	SEQ ID NO: 231	+	-	SEQ ID NO: 175	SEQ ID NO: 231	+
Dominio 2: CD80 A12T/H18L/N43V/F59L/E77K/P109S/I118T									
Dominio 1: CD80 E88D/K89R/D90K/A91G/F92Y/K93R	+	-	SEQ ID NO: 189	SEQ ID NO: 231	+	SEQ ID NO: 236	SEQ ID NO: 221	SEQ ID NO: 237	+
Dominio 2: CD86 Q35H/H90L/Q102H									
Dominio 1: CD80 A12T/H18L/N43V/F59L/E77K/P109S/I118T	+	-	SEQ ID NO: 193	SEQ ID NO: 231	+	SEQ ID NO: 236	SEQ ID NO: 221	SEQ ID NO: 237	+
Dominio 2: CD86 Q35H/H90L/Q102H									
Dominio 1: CD80 E88D/K89R/D90K/A91G/F92Y/K93R	+	-	SEQ ID NO: 189	SEQ ID NO: 231	+	-	SEQ ID NO: 213	SEQ ID NO: 233	+
Dominio 2: ICOSL N52S/N57Y/H94D/L96F/L98F/Q100R/G103E/F120S									
Dominio 1: CD80 A12T/H18L/N43V/F59L/E77K/P109S/I118T	+	-	SEQ ID NO: 193	SEQ ID NO: 231	+	-	SEQ ID NO: 213	SEQ ID NO: 233	+
Dominio 2: ICOSL N52S/N57Y/H94D/L96F/L98F/Q100R/G103E/F120S									
Dominio 1: CD80 A12T/H18L/N43V/F59L/E77K/P109S/I118T	+	-	SEQ ID NO: 193	SEQ ID NO: 231	+	-	SEQ ID NO: 199	SEQ ID NO: 233	+
Dominio 2: ICOSL N52D									
Dominio 1: CD80 E88D/K89R/D90K/A91G/F92Y/K93R	+	-	SEQ ID NO: 189	SEQ ID NO: 231	+	-	SEQ ID NO: 201	SEQ ID NO: 233	+
Dominio 2: ICOSL N52H/N57Y/Q100P									
Dominio 1: CD80 A12T/H18L/N43V/F59L/E77K/P109S/I118T	+	-	SEQ ID NO: 193	SEQ ID NO: 231	+	-	SEQ ID NO: 201	SEQ ID NO: 233	+
Dominio 2: ICOSL N52H/N57Y/Q100P									

Tabla 9: Secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO) de componentes de construcciones apiladas ejemplares

	SP	Primer dominio			Segundo dominio			LR2	Fc
		LS1	IgV1	TS1	LS2	IgV2	TS2		
Dominio 1: ICOSL WT		+	-	SEQ ID NO: 196	SEQ ID NO: 233	+	-	SEQ ID NO: 152	SEQ ID NO: 231
Dominio 2: CD80 WT				SEQ ID NO: SEQ ID NO: 236	SEQ ID NO: 220	SEQ ID NO: 237	+	SEQ ID NO: 152	+
Dominio 1: CD86 WT		+		SEQ ID NO: SEQ ID NO: 236	SEQ ID NO: 220	SEQ ID NO: 237	+	SEQ ID NO: 152	SEQ ID NO: 231
Dominio 2: CD80 WT				SEQ ID NO: SEQ ID NO: 192	SEQ ID NO: 231	SEQ ID NO: 189	-	SEQ ID NO: 189	SEQ ID NO: 231
Dominio 1: CD80 R29H/Y31H/T41G/Y87N/E88G/K89E/D90N/A91G/P109S		+		SEQ ID NO: 192	SEQ ID NO: 231	SEQ ID NO: 189	-	SEQ ID NO: 189	SEQ ID NO: 231
Dominio 2: CD80 E88D/K89R/D90K/A91G/F92Y/K93R				SEQ ID NO: 192	SEQ ID NO: 231	SEQ ID NO: 189	+	SEQ ID NO: 189	+
Dominio 1: CD80 R29H/Y31H/T41G/Y87N/E88G/K89E/D90N/A91G/P109S		+	-	SEQ ID NO: 192	SEQ ID NO: 231	SEQ ID NO: 193	-	SEQ ID NO: 193	SEQ ID NO: 231
Dominio 2: CD80 R29H/Y31H/T41G/Y87N/E88G/K89E/D90N/A91G/P109S				SEQ ID NO: 192	SEQ ID NO: 231	SEQ ID NO: 189	-	SEQ ID NO: 189	SEQ ID NO: 231
Dominio 1: CD80 R29H/Y31H/T41G/Y87N/E88G/K89E/D90N/A91G/P109S		+	-	SEQ ID NO: 175	SEQ ID NO: 231	SEQ ID NO: 189	-	SEQ ID NO: 189	SEQ ID NO: 231
Dominio 2: CD80 A12T/H18L/N43V//F59L/E77K/P109S/I118T				SEQ ID NO: 175	SEQ ID NO: 231	SEQ ID NO: 193	+	SEQ ID NO: 193	+
Dominio 1: CD80 I67T/L70Q/A91G/T120S		+	-	SEQ ID NO: 175	SEQ ID NO: 231	SEQ ID NO: 193	-	SEQ ID NO: 193	+
Dominio 2: CD80 A12T/H18L/N43V//F59L/E77K/P109S/I118T				SEQ ID NO: 175	SEQ ID NO: 231	SEQ ID NO: 193	+	SEQ ID NO: 193	+
Dominio 1: CD80 E88D/K89R/D90K/A91G/F92Y/K93R		+		SEQ ID NO: SEQ ID NO: 221	SEQ ID NO: 237	SEQ ID NO: 189	-	SEQ ID NO: 189	SEQ ID NO: 231
Dominio 2: CD80 A12T/H18L/N43V//F59L/E77K/P109S/I118T				SEQ ID NO: SEQ ID NO: 221	SEQ ID NO: 237	SEQ ID NO: 193	-	SEQ ID NO: 193	SEQ ID NO: 231
Dominio 1: CD86 Q35H/H90L/Q102H		+		SEQ ID NO: SEQ ID NO: 221	SEQ ID NO: 237	SEQ ID NO: 189	-	SEQ ID NO: 189	SEQ ID NO: 231
Dominio 2: CD80 A12T/H18L/N43V//F59L/E77K/P109S/I118T				SEQ ID NO: SEQ ID NO: 221	SEQ ID NO: 237	SEQ ID NO: 193	-	SEQ ID NO: 193	SEQ ID NO: 231
Dominio 1: ICOSL N52S/N57Y//H94D/L96F/L98F/Q100R/G103E/F120S		+	-	SEQ ID NO: 213	SEQ ID NO: 233	SEQ ID NO: 189	-	SEQ ID NO: 189	SEQ ID NO: 231
Dominio 2: CD80 E88D/K89R/D90K/A91G/F92Y/K93R				SEQ ID NO: 213	SEQ ID NO: 233	SEQ ID NO: 193	-	SEQ ID NO: 193	SEQ ID NO: 231
Dominio 1: ICOSL N52S/N57Y//H94D/L96F/L98F/Q100R/G103E/F120S		+	-	SEQ ID NO: 213	SEQ ID NO: 233	SEQ ID NO: 189	-	SEQ ID NO: 189	SEQ ID NO: 231
Dominio 2: CD80 A12T/H18L/N43V//F59L/E77K/P109S/I118T				SEQ ID NO: 213	SEQ ID NO: 233	SEQ ID NO: 193	-	SEQ ID NO: 193	SEQ ID NO: 231
Dominio 1: ICOSL N52D		+	-	SEQ ID NO: 199	SEQ ID NO: 233	SEQ ID NO: 189	-	SEQ ID NO: 189	SEQ ID NO: 231
Dominio 2: CD80 E88D/K89R/D90K/A91G/F92Y/K93R				SEQ ID NO: 199	SEQ ID NO: 233	SEQ ID NO: 193	-	SEQ ID NO: 193	SEQ ID NO: 231
Dominio 1: ICOSL N52D		+	-	SEQ ID NO: 199	SEQ ID NO: 233	SEQ ID NO: 189	-	SEQ ID NO: 189	SEQ ID NO: 231
Dominio 2: CD80 A12T/H18L/N43V//F59L/E77K/P109S/I118T				SEQ ID NO: 199	SEQ ID NO: 233	SEQ ID NO: 189	-	SEQ ID NO: 189	SEQ ID NO: 231
Dominio 1: ICOSL N52H/N57Y/Q100P		+	-	SEQ ID NO: 201	SEQ ID NO: 233	SEQ ID NO: 189	-	SEQ ID NO: 189	SEQ ID NO: 231
Dominio 2: CD80 E88D/K89R/D90K/A91G/F92Y/K93R				SEQ ID NO: 201	SEQ ID NO: 233	SEQ ID NO: 193	-	SEQ ID NO: 193	SEQ ID NO: 231
Dominio 1: ICOSL N52H/N57Y/Q100P		+	-	SEQ ID NO: 201	SEQ ID NO: 233	SEQ ID NO: 189	-	SEQ ID NO: 189	SEQ ID NO: 231
Dominio 2: CD80 A12T/H18L/N43V//F59L/E77K/P109S/I118T				SEQ ID NO: 201	SEQ ID NO: 233	SEQ ID NO: 193	-	SEQ ID NO: 193	SEQ ID NO: 231
Dominio 1: CD80 V68M/L70P/L72P/K86E		+	-	SEQ ID NO: 195	SEQ ID NO: 231	SEQ ID NO: 189	-	SEQ ID NO: 189	SEQ ID NO: 231
Dominio 2: CD80 E88D/K89R/D90K/A91G/F92Y/K93R				SEQ ID NO: 195	SEQ ID NO: 231	SEQ ID NO: 189	-	SEQ ID NO: 189	SEQ ID NO: 231

Tabla 9: Secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO) de componentes de construcciones apiladas ejemplares

	SP	Primer dominio			Segundo dominio			LR2	Fc
		LS1	IgV1	TS1	LS2	IgV2	TS2		
Dominio 1: CD80 R29/Y31F/K36G/M38L/N43Q/E81R/V83I/L85I/K89R/D90L/A91E/F92N/K93Q/R94G	+	-	SEQ ID NO: 194	SEQ ID NO: 231	+	-	SEQ ID NO: 189	SEQ ID NO: 231	+
Dominio 2: CD80 E88D/K89R/D90K/A91G/F92Y/K93R									
Dominio 1: CD80 V68M/L70P/L72P/K86E	+	-	SEQ ID NO: 195	SEQ ID NO: 231	+	-	SEQ ID NO: 193	SEQ ID NO: 231	+
Dominio 2: CD80 A12T/H18L/N43V//F59I/E77K/P109S/I118T									
Dominio 1: CD80 R29/Y31F/K36G/M38L/N43Q/E81R/V83I/L85I/K89R/D90L/A91E/F92N/K93Q/R94G	+	-	SEQ ID NO: 194	SEQ ID NO: 231	+	-	SEQ ID NO: 193	SEQ ID NO: 231	+
Dominio 2: CD80 E88D/K89R/D90K/A91G/F92Y/K93R									
Dominio 1: CD80 R29/Y31F/K36G/M38L/N43Q/E81R/V83I/L85I/K89R/D90L/A91E/F92N/K93Q/R94G	+	-	SEQ ID NO: 189	SEQ ID NO: 231	+	-	SEQ ID NO: 195	SEQ ID NO: 231	+
Dominio 2: CD80 V68M/L70P/L72P/K86E									
Dominio 1: CD80 A12T/H18L/N43V//F59I/E77K/P109S/I118T	+	-	SEQ ID NO: 193	SEQ ID NO: 231	+	-	SEQ ID NO: 195	SEQ ID NO: 231	+
Dominio 2: CD80 E88D/K89R/D90K/A91G/F92Y/K93R									
Dominio 1: CD80 R29/Y31F/K36G/M38L/N43Q/E81R/V83I/L85I/K89R/D90L/A91E/F92N/K93Q/R94G	+	-	SEQ ID NO: 193	SEQ ID NO: 231	+	-	SEQ ID NO: 195	SEQ ID NO: 231	+
Dominio 2: CD80 A12T/H18L/N43V//F59I/E77K/P109S/I118T									
Dominio 1: CD80 R29/Y31F/K36G/M38L/N43Q/E81R/V83I/L85I/K89R/D90L/A91E/F92N/K93Q/R94G	+	-	SEQ ID NO: 193	SEQ ID NO: 231	+	-	SEQ ID NO: 194	SEQ ID NO: 231	+
Dominio 2: CD80 E88D/K89R/D90K/A91G/F92Y/K93R									
Dominio 1: CD86 WT									
Dominio 2: ICOSL WT									
Dominio 1: CD80 R29H/Y31H/T41G/Y87N/E88G/K89E/D90N/A91G/P109S	+	-	SEQ ID NO: 192	SEQ ID NO: 231	+	-	SEQ ID NO: 196	SEQ ID NO: 233	+
Dominio 2: ICOSL N52S/N57Y/H94D/L96F/L98F/Q100R/G103E/F120S									
Dominio 1: CD80 I67T/L70Q/A91G/T120S	+	-	SEQ ID NO: 175	SEQ ID NO: 231	+	-	SEQ ID NO: 213	SEQ ID NO: 233	+
Dominio 2: ICOSL N52S/N57Y/H94D/L96F/L98F/Q100R/G103E/F120S									
Dominio 1: CD80 R29H/Y31H/T41G/Y87N/E88G/K89E/D90N/A91G/P109S	+	-	SEQ ID NO: 192	SEQ ID NO: 231	+	-	SEQ ID NO: 199	SEQ ID NO: 233	+
Dominio 2: ICOSL N52D									
Dominio 1: CD80 I67T/L70Q/A91G/T120S	+	-	SEQ ID NO: 175	SEQ ID NO: 231	+	-	SEQ ID NO: 199	SEQ ID NO: 233	+
Dominio 2: ICOSL N52D									
Dominio 1: CD80 R29H/Y31H/T41G/Y87N/E88G/K89E/D90N/A91G/P109S	+	-	SEQ ID NO: 192	SEQ ID NO: 231	+	-	SEQ ID NO: 201	SEQ ID NO: 233	+
Dominio 2: ICOSL N52H/N57Y/Q100 P									
Dominio 1: CD80 I67T/L70Q/A91G/T120S	+	-	SEQ ID NO: 175	SEQ ID NO: 231	+	-	SEQ ID NO: 201	SEQ ID NO: 233	+
Dominio 2: ICOSL N52H/N57Y/Q100 P									

Tabla 9: Secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO) de componentes de construcciones apiladas ejemplares

	SP	Primer dominio			Segundo dominio			LR2	Fc
		LS1	IgV1	TS1	LS2	IgV2	TS2		
Dominio 1: CD86 Q35H/H90L/Q102H		SEQ ID NO: 236	SEQ ID NO: 221	SEQ ID NO: 237	-	SEQ ID NO: 213	SEQ ID NO: 233	+	+
Dominio 2: ICOSL N52S/N57Y/H94D/L96F/L98F/Q100R/G103E/F120S		SEQ ID NO: 236	SEQ ID NO: 221	SEQ ID NO: 237	-	SEQ ID NO: 199	SEQ ID NO: 233	+	+
Dominio 1: CD86 Q35H/H90L/Q102H		SEQ ID NO: 236	SEQ ID NO: 221	SEQ ID NO: 237	+	SEQ ID NO: 201	SEQ ID NO: 233	+	+
Dominio 2: ICOSL N52H/N57Y/Q100P		SEQ ID NO: 236	SEQ ID NO: 221	SEQ ID NO: 237	-	SEQ ID NO: 201	SEQ ID NO: 233	+	+
Dominio 1: ICOSL WT		-	SEQ ID NO: 196	SEQ ID NO: 233	+	SEQ ID NO: 220	SEQ ID NO: 237	+	+
Dominio 2: CD86 WT		-	SEQ ID NO: 196	SEQ ID NO: 233	+	SEQ ID NO: 236	SEQ ID NO: 220	+	+
Dominio 1: ICOSL N52S/N57Y/H94D/L96F/L98F/Q100R/G103E/F120S		-	SEQ ID NO: 213	SEQ ID NO: 233	+	SEQ ID NO: 192	SEQ ID NO: 231	+	+
Dominio 2: CD80 R29H/Y31H/T41G/Y87N/E88G/K89E/D90N/A91G/P109S		-	SEQ ID NO: 213	SEQ ID NO: 233	+	SEQ ID NO: 175	SEQ ID NO: 231	+	+
Dominio 1: ICOSL N52S/N57Y/H94D/L96F/L98F/Q100R/G103E/F120S		-	SEQ ID NO: 213	SEQ ID NO: 233	+	SEQ ID NO: 192	SEQ ID NO: 231	+	+
Dominio 2: CD80 I67T/L70Q/A91G/T120S		-	SEQ ID NO: 213	SEQ ID NO: 233	+	SEQ ID NO: 175	SEQ ID NO: 231	+	+
Dominio 1: ICOSL N52D		-	SEQ ID NO: 199	SEQ ID NO: 233	+	SEQ ID NO: 192	SEQ ID NO: 231	+	+
Dominio 2: CD80 R29H/Y31H/T41G/Y87N/E88G/K89E/D90N/A91G/P109S		-	SEQ ID NO: 199	SEQ ID NO: 233	+	SEQ ID NO: 175	SEQ ID NO: 231	+	+
Dominio 1: ICOSL N52D		-	SEQ ID NO: 199	SEQ ID NO: 233	+	SEQ ID NO: 192	SEQ ID NO: 231	+	+
Dominio 2: CD80 I67T/L70Q/A91G/T120S		-	SEQ ID NO: 199	SEQ ID NO: 233	+	SEQ ID NO: 192	SEQ ID NO: 231	+	+
Dominio 1: ICOSL N52H/N57Y/Q100P		-	SEQ ID NO: 201	SEQ ID NO: 233	+	SEQ ID NO: 192	SEQ ID NO: 231	+	+
Dominio 2: CD80 R29H/Y31H/T41G/Y87N/E88G/K89E/D90N/A91G/P109S		-	SEQ ID NO: 201	SEQ ID NO: 233	+	SEQ ID NO: 192	SEQ ID NO: 231	+	+
Dominio 1: ICOSL N52S/N57Y/H94D/L96F/L98F/Q100R/G103E/F120S		-	SEQ ID NO: 213	SEQ ID NO: 233	+	SEQ ID NO: 221	SEQ ID NO: 237	+	+
Dominio 2: CD86 Q35H/H90L/Q102H		-	SEQ ID NO: 213	SEQ ID NO: 233	+	SEQ ID NO: 221	SEQ ID NO: 237	+	+
Dominio 1: ICOSL N52D		-	SEQ ID NO: 199	SEQ ID NO: 233	+	SEQ ID NO: 221	SEQ ID NO: 237	+	+
Dominio 2: CD86 Q35H/H90L/Q102H		-	SEQ ID NO: 199	SEQ ID NO: 233	+	SEQ ID NO: 221	SEQ ID NO: 237	+	+
Dominio 1: ICOSL N52H/N57Y/Q100P		-	SEQ ID NO: 201	SEQ ID NO: 233	+	SEQ ID NO: 221	SEQ ID NO: 237	+	+
Dominio 2: CD86 Q35HH/H90L/Q102H		-	SEQ ID NO: 201	SEQ ID NO: 233	+	SEQ ID NO: 221	SEQ ID NO: 237	+	+

- Se generó la expresión y purificación de alto rendimiento de las moléculas de fusión Fc apiladas con IgV variantes que contienen diversas combinaciones de dominios IgV variantes de CD80, CD86, ICOSL o Nkp30 que contienen al menos un dominio IgV con afinidad modificada como se describe en el Ejemplo 5. También se evaluaron moléculas de fusión variantes de IgV-Fc apiladas a las respectivas contraestructuras y la actividad funcional mediante un ensayo de coinmovilización anti-CD3 como se describe en el Ejemplo 6. Por ejemplo, se determinó la bioactividad coestimuladora de las proteínas de fusión IgSF Fc apiladas en un ensayo similar con anti-CD3 inmovilizado como anteriormente. En este caso, se coinmovilizó 4 nM de anti-CD3 (OKT3, Biolegend, EE. UU.) con 4 nM a 120 nM de rB7-H6.Fc humano (R&D Systems, EE. UU.) o rPD-L1.Fc humano (R&D Systems, EE. UU.) toda la noche en placas de 96 pocillos de cultivo tisular tratadas (Corning, EE. UU.). Al día siguiente, la proteína no unida se retiró por lavado con PBS y se añadieron 100.000 células T generales purificadas a cada pocillo en 100 μ l de medio Ex-Vivo 15 (Lonza, Suiza). Los dominios de IgSF apilados se añadieron posteriormente a concentraciones que oscilaban entre 8 nM y 40 nM en un volumen de 100 μ l para un volumen total de 200 μ l. Las células se cultivaron 3 días antes de recoger los sobrenadantes de los cultivos y medir los niveles de IFN-gamma humano con el kit de ELISA Duoset (R&D Systems, EE. UU.) como se ha mencionado anteriormente.
- 5 Los resultados se muestran en las Tablas 10-14. Específicamente, la Tabla 10 muestra los resultados de unión y de actividad funcional para las moléculas de fusión Fc apiladas con IgV variantes que contienen un dominio IgV de NKp30 y un dominio IgV de ICOSL. La Tabla 11 muestra los resultados de unión y de actividad funcional para las moléculas de fusión Fv apiladas con IgV variantes que contienen un dominio IgV de Nkp30 y un dominio IgV de CD80 o CD86. La Tabla 12 muestra los resultados de unión y de actividad funcional para las moléculas de fusión Fc apiladas de IgV variantes que contienen un dominio IgV de CD80 variante y un dominio IgV de CD80, CD86 o ICOSL. La Tabla 13 muestra los resultados de unión y de actividad funcional para las moléculas de fusión Fc apiladas con IgV variantes que contienen dos dominios IgV de CD80 variantes. La Tabla 14 muestra los resultados para las moléculas de fusión Fc apiladas con IgV variantes que contienen un dominio IgV de CD80 o CD86 variante y un dominio IgV de ICOSL variante.
- 10 15 Para cada una de las Tablas 10-14, la columna 1 indica la organización estructural y la orientación de los dominios apilados, con afinidad modificada o de tipo salvaje (WT) que comienzan con el dominio amino terminal (N terminal), seguido por el dominio medio WT o con afinidad modificada localizado antes de los dominios Fc de IgG1 humana C terminales. La columna 2 muestra el identificador de SEQ ID NO para la secuencia de cada dominio IgV contenido en una molécula "apilada" respectiva. La columna 3 muestra los compañeros de unión contra los que se seleccionaron los dominios apilados con afinidad modificada indicados en la columna 1.
- 20 25 30 35 40 45 50 También se muestra la actividad de unión medida por el valor de intensidad de fluorescencia media (MFI) para la unión de cada molécula de apilada a células preparadas por ingeniería para expresar varios ligandos de contraestructura y la relación de la MFI en comparación con la unión de la molécula apilada correspondiente que contiene dominios IgV no modificados que no contienen la o las sustituciones de aminoácidos al mismo ligando de contraestructura expresado en las células. También se muestra la actividad funcional de las moléculas apiladas variantes para modular la actividad de las células T en base a los niveles calculados de IFN-gamma en los sobrenadantes de los cultivos (pg/ml) generados con la molécula apilada variante indicada en disolución y el ligando apropiado coinmovilizado con anti-CD3 como se describe en el Ejemplo 6. Las Tablas también representan la relación de IFN-gamma producido por cada molécula apilada variante en comparación con la molécula apilada no modificada correspondiente en el ensayo de coinmovilización.
- 55 Como se muestra, los resultados mostraron que era posible generar moléculas apiladas que contienen al menos un dominio de IgSF variante que exhibe actividad con afinidad modificada de unión aumentada para al menos un ligando de contraestructura afín en comparación con una molécula apilada correspondiente que contiene el dominio IgV respectivo no modificado (p. ej., de tipo salvaje). En algunos casos, la molécula apilada, ya sea de uno o una combinación de ambos dominios de IgSF variantes en la molécula, exhibió un aumento de unión para más de un ligando de contraestructura afín. Los resultados también mostraron que el orden de los dominios IgV en las moléculas apiladas podría, en algunos casos, alterar el grado de actividad de unión mejorada. En algunos casos, la actividad funcional de las células T también se alteró cuando se evaluó en el ensayo de coinmovilización dirigida.

TABLA 10: Proteínas de fusión Fc IgV variantes apiladas que contienen un dominio IgV de NKp30 y un dominio IgV de ICOSL

Estructura de dominio N terminal a C terminal: dominio 1/dominio 2/Fc	SEQ ID NO (IgV)	Contraestructura frente a la que se seleccionó	Actividad de unión			Ensayo de coinmovilización con anti-CD3 pg/ml de IFN-gamma (relación de IFN-gamma parental WT)
			MFI B7H6 (relación de MFI parental WT)	MFI ICOS (relación de MFI parental WT)	MFI CD28 (relación de MFI parental WT)	
Dominio 1: NKp30 WT	214	-	64.538	26.235	6.337	235
Dominio 2: ICOSL WT	196	-	(1,00)	(1,00)	(1,00)	(1,00)
Dominio 1: NKp30 (L30V A60V S64P S86G)	215	B7-H6	59.684	12.762	9.775	214
Dominio 2: ICOSL (N52S N57Y H94D L96F L98F Q100R)	212	ICOS-CD28	(0,92)	(0,49)	(1,54)	(0,91)
Dominio 1: NKp30 (L30V A60V S64P S86G)	215	B7-H6	65.470	30.272	9.505	219
Dominio 2: ICOSL (N52D)	199	ICOS-CD28	(1,01)	(1,15)	(1,50)	(0,93)
Dominio 1: NKp30 (L30V A60V S64P S86G) /	215	B7-H6	38.153	27.903	11.300	189
Dominio 2: ICOSL (N52H N57Y Q100P)	201	ICOS-CD28	(0,59)	(1,06)	(1,78)	(0,80)
Dominio 1: ICOSL WT	196	-	117.853	70.320	7.916	231
Dominio 2: NKp30 WT	214	-	(1,0)	(1,0)	(1,0)	(1,0)
Dominio 1: ICOSL (N52D)	199	ICOS-CD28	100.396	83.912	20.778	228
Dominio 2: NKp30 (L30V A60V S64P S86G)	215	B7-H6	(0,85)	(1,19)	(2,62)	(0,98)
Dominio 1: ICOSL (N52H N57Y Q100P)	201	ICOS-CD28	82.792	68.874	72.269	561
Dominio 2: NKp30 (L30V A60V S64P S86G)	215	B7-H6	(0,70)	(0,98)	(9,12)	(2,43)

TABLA 11: Proteínas de fusión Fc IgV variantes apiladas que contienen un dominio IgV de NKp30 y un dominio IgV de CD80 o CD86

Estructura de dominio N terminal a C terminal: dominio 1/dominio 2/Fc	SEQ ID NO (IgV)	Contraestructura frente a la que se seleccionó	Actividad de unión			Ensayo de coinmovilización con anti-CD3 pg/ml de IFN-gamma (relación de IFN-gamma parental WT)
			MFI B7H6 (relación de MFI parental WT)	MFI CD28 (relación de MFI parental WT)	Actividad de unión	
Dominio 1: NKp30 WT	214	-	88.823 (1,00)	7.022 (1,00)		68 (1,00)
Dominio 2: CD80 WT	152	-	14.052 (1,00)	1.690 (1,00)		92 (1,00)
Dominio 1: NKp30 WT	214	-	14.052 (1,00)	1.690 (1,00)		92 (1,00)
Dominio 2: CD86 WT	220	-	14.052 (1,00)	1.690 (1,00)		92 (1,00)
Dominio 1: NKp30 (L30V A60V S64P S86G)	215	B7-H6	53.279 (0,60)	9.027 (1,29)		94 (1,38)
Dominio 2: CD80 R29H/Y31H/T41G/Y87N/E8	192	CD28				
8G/K89E/D90N/A91G/P109S						
Dominio 1: NKp30 (L30V A60V S64P S86G)	215	B7-H6	41.370 (0,47)	11.240 (1,60)		60 (0,88)
Dominio 2: CD80 I67T/L70Q/A91G/T120S	175	CD28				
Dominio 1: NKp30 (L30V A60V S64P S86G) /	215	B7-H6	68.480 (4,87)	9.115 (5,39)		110 (1,19)
Dominio 2: CD86 Q35H/H90L/Q102H	221	CD28				
Dominio 1: CD80 WT	152	-	11.0461 (1,00)	13.654 (1,00)		288 (1,00)
Dominio 2: NKp30 WT	214	-				
Dominio 1: CD86 WT	220	CD28	128.899 (1,00)	26.467 (1,00)		213 (1,00)
Dominio 2: NKp30 WT	214	B7-H6				
Dominio 1: CD80 R29H/Y31H/T41G/Y87N/E88G/K89E/D90N/A91G/P 109S	192	CD28	55.727 (0,50)	4.342 (0,32)		100 (0,35)
Dominio 2: NKp30 (L30V A60V S64P S86G)	215	B7-H6				
Dominio 1: CD80 I67T/L70Q/A91G/T120S	175	CD28	40.412 (0,37)	7.094 (0,52)		84 (0,29)
Dominio 2: NKp30 (L30V A60V S64P S86G)	215	B7-H6				
Dominio 1: CD86 Q35H/H90L/Q102H	221	CD28	220836 (1,71)	11590 (0,44)		113 (0,53)
Dominio 2: NKp30 (L30V A60V S64P S86G)	215	B7-H6				

TABLA 12: Proteínas de fusión Fc IgV variantes apiladas que contienen un dominio IgV de CD80 y un dominio IgV de CD80, CD86 o ICOSL

Estructura de dominio N terminal a C terminal: dominio 1/dominio 2/Fc	SEQ ID NO (IgV)	Contraestructura frente a la que se seleccionó	Actividad de unión			Ensayo de coinmovilización con anti-CD3 pg/ml de IFN-gamma (relación de IFN-gamma parental WT)
			MFI CD28 (relación de MFI parental WT)	MFI PD-L1 (relación de MFI parental WT)	MFI ICOS (relación de MFI parental WT)	
Dominio 1: CD80 WT	152		1.230 (1,00)	2.657 (1,00)	11.122 (1,00)	69 (1,00)
Dominio 2: ICOSL WT	196		60.278	2.085		59
Dominio 1: CD80 WT	152					

TABLA 12: Proteínas de fusión Fc IgV variantes apiladas que contienen un dominio IgV de CD80 y un dominio IgV de CD80, CD86 o ICOSL.

Estructura de dominio N terminal a C terminal: dominio 1/dominio 2/Fc	SEQ ID NO (IgV)	Contraestructura frente a la que se seleccionó	Actividad de unión		Ensayo de coinmovilización con anti-CD3 pg/ml de IFN-gamma (relación de IFN-gamma parental WT)
			MFI CD28 (relación de MFI parental WT)	MFI PD-L1 (relación de MFI parental WT)	
Dominio 2: CD86 WT	220		(1,00)	(1,00)	(1,00)
Dominio 1: CD80 WT	152		1.634 (1,00)	6.297 (1,00)	98 (1,00)
Dominio 2: CD80 WT	152				
Dominio 1: CD80 E88D/K89R/D90K/A91G/F92Y/K93R R29H/Y31H/T41G/Y87N/E88G/K89E/D90N/A91G/P109S	189	PD-L1	4.308 (2,64)	4.234 (0,67)	214 (2,18)
Dominio 2: CD80 R29H/Y31H/T41G/Y87N/E88G/K89E/D90N/A91G/P109S	192	CD28			
Dominio 1: CD80 A12T/H18L/N43V/F59L/E77K/P109S/I118T R29H/Y31H/T41G/Y87N/E88G/K89E/D90N/A91G/P109S	193	PD-L1	7.613 (4,66)	2.030 (0,32)	137 (1,40)
Dominio 2: CD80 A12T/H18L/N43V/F59L/E77K/P109S/I118T	192	CD28			
Dominio 1: CD80 A12T/H18L/N43V/F59L/E77K/P109S/I118T	193	PD-L1	3.851 (2,36)	3.657 (0,58)	81 (0,83)
Dominio 2: CD80 A12T/H18L/N43V/F59L/E77K/P109S/I118T	175	CD28			
Dominio 1: CD80 E88D/K89R/D90K/A91G/F92Y/K93R	189	PD-L1	4.117 (0,07)	2.914 (1,40)	96 (1,63)
Dominio 2: CD80 E88D/K89R/D90K/A91G/F92Y/K93R	221	CD28			
Dominio 1: CD80 A12T/H18L/N43V/F59L/E77K/P109S/I118T	193	PD-L1	2.868 (0,05)	3.611 (1,73)	94 (1,60)
Dominio 2: CD80 A12T/H18L/N43V/F59L/E77K/P109S/I118T	221	CD28			
Dominio 1: CD80 E88D/K89R/D90K/A91G/F92Y/K93R	189	PD-L1	3.383 (2,75)	4.515 (1,70)	90 (13,0)
Dominio 2: ICOSL N52S/N57Y/H94D/L96F/Q100R/G103E/F120S	213	ICOSL/CD28			
Dominio 1: CD80 A12T/H18L/N43V/F59L/E77K/P109S/I118T	193	PD-L1	2.230 (1,81)	2.148 (0,81)	3.860 (0,35)
Dominio 2: ICOSL N52S/N57Y/H94D/L96F/Q100R/G103E/F120S	213	ICOSL/CD28			
Dominio 1: CD80 A12T/H18L/N43V/F59L/E77K/P109S/I118T	193	PD-L1 ICOSL/CD28	5.665 (4,61)	6.446 (2,43)	15.730 (1,41)
Dominio 2: ICOSL N52D	199				
Dominio 1: CD80 E88D/K89R/D90K/A91G/F92Y/K93R	189	PD-L1	6.260 (5,09)	4.543 (1,71)	11.995 (1,08)
Dominio 2: ICOSL N52H/N57Y/Q100P	201	ICOSL/CD28			
Dominio 1: CD80 A12T/H18L/N43V/F59L/E77K/P109S/I118T	193	PD-L1	3.359 (2,73)	3.874 (1,46)	8.541 (0,77)
Dominio 2: ICOSL N52H/N57Y/Q100P	201	ICOSL/CD28			
Dominio 1: ICOSL WT	196		3.000 (1,00)	2.966 (1,00)	14.366 (1,00)
Dominio 2: CD80 WT	152				
Dominio 1: CD86 WT	220		4.946 (1,00)	1.517 (1,00)	125 (1,00)
Dominio 2: CD80 WT	152				
Dominio 1: CD80 R29H/Y31H/T41G/Y87N/E8	192	CD28	2.832	3.672	114

TABLA 12: Proteínas de fusión Fc IgV variantes apiladas que contienen un dominio IgV de CD80 y un dominio IgV de CD80, CD86 o ICOSL.

Estructura de dominio N terminal a C terminal: dominio 1/dominio 2/Fc	SEQ ID NO (IgV)	Contraestructura frente a la que se seleccionó	Actividad de unión		Ensayo de coinmovilización con anti-CD3 pg/ml de IFN-gamma (relación de IFN-gamma parental WT)
			MFI CD28 (relación de MFI parental WT)	MFI PD-L1 (relación de MFI parental WT)	
8G/K89E/D90N/A91G/P109S	189	PD-L1	(1,79)	(0,58)	(1,16)
Dominio 2: CD80 E88D/K89R/D90K/A91G/F92Y/K93R	192	CD28	4.542 (2,78)	2.878 (0,45)	142 (1,45)
8G/K89E/D90N/A91G/P109S	193	PD-L1			
Dominio 2: CD80 A12/T/H18L/N43V/F59L/E77K/P109S/I118T					
Dominio 1: CD80 167T/L70Q/A91G/T120S	175	CD28	938	995	102
Dominio 2: CD80 E88D/K89R/D90K/A91G/F92Y/K93R	189	PD-L1	(0,57)	(0,16)	(1,04)
Dominio 1: CD80 167T/L70Q/A91G/T120S	175	CD28	4.153 (2,54)	2.827 (0,45)	108 (1,10)
Dominio 2: CD80 A12/T/H18L/N43V/F59L/E77K/P109S/I118T	193	PD-L1			
Dominio 1: CD86 Q35H/H90L/Q102H	221	CD28	14.608 (2,95)	2.535 (1,67)	257 (2,06)
Dominio 2: CD80 E88D/K89R/D 90K/A91G/F92Y/K93R	189	PD-L1			
Dominio 1: CD86 Q35H/H90L/Q102H	221	CD28	2.088 (0,42)	2.110 (1,39)	101 (0,81)
Dominio 2: CD80 A12/T/H18L/N43V/F59L/E77K/P109S/I118T	193	PD-L1			
Dominio 1: ICOSL N52S/N57Y/H94D/L96F/L98F/Q103R/G103E/F120S	213	ICOS/CD28	3.634 (1,21)	4.893 (1,65)	6.403 (0,45)
Dominio 2: CD80 E88D/K89R/D90K/A91G/F92Y/K93R	189	PD-L1			123 (1,22)
Dominio 1: ICOSL N52S/N57Y/H94D/L96F/L98F/Q103R/G103E/F120S	213	ICOS/CD28	1.095 (0,37)	5.929 (2,0)	7.923 (0,55)
Dominio 2: CD80 A12/T/H18L/N43V/F59L/E77K/P109S/I118T	193	PD-L1			127 (1,26)
Dominio 1: ICOSL N52D	199	ICOSL/CD28	2.023 (0,67)	5.093 (1,72)	16.987 (1,18)
Dominio 2: CD80 E88D/K89R/D90K/A91G/F92Y/K93R	189	PD-L1			125 (1,24)
Dominio 1: ICOSL N52D	199	ICOS/CD28	3.441 (1,15)	3.414 (1,15)	20.889 (1,45)
Dominio 2: CD80 A12/T/H18L/N43V/F59L/E77K/P109S/I118T	193	PD-L1			165 (1,63)
Dominio 1: ICOSL N52H/N57Y/Q100P	201	ICOS/CD28	7.835	6.634	20.779
Dominio 2: CD80 E88D/K89R/D 90K/A91G/F92Y/K93R	189	PD-L1	(2,61)	(2,24)	95 (1,45)
Dominio 1: ICOSL N52H/N57Y/Q100P	201	ICOS/CD28	8.472 (2,82)	3.789 (1,28)	13.974 (0,97)
Dominio 2: CD80 A12/T/H18L/N43V/F59L/E77K/P109S/I118T	193	PD-L1			106 (1,05)

TABLA 13: Proteínas de fusión Fc IgV variantes apiladas que contienen dos dominios IgV de CD80

Estructura de dominio N terminal a C terminal: dominio 1/dominio 2/Fc	SEQ ID (IgV)	NO	Contraestructura frente a la que se seleccionó	Actividad de unión		Actividad funcional MFI CTLA-4 (relación de MFI parental WT)	Actividad funcional MFI CTLA-4 (relación de MFI parental WT)
				MFI PD-L1 (relación de MFI parental WT)	MFI CTLA-4 (relación de MFI parental WT)		
Dominio 1: CD80 WT	152			6.297 (1,00)	4.698 (1,00)	35.166 (1,00)	
Dominio 2: CD80 WT	152						
Dominio 1: CD80 V68M/L70P/L72P/K86E	195		CTLA-4	2.464 (0,39)	4.955 (1,05)	5.705 (0,16)	
Dominio 2: CD80 E88D/K89R/D 90K/A91G/F92Y/K93R	189		PD-L1				
Dominio 1: CD80 R29V/Y31F/K36G/M38L/N43Q/E81R/V83/L85/K89R/D90L/A91E/F92N/K93Q/R94G	194		CTLA-4	1.928 (0,31)	1.992 (0,42)	1.560 (0,04)	
Dominio 2: CD80 E88D/K89R/D90K/A91G/F92Y/K93R	189		PD-L1				
Dominio 1: CD80 V68M/L70P/L72P/K86E	195		CTLA-4	1.215 (0,19)	1.382 (0,29)	2.171 (0,06)	
Dominio 2: CD80 A12T/H18L/N43V//F39L/E77K/P109S/I118T	193		PD-L1				
Dominio 1: CD80 R29V/Y31F/K36G/M38L/N43Q/E81R/V83/L85//K89R/D90L/A91E/F92N/K93Q/R94G	194		CTLA-4	1.592	1.962	1.512	
Dominio 2: CD80 A12T/H18L/N43V//F39L/E77K/P109S/I118T	193		PD-L1	(0,25)	(0,42)	(0,04)	
Dominio 1: CD80 E88D/K89R/D90K/A91G/F92Y/K93R	189		PD-L1	1.747 (0,28)	2.057 (0,44)	9.739 (0,28)	
Dominio 2: CD80 V68M/L70P/L72P/K86E	195		CTLA-4				
Dominio 1: CD80 E88D/K89R/D90K/A91G/F92Y/K93R R29V/Y31F/K36G/M38L/N43Q/E81R/V83/L85//K89R/D90L/A91E/F92N/K93Q/R94G	189		PD-L1	1.752 (0,28)	1.772 (0,38)	5.412 (0,15)	
Dominio 2: CD80 A12T/H18L/N43V//F39L/E77K/P109S/I118T	194		CTLA-4				
Dominio 1: CD80 A12T/H18L/N43V//F39L/E77K/P109S/I118T	193		PD-L1	1.636	1.887	7.608	
Dominio 2: CD80 V68M/L70P/L72P/K86E	195		CTLA-4	(0,26)	(0,40)	(0,22)	
Dominio 1: CD80 A12T/H18L/N43V//F39L/E77K/P109S/I118T	193		PD-L1	2.037 (0,32)	4.822 (1,03)	11.158 (0,32)	
Dominio 2: CD80 R29V/Y31F/K36G/M38L/N43Q/E81R/V83/L85//K89R/D90L/A91E/F92N/K93Q/R94G	194		CTLA-4				

TABLA 14: Proteínas de fusión Fc IgV variantes apiladas que contienen un dominio IgV de CD80 o CD86 y un dominio IgV de ICOSL

Estructura de dominio N terminal a C terminal: dominio 1/dominio 2/Fc	SEQ ID NO (IgV)	Contraestructura frente a la que se seleccionó	Actividad de unión		
			MFI PD-L1 (relación de MFI parental WT)	MFI CTLA-4 (relación de MFI parental WT)	Actividad funcional MLR de IFN-gamma pg/ml
Dominio 1: CD80 WT	152		1.230 (1,00)	11.122 (1,00)	1.756 (1,00)
Dominio 2: ICOSL WT	196				
Dominio 1: CD86 WT	220		29.343 (1,00)	55.193 (1,00)	6.305 (1,00)
Dominio 2: ICOSL WT	196				
Dominio 1: CD80 R29HY31H/T41GY87N/EE88G/K89E/D90N/A91G/P109S	192	CD28	2.280 (1,85)	3.181 (0,29)	2.281 (1,30)
Dominio 2: ICOSL N52S/N57Y/H94D/L96F/L98F/Q100R/G103E/F120S	213	ICOS/CD 28			
Dominio 1: CD80 167T/L70Q/A91G/T120S	175	CD28	2.309 (1,88)	26.982 (2,43)	1.561 (0,89)
Dominio 2: ICOSL N52S/N57Y/H94D/L96F/L98F/Q100R/G103E/F120S	213	ICOS/CD 28			
Dominio 1: CD80 R29HY31H/T41GY87N/E88G/K89E/D90N/A91G/P109S	192	CD28	4.285 (3,48)	22.744 (2,04)	1.612 (0,92)
Dominio 2: ICOSL N52D	199	ICOS/CD 28			
Dominio 1: CD80 167T/L70Q/A91G/T120S	175	CD28	3.024 (2,46)	16.916 (1,52)	3.857 (2,20)
Dominio 2: ICOSL N52D	199	ICOS/CD28			
Dominio 1: CD80 R29HY31H/T41GY87N/EE88G/K89E/D90N/A91G/P109S	192	CD28	6.503 (5,29)	7.240 (0,65)	6.886 (3,92)
Dominio 2: ICOSL N52H/N57Y/Q100P	201	ICOS/CD 28			
Dominio 1: CD80 167T/L70Q/A91G/T120S	175	CD28	3.110 (2,53)	4.848 (0,44)	3.393 (1,93)
Dominio 2: ICOSL N52H/N57Y/Q100P	201	ICOS/CD28			
Dominio 1: CD86 Q35H/H90L/Q102H	221	CD28	11.662 (0,40)	21.165 (0,38)	880 (0,14)
Dominio 2: ICOSL N52L/N57Y/H94D/L96F/L98F/Q100R/G103E/F120S	213	ICOS/CD 28			
Dominio 1: CD86 Q35H/H90L/Q102H	221	CD28	24.230 (0,83)	73.287 (1,33)	1.110 (0,18)
Dominio 2: ICOSL N52D	199	ICOS/CD 28			
Dominio 1: CD86 Q35H/H90L/Q102H	221	CD28 ICOS/CD 28	1.962 (0,07)	1.630 (0,03)	587 (0,09)
Dominio 2: ICOSL N52H/N57Y/Q100P	201				
Dominio 1: ICOSL WT	196		3.000	14.366	4.113

TABLA 14: Proteínas de fusión Fc IgV variantes apiladas que contienen un dominio IgV de CD80 o CD86 y un dominio IgV de ICOSL

Estructura de dominio N terminal a C terminal: dominio 1/dominio 2/Fc	SEQ ID NO (IgV)	Contraestructura frente a la que se seleccionó	Actividad de unión		
			MFI PD-L1 (relación de MFI parental WT)	MFI CTLA-4 (relación de MFI parental WT)	Actividad funcional MLR de IFN-gamma pg/ml
Dominio 2: CD80 WT	152		(1,00)	(1,00)	(1,00)
Dominio 1: ICOSL WT	196		18.005 (1,00)	53.602 (1,00)	18.393 (1,00)
Dominio 2: CD86 WT	220				
Dominio 1: ICOSL N52S/N57Y/H94D/L96F/L98F/Q100R/G103E/F120S	213	ICOSL/C D28	10.426 (3,48)	51.286 (3,57)	18.680 (4,54)
Dominio 2: CD80 R29H/Y31H/T41G/Y87N/E88G/K89E/D90N/A91G/P109S	192	CD28			
Dominio 1: ICOSL N52S/N57Y/H94D/L96F/L98F/Q100R/G103E/F120S	213	ICOSL/CD 28	17.751 (5,92)	29.790 (2,07)	10.637 (2,59)
Dominio 2: CD80 I67T/L70Q/A91G/T120S	175	CD28			
Dominio 1: ICOSL N52D	199	ICOSL/CD 28	2.788 (0,93)	25.870 (1,80)	6.205 (1,51)
Dominio 2: CD80 R29H/Y31H/T41G/Y87N/E88G/K89E/D90N/A91G/P109S	192	CD28			
Dominio 1: ICOSL N52D G/Y87N/E88G/K89E/D90N/A91G/P109S	199	ICOSL/CD 28	2.522 (0,84)	13.569 (0,94)	5.447 (1,32)
Dominio 2: CD80 I67T/L70Q/A91G/T120S	175	CD28			
Dominio 1: ICOSL N52H/N57Y/Q100P	201	ICOSL/CD 28	9.701 (3,23)	9.187 (0,64)	5.690 (1,38)
Dominio 2: CD80 R29H/Y31H/T41G/Y87N/E88G/K89E/D90N/A91G/P109S	192	CD28			
Dominio 1: ICOSL N52S/N57Y/H94D/L96F/L98F/Q100R/G103E/F120S	213	ICOSL/CD 28	27.050	21.257	8.131
Dominio 2: CD86 Q35H/H90L/Q102H	221	CD28	(1,50)	(0,40)	(0,44)
Dominio 1: ICOSL N52D	199	ICOSL/CD 28	34.803 (1,93)	80.210 (1,50)	6.747 (0,37)
Dominio 2: CD86 Q35H/H90L/Q102H	221	CD28			
Dominio 1: ICOSL N52H/N57Y/Q100P	201	ICOSL/CD 28	5.948 (0,33)	4.268 (0,08)	26.219 (1,43)
Dominio 2: CD86 Q35H/H90L/Q102H	221	CD28			

Aunque en la presente memoria se han mostrado y descrito realizaciones preferidas de la presente invención, será obvio para los expertos en la técnica que dichas realizaciones se proporcionan solo a modo de ejemplo. A los expertos en la técnica se les ocurrirán ahora numerosas variaciones, cambios y sustituciones sin apartarse de la invención. Debe entenderse que se pueden emplear diversas alternativas a las realizaciones de la invención descritas en la presente memoria al poner en práctica la invención.

5

Listado de secuencias

<110> Alpine Immune Sciences, Inc.
 SWANSON, Ryan
 KORNACKER, Michael

10

<120> PROTEÍNAS INMUNOMODULADORAS CON AFINIDADES AJUSTABLES

<130> 761612000140

15

<140> Aún no asignado
 <141> Simultáneamente con la presente

<150> 62/149.437
 <151> 17-04-2015

20

<150> 62/218.534
 <151> 14-09-2015

<160> 240

25

<170> FastSEQ para Windows Versión 4.0

<210> 1

<211> 288

30

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> CD80 (B7-1)

35

<400> 1

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

Asp Asn Leu Leu Pro Ser Trp Ala Ile Thr Leu Ile Ser Val Asn Gly
 245 250 255
 Ile Phe Val Ile Cys Cys Leu Thr Tyr Cys Phe Ala Pro Arg Cys Arg
 260 265 270
 Glu Arg Arg Arg Asn Glu Arg Leu Arg Arg Glu Ser Val Arg Pro Val
 275 280 285
 <210> 2
 <211> 329
 <212> PRT
 5 <213> Homo sapiens
 <220>
 <223> CD86 (B7-2)
 10 <400> 2
 Met Asp Pro Gln Cys Thr Met Gly Leu Ser Asn Ile Leu Phe Val Met
 1 5 10 15
 Ala Phe Leu Leu Ser Gly Ala Ala Pro Leu Lys Ile Gln Ala Tyr Phe
 20 25 30
 Asn Glu Thr Ala Asp Leu Pro Cys Gln Phe Ala Asn Ser Gln Asn Gln
 35 40 45
 Ser Leu Ser Glu Leu Val Val Phe Trp Gln Asp Gln Glu Asn Leu Val
 50 55 60
 Leu Asn Glu Val Tyr Leu Gly Lys Glu Lys Phe Asp Ser Val His Ser
 65 70 75 80
 Lys Tyr Met Gly Arg Thr Ser Phe Asp Ser Asp Ser Trp Thr Leu Arg
 85 90 95
 Leu His Asn Leu Gln Ile Lys Asp Lys Gly Leu Tyr Gln Cys Ile Ile
 100 105 110
 His His Lys Lys Pro Thr Gly Met Ile Arg Ile His Gln Met Asn Ser
 115 120 125
 Glu Leu Ser Val Leu Ala Asn Phe Ser Gln Pro Glu Ile Val Pro Ile
 130 135 140
 Ser Asn Ile Thr Glu Asn Val Tyr Ile Asn Leu Thr Cys Ser Ser Ile
 145 150 155 160
 His Gly Tyr Pro Glu Pro Lys Lys Met Ser Val Leu Leu Arg Thr Lys
 165 170 175
 Asn Ser Thr Ile Glu Tyr Asp Gly Val Met Gln Lys Ser Gln Asp Asn
 180 185 190
 Val Thr Glu Leu Tyr Asp Val Ser Ile Ser Leu Ser Val Ser Phe Pro
 195 200 205
 Asp Val Thr Ser Asn Met Thr Ile Phe Cys Ile Leu Glu Thr Asp Lys
 210 215 220
 Thr Arg Leu Leu Ser Ser Pro Phe Ser Ile Glu Leu Glu Asp Pro Gln
 225 230 235 240
 Pro Pro Pro Asp His Ile Pro Trp Ile Thr Ala Val Leu Pro Thr Val
 245 250 255
 Ile Ile Cys Val Met Val Phe Cys Leu Ile Leu Trp Lys Trp Lys Lys
 260 265 270
 Lys Lys Arg Pro Arg Asn Ser Tyr Lys Cys Gly Thr Asn Thr Met Glu
 275 280 285
 Arg Glu Glu Ser Glu Gln Thr Lys Lys Arg Glu Lys Ile His Ile Pro
 290 295 300
 Glu Arg Ser Asp Glu Ala Gln Arg Val Phe Lys Ser Ser Lys Thr Ser
 305 310 315 320
 Ser Cys Asp Lys Ser Asp Thr Cys Phe
 325
 <210> 3
 <211> 290
 <212> PRT
 15 <213> Homo sapiens
 <220>
 <223> CD274 (PD-L1, B7-H1)
 20 <400> 3

Met Arg Ile Phe Ala Val Phe Ile Phe Met Thr Tyr Trp His Leu Leu
 1 5 10 15
 Asn Ala Phe Thr Val Thr Val Pro Lys Asp Leu Tyr Val Val Glu Tyr
 20 25 30
 Gly Ser Asn Met Thr Ile Glu Cys Lys Phe Pro Val Glu Lys Gln Leu
 35 40 45
 Asp Leu Ala Ala Leu Ile Val Tyr Trp Glu Met Glu Asp Lys Asn Ile
 50 55 60
 Ile Gln Phe Val His Gly Glu Asp Leu Lys Val Gln His Ser Ser
 65 70 75 80
 Tyr Arg Gln Arg Ala Arg Leu Leu Lys Asp Gln Leu Ser Leu Gly Asn
 85 90 95
 Ala Ala Leu Gln Ile Thr Asp Val Lys Leu Gln Asp Ala Gly Val Tyr
 100 105 110
 Arg Cys Met Ile Ser Tyr Gly Gly Ala Asp Tyr Lys Arg Ile Thr Val
 115 120 125
 Lys Val Asn Ala Pro Tyr Asn Lys Ile Asn Gln Arg Ile Leu Val Val
 130 135 140
 Asp Pro Val Thr Ser Glu His Glu Leu Thr Cys Gln Ala Glu Gly Tyr
 145 150 155 160
 Pro Lys Ala Glu Val Ile Trp Thr Ser Ser Asp His Gln Val Leu Ser
 165 170 175
 Gly Lys Thr Thr Thr Asn Ser Lys Arg Glu Glu Lys Leu Phe Asn
 180 185 190
 Val Thr Ser Thr Leu Arg Ile Asn Thr Thr Thr Asn Glu Ile Phe Tyr
 195 200 205
 Cys Thr Phe Arg Arg Leu Asp Pro Glu Glu Asn His Thr Ala Glu Leu
 210 215 220
 Val Ile Pro Glu Leu Pro Leu Ala His Pro Pro Asn Glu Arg Thr His
 225 230 235 240
 Leu Val Ile Leu Gly Ala Ile Leu Leu Cys Leu Gly Val Ala Leu Thr
 245 250 255
 Phe Ile Phe Arg Leu Arg Lys Gly Arg Met Met Asp Val Lys Lys Cys
 260 265 270
 Gly Ile Gln Asp Thr Asn Ser Lys Lys Gln Ser Asp Thr His Leu Glu
 275 280 285
 Glu Thr
 290

<210> 4

<211> 273

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> PDCD1LG2 (PD-L2, CD273)

10

<400> 4

Met Ile Phe Leu Leu Met Leu Ser Leu Glu Leu Gln Leu His Gln
 1 5 10 15
 Ile Ala Ala Leu Phe Thr Val Thr Val Pro Lys Glu Leu Tyr Ile Ile
 20 25 30
 Glu His Gly Ser Asn Val Thr Leu Glu Cys Asn Phe Asp Thr Gly Ser
 35 40 45
 His Val Asn Leu Gly Ala Ile Thr Ala Ser Leu Gln Lys Val Glu Asn

50	55	60														
Asp	Thr	Ser	Pro	His	Arg	Glu	Arg	Ala	Thr	Leu	Leu	Glu	Glu	Gln	Leu	
65						70				75						80
Pro	Leu	Gly	Lys	Ala	Ser	Phe	His	Ile	Pro	Gln	Val	Gln	Val	Arg	Asp	
						85				90						95
Glu	Gly	Gln	Tyr	Gln	Cys	Ile	Ile	Ile	Tyr	Gly	Val	Ala	Trp	Asp	Tyr	
						100				105						110
Lys	Tyr	Leu	Thr	Leu	Lys	Val	Lys	Ala	Ser	Tyr	Arg	Lys	Ile	Asn	Thr	
						115				120						125
His	Ile	Leu	Lys	Val	Pro	Glu	Thr	Asp	Glu	Val	Glu	Leu	Thr	Cys	Gln	
						130				135						140
Ala	Thr	Gly	Tyr	Pro	Leu	Ala	Glu	Val	Ser	Trp	Pro	Asn	Val	Ser	Val	
145						150				155						160
Pro	Ala	Asn	Thr	Ser	His	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Gly	Leu	Tyr	Gln	Val	
						165				170						175
Thr	Ser	Val	Leu	Arg	Leu	Lys	Pro	Pro	Gly	Arg	Asn	Phe	Ser	Cys		
						180				185						190
Val	Phe	Trp	Asn	Thr	His	Val	Arg	Glu	Leu	Thr	Leu	Ala	Ser	Ile	Asp	
						195				200						205
Leu	Gln	Ser	Gln	Met	Glu	Pro	Arg	Thr	His	Pro	Thr	Trp	Leu	Leu	His	
						210				215						220
Ile	Phe	Ile	Pro	Phe	Cys	Ile	Ile	Ala	Phe	Ile	Phe	Ile	Ala	Thr	Val	
225						230				235						240
Ile	Ala	Leu	Arg	Gln	Leu	Cys	Gln	Lys	Leu	Tyr	Ser	Ser	Lys	Asp		
						245				250						255
Thr	Thr	Lys	Arg	Pro	Val	Thr	Thr	Thr	Lys	Arg	Glu	Val	Asn	Ser	Ala	
						260				265						270
Ile																

<210> 5

<211> 302

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> ICOSLG (B7RP1, CD275, ICOSL, B7-H2)

10

<400> 5

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

180	185	190	
Met Arg Gly Leu Tyr Asp Val Val	Ser Val Leu Arg Ile Ala Arg Thr		
195	200	205	
Pro Ser Val Asn Ile Gly Cys Cys	Ile Glu Asn Val Leu Leu Gln Gln		
210	215	220	
Asn Leu Thr Val Gly Ser Gln Thr Gly Asn Asp	Ile Gly Glu Arg Asp		
225	230	235	240
Lys Ile Thr Glu Asn Pro Val Ser Thr Gly Glu Lys Asn Ala Ala Thr			
245	250	255	
Trp Ser Ile Leu Ala Val Leu Cys	Leu Val Val Val Ala Val Ala		
260	265	270	
Ile Gly Trp Val Cys Arg Asp Arg Cys	Leu Gln His Ser Tyr Ala Gly		
275	280	285	
Ala Trp Ala Val Ser Pro Glu Thr Glu Leu Thr Gly His Val			
290	295	300	

<210> 6

<211> 534

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> CD276 (B7-H3)

10

<400> 6

Met Leu Arg Arg Arg Gly Ser Pro Gly	Met Gly Val His Val Gly Ala	
1 5	10 15	
Ala Leu Gly Ala Leu Trp Phe Cys	Leu Thr Gly Ala Leu Glu Val Gln	
20	25 30	
Val Pro Glu Asp Pro Val Val Ala	Leu Val Gly Thr Asp Ala Thr Leu	
35	40 45	
Cys Cys Ser Phe Ser Pro Glu Pro Gly	Phe Ser Leu Ala Gln Leu Asn	
50	55 60	
Leu Ile Trp Gln Leu Thr Asp Thr Lys	Gln Leu Val His Ser Phe Ala	
65	70 75	80
Glu Gly Gln Asp Gln Gly Ser Ala	Tyr Ala Asn Arg Thr Ala Leu Phe	
85	90 95	
Pro Asp Leu Leu Ala Gln Gly Asn	Ala Ser Leu Arg Leu Gln Arg Val	
100	105 110	
Arg Val Ala Asp Glu Gly Ser Phe	Thr Cys Phe Val Ser Ile Arg Asp	
115	120 125	
Phe Gly Ser Ala Ala Val Ser Leu	Gln Val Ala Ala Pro Tyr Ser Lys	
130	135 140	
Pro Ser Met Thr Leu Glu Pro Asn	Lys Asp Leu Arg Pro Gly Asp Thr	
145	150 155	160
Val Thr Ile Thr Cys Ser Ser Tyr	Gln Gly Tyr Pro Glu Ala Glu Val	
165	170 175	
Phe Trp Gln Asp Gly Gln Gly Val	Pro Leu Thr Gly Asn Val Thr Thr	
180	185 190	
Ser Gln Met Ala Asn Glu Gln Gly	Leu Phe Asp Val His Ser Ile Leu	
195	200 205	
Arg Val Val Leu Gly Ala Asn Gly	Thr Tyr Ser Cys Leu Val Arg Asn	
210	215 220	
Pro Val Leu Gln Gln Asp Ala His	Ser Ser Val Thr Ile Thr Pro Gln	
225	230 235	240
Arg Ser Pro Thr Gly Ala Val Glu	Val Gln Val Pro Glu Asp Pro Val	
245	250 255	
Val Ala Leu Val Gly Thr Asp Ala	Thr Leu Arg Cys Ser Phe Ser Pro	
260	265 270	
Glu Pro Gly Phe Ser Leu Ala Gln	Leu Asn Leu Ile Trp Gln Leu Thr	
275	280 285	
Asp Thr Lys Gln Leu Val His Ser	Phe Thr Glu Gly Arg Asp Gln Gly	

290	295	300
Ser Ala Tyr Ala Asn Arg	Thr Ala Leu Phe Pro Asp	Leu Leu Ala Gln
305	310	315
Gly Asn Ala Ser	Leu Arg Leu Gln Arg Val	Arg Val Ala Asp Glu Gly
	325	330
Ser Phe Thr Cys	Phe Val Ser Ile Arg Asp	Phe Gly Ser Ala Ala Val
	340	345
Ser Leu Gln Val Ala Ala	Pro Tyr Ser Lys Pro Ser	Met Thr Leu Glu
	355	360
Pro Asn Lys Asp	Leu Arg Pro Gly Asp	Thr Val Thr Ile Thr Cys Ser
	370	375
Ser Tyr Arg Gly	Tyr Pro Glu Ala Glu Val	Phe Trp Gln Asp Gly Gln
	385	390
Gly Val Pro	Leu Thr Gly Asn Val	Thr Thr Ser Gln Met Ala Asn Glu
	405	410
Gln Gly	Leu Phe Asp Val His	Ser Val Leu Arg Val Val Leu Gly Ala
	420	425
Asn Gly	Thr Tyr Ser Cys	Leu Val Arg Asn Pro Val Leu Gln Gln Asp
	435	440
Ala His	Gly Ser Val Thr Ile	Thr Gly Gln Pro Met Thr Phe Pro Pro
	450	455
Glu Ala	Leu Trp Val Thr Val	Gly Leu Ser Val Cys Leu Ile Ala Leu
	465	470
Leu Val	Ala Leu Ala Phe Val	Cys Trp Arg Lys Ile Lys Gln Ser Cys
	485	490
Glu Glu	Glu Asn Ala Gly	Ala Glu Asp Gln Asp Gly Glu Gly Glu Gly
	500	505
Ser Lys	Thr Ala Leu Gln Pro	Leu Lys His Ser Asp Ser Lys Glu Asp
	515	520
Asp Gly	Gln Glu Ile Ala	
	530	

<210> 7

<211> 282

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> VTCN1 (B7-H4)

10

<400> 7

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

165	170	175
Pro Thr Val Val Trp Ala Ser Gln Val Asp Gln Gly Ala Asn Phe Ser		
180	185	190
Glu Val Ser Asn Thr Ser Phe Glu Leu Asn Ser Glu Asn Val Thr Met		
195	200	205
Lys Val Val Ser Val Leu Tyr Asn Val Thr Ile Asn Asn Thr Tyr Ser		
210	215	220
Cys Met Ile Glu Asn Asp Ile Ala Lys Ala Thr Gly Asp Ile Lys Val		
225	230	235
Thr Glu Ser Glu Ile Lys Arg Arg Ser His Leu Gln Leu Leu Asn Ser		
245	250	255
Lys Ala Ser Leu Cys Val Ser Ser Phe Phe Ala Ile Ser Trp Ala Leu		
260	265	270
Leu Pro Leu Ser Pro Tyr Leu Met Leu Lys		
275	280	

<210> 8

<211> 220

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> CD28

10

<400> 8

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

<210> 9

15 <211> 223

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

20 <223> CTLA4

<400> 9
 Met Ala Cys Leu Gly Phe Gln Arg His Lys Ala Gln Leu Asn Leu Ala
 1 5 10 15
 Thr Arg Thr Trp Pro Cys Thr Leu Leu Phe Phe Leu Leu Phe Ile Pro
 20 25 30
 Val Phe Cys Lys Ala Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala
 35 40 45
 Ser Ser Arg Gly Ile Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Ala Ser Pro Gly
 50 55 60
 Lys Ala Thr Glu Val Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln
 65 70 75 80
 Val Thr Glu Val Cys Ala Ala Thr Tyr Met Met Gly Asn Glu Leu Thr
 85 90 95
 Phe Leu Asp Asp Ser Ile Cys Thr Gly Thr Ser Ser Gly Asn Gln Val
 100 105 110
 Asn Leu Thr Ile Gln Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile
 115 120 125
 Cys Lys Val Glu Leu Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile Gly
 130 135 140
 Asn Gly Thr Gln Ile Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser
 145 150 155 160
 Asp Phe Leu Leu Trp Ile Leu Ala Ala Val Ser Ser Gly Leu Phe Phe
 165 170 175
 Tyr Ser Phe Leu Leu Thr Ala Val Ser Leu Ser Lys Met Leu Lys Lys
 180 185 190
 Arg Ser Pro Leu Thr Thr Gly Val Tyr Val Lys Met Pro Pro Thr Glu
 195 200 205
 Pro Glu Cys Glu Lys Gln Phe Gln Pro Tyr Phe Ile Pro Ile Asn
 210 215 220

<210> 10

<211> 288

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> PDCD1 (PD-1)

10

<400> 10
 Met Gln Ile Pro Gln Ala Pro Trp Pro Val Val Trp Ala Val Leu Gln
 1 5 10 15
 Leu Gly Trp Arg Pro Gly Trp Phe Leu Asp Ser Pro Asp Arg Pro Trp
 20 25 30
 Asn Pro Pro Thr Phe Ser Pro Ala Leu Leu Val Val Thr Glu Gly Asp
 35 40 45
 Asn Ala Thr Phe Thr Cys Ser Phe Ser Asn Thr Ser Glu Ser Phe Val
 50 55 60
 Leu Asn Trp Tyr Arg Met Ser Pro Ser Asn Gln Thr Asp Lys Leu Ala
 65 70 75 80
 Ala Phe Pro Glu Asp Arg Ser Gln Pro Gly Gln Asp Cys Arg Phe Arg
 85 90 95
 Val Thr Gln Leu Pro Asn Gly Arg Asp Phe His Met Ser Val Val Arg
 100 105 110
 Ala Arg Arg Asn Asp Ser Gly Thr Tyr Leu Cys Gly Ala Ile Ser Leu
 115 120 125
 Ala Pro Lys Ala Gln Ile Lys Glu Ser Leu Arg Ala Glu Leu Arg Val
 130 135 140
 Thr Glu Arg Arg Ala Glu Val Pro Thr Ala His Pro Ser Pro Ser Pro
 145 150 155 160
 Arg Pro Ala Gly Gln Phe Gln Thr Leu Val Val Gly Val Val Gly Gly
 165 170 175

Leu Leu Gly Ser Leu Val Leu Leu Val Trp Val Leu Ala Val Ile Cys
 180 185 190
 Ser Arg Ala Ala Arg Gly Thr Ile Gly Ala Arg Arg Thr Gly Gln Pro
 195 200 205
 Leu Lys Glu Asp Pro Ser Ala Val Pro Val Phe Ser Val Asp Tyr Gly
 210 215 220
 Glu Leu Asp Phe Gln Trp Arg Glu Lys Thr Pro Glu Pro Pro Val Pro
 225 230 235 240
 Cys Val Pro Glu Gln Thr Glu Tyr Ala Thr Ile Val Phe Pro Ser Gly
 245 250 255
 Met Gly Thr Ser Ser Pro Ala Arg Arg Gly Ser Ala Asp Gly Pro Arg
 260 265 270
 Ser Ala Gln Pro Leu Arg Pro Glu Asp Gly His Cys Ser Trp Pro Leu
 275 280 285

<210> 11

<211> 199

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> ICOS

10

<400> 11

Met Lys Ser Gly Leu Trp Tyr Phe Phe Leu Phe Cys Leu Arg Ile Lys
 1 5 10 15
 Val Leu Thr Gly Glu Ile Asn Gly Ser Ala Asn Tyr Glu Met Phe Ile
 20 25 30
 Phe His Asn Gly Gly Val Gln Ile Leu Cys Lys Tyr Pro Asp Ile Val
 35 40 45
 Gln Gln Phe Lys Met Gln Leu Leu Lys Gly Gly Gln Ile Leu Cys Asp
 50 55 60
 Leu Thr Lys Thr Lys Gly Ser Gly Asn Thr Val Ser Ile Lys Ser Leu
 65 70 75 80
 Lys Phe Cys His Ser Gln Leu Ser Asn Asn Ser Val Ser Phe Phe Leu
 85 90 95
 Tyr Asn Leu Asp His Ser His Ala Asn Tyr Tyr Phe Cys Asn Leu Ser
 100 105 110
 Ile Phe Asp Pro Pro Pro Phe Lys Val Thr Leu Thr Gly Gly Tyr Leu
 115 120 125
 His Ile Tyr Glu Ser Gln Leu Cys Cys Gln Leu Lys Phe Trp Leu Pro
 130 135 140
 Ile Gly Cys Ala Ala Phe Val Val Val Cys Ile Leu Gly Cys Ile Leu
 145 150 155 160
 Ile Cys Trp Leu Thr Lys Lys Tyr Ser Ser Ser Val His Asp Pro
 165 170 175
 Asn Gly Glu Tyr Met Phe Met Arg Ala Val Asn Thr Ala Lys Lys Ser
 180 185 190
 Arg Leu Thr Asp Val Thr Leu
 195

<210> 12

15 <211> 289

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

20 <223> BTLA (CD272)

<400> 12

Met Lys Thr Leu Pro Ala Met Leu Gly Thr Gly Lys Leu Phe Trp Val

1	5	10	15												
Phe	Phe	Leu	Ile	Pro	Tyr	Leu	Asp	Ile	Trp	Asn	Ile	His	Gly	Lys	Glu
	20					25							30		
Ser	Cys	Asp	Val	Gln	Leu	Tyr	Ile	Lys	Arg	Gln	Ser	Glu	His	Ser	Ile
	35					40							45		
Leu	Ala	Gly	Asp	Pro	Phe	Glu	Leu	Glu	Cys	Pro	Val	Lys	Tyr	Cys	Ala
	50					55							60		
Asn	Arg	Pro	His	Val	Thr	Trp	Cys	Lys	Leu	Asn	Gly	Thr	Thr	Cys	Val
	65					70							75		80
Lys	Leu	Glu	Asp	Arg	Gln	Thr	Ser	Trp	Lys	Glu	Glu	Lys	Asn	Ile	Ser
	85					90							95		
Phe	Phe	Ile	Leu	His	Phe	Glu	Pro	Val	Leu	Pro	Asn	Asp	Asn	Gly	Ser
	100					105							110		
Tyr	Arg	Cys	Ser	Ala	Asn	Phe	Gln	Ser	Asn	Leu	Ile	Glu	Ser	His	Ser
	115					120							125		
Thr	Thr	Leu	Tyr	Val	Thr	Asp	Val	Lys	Ser	Ala	Ser	Glu	Arg	Pro	Ser
	130					135							140		
Lys	Asp	Glu	Met	Ala	Ser	Arg	Pro	Trp	Leu	Leu	Tyr	Arg	Leu	Leu	Pro
	145					150							155		160
Leu	Gly	Gly	Leu	Pro	Leu	Leu	Ile	Thr	Thr	Cys	Phe	Cys	Leu	Phe	Cys
	165					170							175		
Cys	Leu	Arg	Arg	His	Gln	Gly	Lys	Gln	Asn	Glu	Leu	Ser	Asp	Thr	Ala
	180					185							190		
Gly	Arg	Glu	Ile	Asn	Leu	Val	Asp	Ala	His	Leu	Lys	Ser	Glu	Gln	Thr
	195					200							205		
Glu	Ala	Ser	Thr	Arg	Gln	Asn	Ser	Gln	Val	Leu	Leu	Ser	Glu	Thr	Gly
	210					215							220		
Ile	Tyr	Asp	Asn	Asp	Pro	Asp	Leu	Cys	Phe	Arg	Met	Gln	Glu	Gly	Ser
	225					230							235		240
Glu	Val	Tyr	Ser	Asn	Pro	Cys	Leu	Glu	Glu	Asn	Lys	Pro	Gly	Ile	Val
	245					250							255		
Tyr	Ala	Ser	Leu	Asn	His	Ser	Val	Ile	Gly	Pro	Asn	Ser	Arg	Leu	Ala
	260					265							270		
Arg	Asn	Val	Lys	Glu	Ala	Pro	Thr	Glu	Tyr	Ala	Ser	Ile	Cys	Val	Arg
													275		280
Ser													285		

<210> 13

<211> 458

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> CD4

10

<400> 13

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

115	120	125
Ser Asp Thr His Leu Leu Gln	Gly Gln Ser Leu Thr	Leu Thr Leu Glu
130	135	140
Ser Pro Pro Gly Ser Ser Pro	Val Gln Cys Arg Ser Pro	Arg Gly
145	150	155
Lys Asn Ile Gln Gly	Gly Lys Thr Leu Ser Val	Ser Gln Leu Glu Leu
165	170	175
Gln Asp Ser Gly Thr Trp	Thr Cys Thr Val Leu Gln	Asn Gln Lys Lys
180	185	190
Val Glu Phe Lys Ile Asp Ile	Val Leu Ala Phe Gln	Lys Ala Ser
195	200	205
Ser Ile Val Tyr Lys Lys	Glu Gly Gln Val	Glu Phe Ser Phe Pro
210	215	220
Leu Ala Phe Thr Val	Glu Lys Leu Thr Gly	Ser Gly Glu Leu Trp Trp
225	230	235
Gln Ala Glu Arg Ala Ser	Ser Ser Lys Ser	Trp Ile Thr Phe Asp Leu
245	250	255
Lys Asn Lys Glu Val Ser	Val Lys Arg Val	Thr Gln Asp Pro Lys Leu
260	265	270
Gln Met Gly Lys Lys	Leu Pro Leu His	Leu Thr Leu Pro Gln Ala Leu
275	280	285
Pro Gln Tyr Ala Gly Ser	Gly Asn Leu Thr	Leu Ala Leu Glu Ala Lys
290	295	300
Thr Gly Lys Leu His	Gln Glu Val Asn	Leu Val Val Met Arg Ala Thr
305	310	315
Gln Leu Gln Lys Asn	Leu Thr Cys	Glu Val Trp Gly Pro Thr Ser Pro
325	330	335
Lys Leu Met Leu Ser	Leu Lys Leu Glu Asn	Lys Glu Ala Lys Val Ser
340	345	350
Lys Arg Glu Lys Ala Val	Trp Val Leu Asn Pro	Glu Ala Gly Met Trp
355	360	365
Gln Cys Leu Leu Ser Asp	Ser Gly Gln Val	Leu Leu Glu Ser Asn Ile
370	375	380
Lys Val Leu Pro Thr Trp	Ser Thr Pro Val	Gln Pro Met Ala Leu Ile
385	390	395
Val Leu Gly Gly Val	Ala Gly Leu Leu	Leu Phe Ile Gly Leu Gly Ile
405	410	415
Phe Phe Cys Val Arg Cys	Arg His Arg Arg	Gln Ala Glu Arg Met
420	425	430
Ser Gln Ile Lys Arg Leu	Leu Ser Glu Lys	Lys Thr Cys Gln Cys Pro
435	440	445
His Arg Phe Gln Lys	Thr Cys Ser	Pro Ile
450	455	

<210> 14

<211> 235

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> CD8A (CD8-alfa)

10

<400> 14

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

65 70 75 80
 Ala Glu Gly Leu Asp Thr Gln Arg Phe Ser Gly Lys Arg Leu Gly Asp
 85 90 95
 Thr Phe Val Leu Thr Leu Ser Asp Phe Arg Arg Glu Asn Glu Gly Tyr
 100 105 110
 Tyr Phe Cys Ser Ala Leu Ser Asn Ser Ile Met Tyr Phe Ser His Phe
 115 120 125
 Val Pro Val Phe Leu Pro Ala Lys Pro Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg
 130 135 140
 Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg
 145 150 155 160
 Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly
 165 170 175
 Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr
 180 185 190
 Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Asn His
 195 200 205
 Arg Asn Arg Arg Arg Val Cys Lys Cys Pro Arg Pro Val Val Lys Ser
 210 215 220
 Gly Asp Lys Pro Ser Leu Ser Ala Arg Tyr Val
 225 230 235

<210> 15
 <211> 210
 5 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <223> CD8B (CD8-beta)

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

Tyr Lys
 210

<210> 16
 15 <211> 525
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 20 <223> LAG3

<400> 16

Met Trp Glu Ala Gln Phe Leu Gly Leu Leu Phe Leu Gln Pro Leu Trp
 1 5 10 15
 Val Ala Pro Val Lys Pro Leu Gln Pro Gly Ala Glu Val Pro Val Val
 20 25 30
 Trp Ala Gln Glu Gly Ala Pro Ala Gln Leu Pro Cys Ser Pro Thr Ile
 35 40 45
 Pro Leu Gln Asp Leu Ser Leu Leu Arg Arg Ala Gly Val Thr Trp Gln
 50 55 60
 His Gln Pro Asp Ser Gly Pro Pro Ala Ala Ala Pro Gly His Pro Leu
 65 70 75 80
 Ala Pro Gly Pro His Pro Ala Ala Pro Ser Ser Trp Gly Pro Arg Pro
 85 90 95
 Arg Arg Tyr Thr Val Leu Ser Val Gly Pro Gly Gly Leu Arg Ser Gly
 100 105 110
 Arg Leu Pro Leu Gln Pro Arg Val Gln Leu Asp Glu Arg Gly Arg Gln
 115 120 125
 Arg Gly Asp Phe Ser Leu Trp Leu Arg Pro Ala Arg Arg Ala Asp Ala
 130 135 140
 Gly Glu Tyr Arg Ala Ala Val His Leu Arg Asp Arg Ala Leu Ser Cys
 145 150 155 160
 Arg Leu Arg Leu Arg Leu Gly Gln Ala Ser Met Thr Ala Ser Pro Pro
 165 170 175
 Gly Ser Leu Arg Ala Ser Asp Trp Val Ile Leu Asn Cys Ser Phe Ser
 180 185 190
 Arg Pro Asp Arg Pro Ala Ser Val His Trp Phe Arg Asn Arg Gly Gln
 195 200 205
 Gly Arg Val Pro Val Arg Glu Ser Pro His His His Leu Ala Glu Ser
 210 215 220
 Phe Leu Phe Leu Pro Gln Val Ser Pro Met Asp Ser Gly Pro Trp Gly
 225 230 235 240
 Cys Ile Leu Thr Tyr Arg Asp Gly Phe Asn Val Ser Ile Met Tyr Asn
 245 250 255
 Leu Thr Val Leu Gly Leu Glu Pro Pro Thr Pro Leu Thr Val Tyr Ala
 260 265 270
 Gly Ala Gly Ser Arg Val Gly Leu Pro Cys Arg Leu Pro Ala Gly Val
 275 280 285
 Gly Thr Arg Ser Phe Leu Thr Ala Lys Trp Thr Pro Pro Gly Gly Gly
 290 295 300
 Pro Asp Leu Leu Val Thr Gly Asp Asn Gly Asp Phe Thr Leu Arg Leu
 305 310 315 320
 Glu Asp Val Ser Gln Ala Gln Ala Gly Thr Tyr Thr Cys His Ile His
 325 330 335
 Leu Gln Glu Gln Leu Asn Ala Thr Val Thr Leu Ala Ile Ile Thr
 340 345 350
 Val Thr Pro Lys Ser Phe Gly Ser Pro Gly Ser Leu Gly Lys Leu Leu
 355 360 365
 Cys Glu Val Thr Pro Val Ser Gly Gln Glu Arg Phe Val Trp Ser Ser
 370 375 380
 Leu Asp Thr Pro Ser Gln Arg Ser Phe Ser Gly Pro Trp Leu Glu Ala
 385 390 395 400
 Gln Glu Ala Gln Leu Leu Ser Gln Pro Trp Gln Cys Gln Leu Tyr Gln
 405 410 415
 Gly Glu Arg Leu Leu Gly Ala Ala Val Tyr Phe Thr Glu Leu Ser Ser
 420 425 430
 Pro Gly Ala Gln Arg Ser Gly Arg Ala Pro Gly Ala Leu Pro Ala Gly
 435 440 445
 His Leu Leu Leu Phe Leu Ile Leu Gly Val Leu Ser Leu Leu Leu
 450 455 460
 Val Thr Gly Ala Phe Gly Phe His Leu Trp Arg Arg Gln Trp Arg Pro
 465 470 475 480
 Arg Arg Phe Ser Ala Leu Glu Gln Gly Ile His Pro Pro Gln Ala Gln
 485 490 495
 Ser Lys Ile Glu Glu Leu Glu Gln Glu Pro Glu Pro Glu Pro Glu Pro
 500 505 510
 Glu Pro Glu Pro Glu Pro Glu Pro Glu Pro Glu Gln Leu
 515 520 525

5 <210> 17
 <211> 301
 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> HAVCR2 (TIM-3)

5

<400> 17

Met Phe Ser His Leu Pro Phe Asp Cys Val Leu Leu Leu Leu Leu
 1 5 10 15
 Leu Leu Thr Arg Ser Ser Glu Val Glu Tyr Arg Ala Glu Val Gly Gln
 20 25 30
 Asn Ala Tyr Leu Pro Cys Phe Tyr Thr Pro Ala Ala Pro Gly Asn Leu
 35 40 45
 Val Pro Val Cys Trp Gly Lys Gly Ala Cys Pro Val Phe Glu Cys Gly
 50 55 60
 Asn Val Val Leu Arg Thr Asp Glu Arg Asp Val Asn Tyr Trp Thr Ser
 65 70 75 80
 Arg Tyr Trp Leu Asn Gly Asp Phe Arg Lys Gly Asp Val Ser Leu Thr
 85 90 95
 Ile Glu Asn Val Thr Leu Ala Asp Ser Gly Ile Tyr Cys Cys Arg Ile
 100 105 110
 Gln Ile Pro Gly Ile Met Asn Asp Glu Lys Phe Asn Leu Lys Leu Val
 115 120 125
 Ile Lys Pro Ala Lys Val Thr Pro Ala Pro Thr Arg Gln Arg Asp Phe
 130 135 140
 Thr Ala Ala Phe Pro Arg Met Leu Thr Thr Arg Gly His Gly Pro Ala
 145 150 155 160
 Glu Thr Gln Thr Leu Gly Ser Leu Pro Asp Ile Asn Leu Thr Gln Ile
 165 170 175
 Ser Thr Leu Ala Asn Glu Leu Arg Asp Ser Arg Leu Ala Asn Asp Leu
 180 185 190
 Arg Asp Ser Gly Ala Thr Ile Arg Ile Gly Ile Tyr Ile Gly Ala Gly
 195 200 205
 Ile Cys Ala Gly Leu Ala Leu Ala Leu Ile Phe Gly Ala Leu Ile Phe
 210 215 220
 Lys Trp Tyr Ser His Ser Lys Glu Lys Ile Gln Asn Leu Ser Leu Ile
 225 230 235 240
 Ser Leu Ala Asn Leu Pro Pro Ser Gly Leu Ala Asn Ala Val Ala Glu
 245 250 255
 Gly Ile Arg Ser Glu Glu Asn Ile Tyr Thr Ile Glu Glu Asn Val Tyr
 260 265 270
 Glu Val Glu Glu Pro Asn Glu Tyr Tyr Cys Tyr Val Ser Ser Arg Gln
 275 280 285
 Gln Pro Ser Gln Pro Leu Gly Cys Arg Phe Ala Met Pro
 290 295 300

<210> 18

10 <211> 526

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

15 <223> CEACAM1

<400> 18

Met Gly His Leu Ser Ala Pro Leu His Arg Val Arg Val Pro Trp Gln
 1 5 10 15
 Gly Leu Leu Leu Thr Ala Ser Leu Leu Thr Phe Trp Asn Pro Pro Thr
 20 25 30
 Thr Ala Gln Leu Thr Thr Glu Ser Met Pro Phe Asn Val Ala Glu Gly
 35 40 45
 Lys Glu Val Leu Leu Leu Val His Asn Leu Pro Gln Gln Leu Phe Gly
 50 55 60
 Tyr Ser Trp Tyr Lys Gly Glu Arg Val Asp Gly Asn Arg Gln Ile Val
 65 70 75 80
 Gly Tyr Ala Ile Gly Thr Gln Gln Ala Thr Pro Gly Pro Ala Asn Ser
 85 90 95
 Gly Arg Glu Thr Ile Tyr Pro Asn Ala Ser Leu Leu Ile Gln Asn Val
 100 105 110
 Thr Gln Asn Asp Thr Gly Phe Tyr Thr Leu Gln Val Ile Lys Ser Asp
 115 120 125
 Leu Val Asn Glu Glu Ala Thr Gly Gln Phe His Val Tyr Pro Glu Leu
 130 135 140
 Pro Lys Pro Ser Ile Ser Ser Asn Asn Ser Asn Pro Val Glu Asp Lys
 145 150 155 160
 Asp Ala Val Ala Phe Thr Cys Glu Pro Glu Thr Gln Asp Thr Thr Tyr
 165 170 175
 Leu Trp Trp Ile Asn Asn Gln Ser Leu Pro Val Ser Pro Arg Leu Gln
 180 185 190
 Leu Ser Asn Gly Asn Arg Thr Leu Thr Leu Ser Val Thr Arg Asn
 195 200 205
 Asp Thr Gly Pro Tyr Glu Cys Glu Ile Gln Asn Pro Val Ser Ala Asn
 210 215 220
 Arg Ser Asp Pro Val Thr Leu Asn Val Thr Tyr Gly Pro Asp Thr Pro
 225 230 235 240
 Thr Ile Ser Pro Ser Asp Thr Tyr Tyr Arg Pro Gly Ala Asn Leu Ser
 245 250 255
 Leu Ser Cys Tyr Ala Ala Ser Asn Pro Pro Ala Gln Tyr Ser Trp Leu
 260 265 270
 Ile Asn Gly Thr Phe Gln Gln Ser Thr Gln Glu Leu Phe Ile Pro Asn
 275 280 285
 Ile Thr Val Asn Asn Ser Gly Ser Tyr Thr Cys His Ala Asn Asn Ser
 290 295 300
 Val Thr Gly Cys Asn Arg Thr Thr Val Lys Thr Ile Ile Val Thr Glu
 305 310 315 320
 Leu Ser Pro Val Val Ala Lys Pro Gln Ile Lys Ala Ser Lys Thr Thr
 325 330 335
 Val Thr Gly Asp Lys Asp Ser Val Asn Leu Thr Cys Ser Thr Asn Asp
 340 345 350
 Thr Gly Ile Ser Ile Arg Trp Phe Phe Lys Asn Gln Ser Leu Pro Ser
 355 360 365
 Ser Glu Arg Met Lys Leu Ser Gln Gly Asn Thr Thr Leu Ser Ile Asn
 370 375 380
 Pro Val Lys Arg Glu Asp Ala Gly Thr Tyr Trp Cys Glu Val Phe Asn
 385 390 395 400
 Pro Ile Ser Lys Asn Gln Ser Asp Pro Ile Met Leu Asn Val Asn Tyr
 405 410 415
 Asn Ala Leu Pro Gln Glu Asn Gly Leu Ser Pro Gly Ala Ile Ala Gly
 420 425 430
 Ile Val Ile Gly Val Val Ala Leu Val Ala Leu Ile Ala Val Ala Leu
 435 440 445
 Ala Cys Phe Leu His Phe Gly Lys Thr Gly Arg Ala Ser Asp Gln Arg
 450 455 460
 Asp Leu Thr Glu His Lys Pro Ser Val Ser Asn His Thr Gln Asp His
 465 470 475 480
 Ser Asn Asp Pro Pro Asn Lys Met Asn Glu Val Thr Tyr Ser Thr Leu
 485 490 495
 Asn Phe Glu Ala Gln Gln Pro Thr Gln Pro Thr Ser Ala Ser Pro Ser
 500 505 510
 Leu Thr Ala Thr Glu Ile Ile Tyr Ser Glu Val Lys Lys Gln
 515 520 525

5 <210> 19
 <211> 244
 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> TIGIT

5

<400> 19

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

<210> 20

10

<211> 417

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

15

<223> PVR (CD155)

<400> 20

Met Ala Arg Ala Met Ala Ala Ala Trp Pro Leu Leu Leu Val Ala Leu
 1 5 10 15
 Leu Val Leu Ser Trp Pro Pro Pro Gly Thr Gly Asp Val Val Val Gln
 20 25 30
 Ala Pro Thr Gln Val Pro Gly Phe Leu Gly Asp Ser Val Thr Leu Pro
 35 40 45
 Cys Tyr Leu Gln Val Pro Asn Met Glu Val Thr His Val Ser Gln Leu
 50 55 60
 Thr Trp Ala Arg His Gly Glu Ser Gly Ser Met Ala Val Phe His Gln
 65 70 75 80
 Thr Gln Gly Pro Ser Tyr Ser Glu Ser Lys Arg Leu Glu Phe Val Ala
 85 90 95
 Ala Arg Leu Gly Ala Glu Leu Arg Asn Ala Ser Leu Arg Met Phe Gly
 100 105 110
 Leu Arg Val Glu Asp Glu Gly Asn Tyr Thr Cys Leu Phe Val Thr Phe
 115 120 125
 Pro Gln Gly Ser Arg Ser Val Asp Ile Trp Leu Arg Val Leu Ala Lys
 130 135 140
 Pro Gln Asn Thr Ala Glu Val Gln Lys Val Gln Leu Thr Gly Glu Pro
 145 150 155 160
 Val Pro Met Ala Arg Cys Val Ser Thr Gly Gly Arg Pro Pro Ala Gln
 165 170 175
 Ile Thr Trp His Ser Asp Leu Gly Gly Met Pro Asn Thr Ser Gln Val
 180 185 190
 Pro Gly Phe Leu Ser Gly Thr Val Thr Val Thr Ser Leu Trp Ile Leu
 195 200 205
 Val Pro Ser Ser Gln Val Asp Gly Lys Asn Val Thr Cys Lys Val Glu
 210 215 220
 His Glu Ser Phe Glu Lys Pro Gln Leu Leu Thr Val Asn Leu Thr Val
 225 230 235 240
 Tyr Tyr Pro Pro Glu Val Ser Ile Ser Gly Tyr Asp Asn Asn Trp Tyr
 245 250 255
 Leu Gly Gln Asn Glu Ala Thr Leu Thr Cys Asp Ala Arg Ser Asn Pro
 260 265 270
 Glu Pro Thr Gly Tyr Asn Trp Ser Thr Thr Met Gly Pro Leu Pro Pro
 275 280 285
 Phe Ala Val Ala Gln Gly Ala Gln Leu Leu Ile Arg Pro Val Asp Lys
 290 295 300
 Pro Ile Asn Thr Thr Leu Ile Cys Asn Val Thr Asn Ala Leu Gly Ala
 305 310 315 320
 Arg Gln Ala Glu Leu Thr Val Gln Val Lys Glu Gly Pro Pro Ser Glu
 325 330 335
 His Ser Gly Ile Ser Arg Asn Ala Ile Ile Phe Leu Val Leu Gly Ile
 340 345 350
 Leu Val Phe Leu Ile Leu Leu Gly Ile Gly Ile Tyr Phe Tyr Trp Ser
 355 360 365
 Lys Cys Ser Arg Glu Val Leu Trp His Cys His Leu Cys Pro Ser Ser
 370 375 380
 Thr Glu His Ala Ser Ala Ser Ala Asn Gly His Val Ser Tyr Ser Ala
 385 390 395 400
 Val Ser Arg Glu Asn Ser Ser Ser Gln Asp Pro Gln Thr Glu Gly Thr
 405 410 415

Arg

<210> 21

<211> 538

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> PVRL2 (CD112)

10

<400> 21

Met Ala Arg Ala Ala Ala Leu Leu Pro Ser Arg Ser Pro Pro Thr Pro
 1 5 10 15
 Leu Leu Trp Pro Leu Leu Leu Leu Leu Leu Glu Thr Gly Ala Gln
 20 25 30
 Asp Val Arg Val Gln Val Leu Pro Glu Val Arg Gly Gln Leu Gly Gly
 35 40 45
 Thr Val Glu Leu Pro Cys His Leu Leu Pro Pro Val Pro Gly Leu Tyr
 50 55 60
 Ile Ser Leu Val Thr Trp Gln Arg Pro Asp Ala Pro Ala Asn His Gln
 65 70 75 80
 Asn Val Ala Ala Phe His Pro Lys Met Gly Pro Ser Phe Pro Ser Pro
 85 90 95
 Lys Pro Gly Ser Glu Arg Leu Ser Phe Val Ser Ala Lys Gln Ser Thr
 100 105 110
 Gly Gln Asp Thr Glu Ala Glu Leu Gln Asp Ala Thr Leu Ala Leu His
 115 120 125
 Gly Leu Thr Val Glu Asp Glu Gly Asn Tyr Thr Cys Glu Phe Ala Thr
 130 135 140
 Phe Pro Lys Gly Ser Val Arg Gly Met Thr Trp Leu Arg Val Ile Ala
 145 150 155 160
 Lys Pro Lys Asn Gln Ala Glu Ala Gln Lys Val Thr Phe Ser Gln Asp
 165 170 175
 Pro Thr Thr Val Ala Leu Cys Ile Ser Lys Glu Gly Arg Pro Pro Ala
 180 185 190
 Arg Ile Ser Trp Leu Ser Ser Leu Asp Trp Glu Ala Lys Glu Thr Gln
 195 200 205
 Val Ser Gly Thr Leu Ala Gly Thr Val Thr Val Thr Ser Arg Phe Thr
 210 215 220
 Leu Val Pro Ser Gly Arg Ala Asp Gly Val Thr Val Thr Cys Lys Val
 225 230 235 240
 Glu His Glu Ser Phe Glu Glu Pro Ala Leu Ile Pro Val Thr Leu Ser
 245 250 255
 Val Arg Tyr Pro Pro Glu Val Ser Ile Ser Gly Tyr Asp Asp Asn Trp
 260 265 270
 Tyr Leu Gly Arg Thr Asp Ala Thr Leu Ser Cys Asp Val Arg Ser Asn
 275 280 285
 Pro Glu Pro Thr Gly Tyr Asp Trp Ser Thr Thr Ser Gly Thr Phe Pro
 290 295 300
 Thr Ser Ala Val Ala Gln Gly Ser Gln Leu Val Ile His Ala Val Asp
 305 310 315 320
 Ser Leu Phe Asn Thr Thr Phe Val Cys Thr Val Thr Asn Ala Val Gly
 325 330 335
 Met Gly Arg Ala Glu Gln Val Ile Phe Val Arg Glu Thr Pro Asn Thr
 340 345 350
 Ala Gly Ala Gly Ala Thr Gly Gly Ile Ile Gly Gly Ile Ile Ala Ala
 355 360 365
 Ile Ile Ala Thr Ala Val Ala Ala Thr Gly Ile Leu Ile Cys Arg Gln
 370 375 380
 Gln Arg Lys Glu Gln Thr Leu Gln Gly Ala Glu Glu Asp Glu Asp Leu
 385 390 395 400
 Glu Gly Pro Pro Ser Tyr Lys Pro Pro Thr Pro Lys Ala Lys Leu Glu
 405 410 415
 Ala Gln Glu Met Pro Ser Gln Leu Phe Thr Leu Gly Ala Ser Glu His
 420 425 430
 Ser Pro Leu Lys Thr Pro Tyr Phe Asp Ala Gly Ala Ser Cys Thr Glu
 435 440 445
 Gln Glu Met Pro Arg Tyr His Glu Leu Pro Thr Leu Glu Glu Arg Ser
 450 455 460
 Gly Pro Leu His Pro Gly Ala Thr Ser Leu Gly Ser Pro Ile Pro Val
 465 470 475 480
 Pro Pro Gly Pro Pro Ala Val Glu Asp Val Ser Leu Asp Leu Glu Asp
 485 490 495
 Glu Glu Gly Glu Glu Glu Glu Tyr Leu Asp Lys Ile Asn Pro Ile
 500 505 510
 Tyr Asp Ala Leu Ser Tyr Ser Ser Pro Ser Asp Ser Tyr Gln Gly Lys
 515 520 525
 Gly Phe Val Met Ser Arg Ala Met Tyr Val
 530 535

<212> PRT
 <213> Homo sapiens

5 <220>
 <223> CD226

<400> 22
 Met Asp Tyr Pro Thr Leu Leu Leu Ala Leu Leu His Val Tyr Arg Ala
 1 5 10 15
 Leu Cys Glu Glu Val Leu Trp His Thr Ser Val Pro Phe Ala Glu Asn
 20 25 30
 Met Ser Leu Glu Cys Val Tyr Pro Ser Met Gly Ile Leu Thr Gln Val
 35 40 45
 Glu Trp Phe Lys Ile Gly Thr Gln Gln Asp Ser Ile Ala Ile Phe Ser
 50 55 60
 Pro Thr His Gly Met Val Ile Arg Lys Pro Tyr Ala Glu Arg Val Tyr
 65 70 75 80
 Phe Leu Asn Ser Thr Met Ala Ser Asn Asn Met Thr Leu Phe Phe Arg
 85 90 95
 Asn Ala Ser Glu Asp Asp Val Gly Tyr Tyr Ser Cys Ser Leu Tyr Thr
 100 105 110
 Tyr Pro Gln Gly Thr Trp Gln Lys Val Ile Gln Val Val Gln Ser Asp
 115 120 125
 Ser Phe Glu Ala Ala Val Pro Ser Asn Ser His Ile Val Ser Glu Pro
 130 135 140
 Gly Lys Asn Val Thr Leu Thr Cys Gln Pro Gln Met Thr Trp Pro Val
 145 150 155 160
 Gln Ala Val Arg Trp Glu Lys Ile Gln Pro Arg Gln Ile Asp Leu Leu
 165 170 175
 Thr Tyr Cys Asn Leu Val His Gly Arg Asn Phe Thr Ser Lys Phe Pro
 180 185 190
 Arg Gln Ile Val Ser Asn Cys Ser His Gly Arg Trp Ser Val Ile Val
 195 200 205
 Ile Pro Asp Val Thr Val Ser Asp Ser Gly Leu Tyr Arg Cys Tyr Leu
 210 215 220
 Gln Ala Ser Ala Gly Glu Asn Glu Thr Phe Val Met Arg Leu Thr Val
 225 230 235 240
 Ala Glu Gly Lys Thr Asp Asn Gln Tyr Thr Leu Phe Val Ala Gly Gly
 245 250 255
 Thr Val Leu Leu Leu Phe Val Ile Ser Ile Thr Thr Ile Ile Val
 260 265 270
 Ile Phe Leu Asn Arg Arg Arg Arg Glu Arg Arg Asp Leu Phe Thr
 275 280 285
 Glu Ser Trp Asp Thr Gln Lys Ala Pro Asn Asn Tyr Arg Ser Pro Ile
 290 295 300
 Ser Thr Ser Gln Pro Thr Asn Gln Ser Met Asp Asp Thr Arg Glu Asp
 305 310 315 320
 Ile Tyr Val Asn Tyr Pro Thr Phe Ser Arg Arg Pro Lys Thr Arg Val
 325 330 335

10 <210> 23
 <211> 351
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

15 <220>
 <223> CD2

<400> 23

Met Ser Phe Pro Cys Lys Phe Val Ala Ser Phe Leu Leu Ile Phe Asn
 1 5 10 15
 Val Ser Ser Lys Gly Ala Val Ser Lys Glu Ile Thr Asn Ala Leu Glu
 20 25 30
 Thr Trp Gly Ala Leu Gly Gln Asp Ile Asn Leu Asp Ile Pro Ser Phe
 35 40 45
 Gln Met Ser Asp Asp Ile Asp Asp Ile Lys Trp Glu Lys Thr Ser Asp
 50 55 60
 Lys Lys Lys Ile Ala Gln Phe Arg Lys Glu Lys Glu Thr Phe Lys Glu
 65 70 75 80
 Lys Asp Thr Tyr Lys Leu Phe Lys Asn Gly Thr Leu Lys Ile Lys His
 85 90 95
 Leu Lys Thr Asp Asp Gln Asp Ile Tyr Lys Val Ser Ile Tyr Asp Thr
 100 105 110
 Lys Gly Lys Asn Val Leu Glu Lys Ile Phe Asp Leu Lys Ile Gln Glu
 115 120 125
 Arg Val Ser Lys Pro Lys Ile Ser Trp Thr Cys Ile Asn Thr Thr Leu
 130 135 140
 Thr Cys Glu Val Met Asn Gly Thr Asp Pro Glu Leu Asn Leu Tyr Gln
 145 150 155 160
 Asp Gly Lys His Leu Lys Leu Ser Gln Arg Val Ile Thr His Lys Trp
 165 170 175
 Thr Thr Ser Leu Ser Ala Lys Phe Lys Cys Thr Ala Gly Asn Lys Val
 180 185 190
 Ser Lys Glu Ser Ser Val Glu Pro Val Ser Cys Pro Glu Lys Gly Leu
 195 200 205
 Asp Ile Tyr Leu Ile Ile Gly Ile Cys Gly Gly Ser Leu Leu Met
 210 215 220
 Val Phe Val Ala Leu Leu Val Phe Tyr Ile Thr Lys Arg Lys Lys Gln
 225 230 235 240
 Arg Ser Arg Arg Asn Asp Glu Glu Leu Glu Thr Arg Ala His Arg Val
 245 250 255
 Ala Thr Glu Glu Arg Gly Arg Lys Pro His Gln Ile Pro Ala Ser Thr
 260 265 270
 Pro Gln Asn Pro Ala Thr Ser Gln His Pro Pro Pro Pro Gly His
 275 280 285
 Arg Ser Gln Ala Pro Ser His Arg Pro Pro Pro Pro Gly His Arg Val
 290 295 300
 Gln His Gln Pro Gln Lys Arg Pro Pro Ala Pro Ser Gly Thr Gln Val
 305 310 315 320
 His Gln Gln Lys Gly Pro Pro Leu Pro Arg Pro Arg Val Gln Pro Lys
 325 330 335
 Pro Pro His Gly Ala Ala Glu Asn Ser Leu Ser Pro Ser Ser Asn
 340 345 350

<210> 24

<211> 180

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> CD160

10

<400> 24

Met Leu Leu Glu Pro Gly Arg Gly Cys Cys Ala Leu Ala Ile Leu Leu
 1 5 10 15
 Ala Ile Val Asp Ile Gln Ser Gly Gly Cys Ile Asn Ile Thr Ser Ser
 20 25 30
 Ala Ser Gln Glu Gly Thr Arg Leu Asn Leu Ile Cys Thr Val Trp His
 35 40 45
 Lys Lys Glu Glu Ala Glu Gly Phe Val Val Phe Leu Cys Lys Asp Arg
 50 55 60
 Ser Gly Asp Cys Ser Pro Glu Thr Ser Leu Lys Gln Leu Arg Leu Lys
 65 70 75 80
 Arg Asp Pro Gly Ile Asp Gly Val Gly Glu Ile Ser Ser Gln Leu Met
 85 90 95
 Phe Thr Ile Ser Gln Val Thr Pro Leu His Ser Gly Thr Tyr Gln Cys
 100 105 110
 Cys Ala Arg Ser Gln Lys Ser Gly Ile Arg Leu Gln Gly His Phe Phe
 115 120 125
 Ser Ile Leu Phe Thr Glu Thr Gly Asn Tyr Thr Val Thr Gly Leu Lys
 130 135 140
 Gln Arg Gln His Leu Glu Phe Ser His Asn Glu Gly Thr Leu Ser Ser
 145 150 155 160
 Gly Phe Leu Gln Glu Lys Val Trp Val Met Leu Val Thr Ser Leu Val
 165 170 175
 Ala Leu Gln Ala
 180

<210> 25

<211> 278

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> CD200

10

<400> 25

Met Glu Arg Leu Val Ile Arg Met Pro Phe Ser His Leu Ser Thr Tyr
 1 5 10 15
 Ser Leu Val Trp Val Met Ala Ala Val Val Leu Cys Thr Ala Gln Val
 20 25 30
 Gln Val Val Thr Gln Asp Glu Arg Glu Gln Leu Tyr Thr Pro Ala Ser
 35 40 45
 Leu Lys Cys Ser Leu Gln Asn Ala Gln Glu Ala Leu Ile Val Thr Trp
 50 55 60
 Gln Lys Lys Ala Val Ser Pro Glu Asn Met Val Thr Phe Ser Glu
 65 70 75 80
 Asn His Gly Val Val Ile Gln Pro Ala Tyr Lys Asp Lys Ile Asn Ile
 85 90 95
 Thr Gln Leu Gly Leu Gln Asn Ser Thr Ile Thr Phe Trp Asn Ile Thr
 100 105 110
 Leu Glu Asp Glu Gly Cys Tyr Met Cys Leu Phe Asn Thr Phe Gly Phe
 115 120 125
 Gly Lys Ile Ser Gly Thr Ala Cys Leu Thr Val Tyr Val Gln Pro Ile
 130 135 140
 Val Ser Leu His Tyr Lys Phe Ser Glu Asp His Leu Asn Ile Thr Cys
 145 150 155 160
 Ser Ala Thr Ala Arg Pro Ala Pro Met Val Phe Trp Lys Val Pro Arg
 165 170 175
 Ser Gly Ile Glu Asn Ser Thr Val Thr Leu Ser His Pro Asn Gly Thr
 180 185 190
 Thr Ser Val Thr Ser Ile Leu His Ile Lys Asp Pro Lys Asn Gln Val
 195 200 205

Gly Lys Glu Val Ile Cys Gln Val Leu His Leu Gly Thr Val Thr Asp
 210 215 220
 Phe Lys Gln Thr Val Asn Lys Gly Tyr Trp Phe Ser Val Pro Leu Leu
 225 230 235 240
 Leu Ser Ile Val Ser Leu Val Ile Leu Leu Val Leu Ile Ser Ile Leu
 245 250 255
 Leu Tyr Trp Lys Arg His Arg Asn Gln Asp Arg Gly Glu Leu Ser Gln
 260 265 270
 Gly Val Gln Lys Met Thr
 275

5 <210> 26
 <211> 325
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 10 <220>
 <223> CD200R1 (CD200R)
 10 <400> 26
 Met Leu Cys Pro Trp Arg Thr Ala Asn Leu Gly Leu Leu Ile Leu
 1 5 10 15
 Thr Ile Phe Leu Val Ala Ala Ser Ser Ser Leu Cys Met Asp Glu Lys
 20 25 30
 Gln Ile Thr Gln Asn Tyr Ser Lys Val Leu Ala Glu Val Asn Thr Ser
 35 40 45
 Trp Pro Val Lys Met Ala Thr Asn Ala Val Leu Cys Cys Pro Pro Ile
 50 55 60
 Ala Leu Arg Asn Leu Ile Ile Thr Trp Glu Ile Ile Leu Arg Gly
 65 70 75 80
 Gln Pro Ser Cys Thr Lys Ala Tyr Arg Lys Glu Thr Asn Glu Thr Lys
 85 90 95
 Glu Thr Asn Cys Thr Asp Glu Arg Ile Thr Trp Val Ser Arg Pro Asp
 100 105 110
 Gln Asn Ser Asp Leu Gln Ile Arg Pro Val Ala Ile Thr His Asp Gly
 115 120 125
 Tyr Tyr Arg Cys Ile Met Val Thr Pro Asp Gly Asn Phe His Arg Gly
 130 135 140
 Tyr His Leu Gln Val Leu Val Thr Pro Glu Val Thr Leu Phe Gln Asn
 145 150 155 160
 Arg Asn Arg Thr Ala Val Cys Lys Ala Val Ala Gly Lys Pro Ala Ala
 165 170 175
 Gln Ile Ser Trp Ile Pro Glu Gly Asp Cys Ala Thr Lys Gln Glu Tyr
 180 185 190
 Trp Ser Asn Gly Thr Val Thr Val Lys Ser Thr Cys His Trp Glu Val
 195 200 205
 His Asn Val Ser Thr Val Thr Cys His Val Ser His Leu Thr Gly Asn
 210 215 220
 Lys Ser Leu Tyr Ile Glu Leu Leu Pro Val Pro Gly Ala Lys Lys Ser
 225 230 235 240
 Ala Lys Leu Tyr Ile Pro Tyr Ile Ile Leu Thr Ile Ile Ile Leu Thr
 245 250 255
 Ile Val Gly Phe Ile Trp Leu Leu Lys Val Asn Gly Cys Arg Lys Tyr
 260 265 270
 Lys Leu Asn Lys Thr Glu Ser Thr Pro Val Val Glu Glu Asp Glu Met
 275 280 285
 Gln Pro Tyr Ala Ser Tyr Thr Glu Lys Asn Asn Pro Leu Tyr Asp Thr
 290 295 300
 Thr Asn Lys Val Lys Ala Ser Glu Ala Leu Gln Ser Glu Val Asp Thr
 305 310 315 320
 Asp Leu His Thr Leu
 325
 15 <210> 27
 <211> 201
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 20 <220>
 <223> NC R3 (NKp30)
 20 <400> 27

Met Ala Trp Met Leu Leu Leu Ile Leu Ile Met Val His Pro Gly Ser
 1 5 10 15
 Cys Ala Leu Trp Val Ser Gln Pro Pro Glu Ile Arg Thr Leu Glu Gly
 20 25 30
 Ser Ser Ala Phe Leu Pro Cys Ser Phe Asn Ala Ser Gln Gly Arg Leu
 35 40 45
 Ala Ile Gly Ser Val Thr Trp Phe Arg Asp Glu Val Val Pro Gly Lys
 50 55 60
 Glu Val Arg Asn Gly Thr Pro Glu Phe Arg Gly Arg Leu Ala Pro Leu
 65 70 75 80
 Ala Ser Ser Arg Phe Leu His Asp His Gln Ala Glu Leu His Ile Arg
 85 90 95
 Asp Val Arg Gly His Asp Ala Ser Ile Tyr Val Cys Arg Val Glu Val
 100 105 110
 Leu Gly Leu Gly Val Gly Thr Gly Asn Gly Thr Arg Leu Val Val Glu
 115 120 125
 Lys Glu His Pro Gln Leu Gly Ala Gly Thr Val Leu Leu Leu Arg Ala
 130 135 140
 Gly Phe Tyr Ala Val Ser Phe Leu Ser Val Ala Val Gly Ser Thr Val
 145 150 155 160
 Tyr Tyr Gln Gly Lys Cys Leu Thr Trp Lys Gly Pro Arg Arg Gln Leu
 165 170 175
 Pro Ala Val Val Pro Ala Pro Leu Pro Pro Pro Cys Gly Ser Ser Ala
 180 185 190
 His Leu Leu Pro Pro Val Pro Gly Gly
 195 200

<210> 28

<211> 208

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> ECD de CD80 (B7-1)

10

<400> 28

Val Ile His Val Thr Lys Glu Val Lys Glu Val Ala Thr Leu Ser Cys
 1 5 10 15
 Gly His Asn Val Ser Val Glu Glu Leu Ala Gln Thr Arg Ile Tyr Trp
 20 25 30
 Gln Lys Glu Lys Lys Met Val Leu Thr Met Met Ser Gly Asp Met Asn
 35 40 45
 Ile Trp Pro Glu Tyr Lys Asn Arg Thr Ile Phe Asp Ile Thr Asn Asn
 50 55 60
 Leu Ser Ile Val Ile Leu Ala Leu Arg Pro Ser Asp Glu Gly Thr Tyr
 65 70 75 80
 Glu Cys Val Val Leu Lys Tyr Glu Lys Asp Ala Phe Lys Arg Glu His
 85 90 95
 Leu Ala Glu Val Thr Leu Ser Val Lys Ala Asp Phe Pro Thr Pro Ser
 100 105 110
 Ile Ser Asp Phe Glu Ile Pro Thr Ser Asn Ile Arg Arg Ile Ile Cys
 115 120 125
 Ser Thr Ser Gly Gly Phe Pro Glu Pro His Leu Ser Trp Leu Glu Asn
 130 135 140
 Gly Glu Glu Leu Asn Ala Ile Asn Thr Thr Val Ser Gln Asp Pro Glu
 145 150 155 160
 Thr Glu Leu Tyr Ala Val Ser Ser Lys Leu Asp Phe Asn Met Thr Thr
 165 170 175
 Asn His Ser Phe Met Cys Leu Ile Lys Tyr Gly His Leu Arg Val Asn
 180 185 190
 Gln Thr Phe Asn Trp Asn Thr Thr Lys Gln Glu His Phe Pro Asp Asn
 195 200 205

15

<210> 29

<211> 224

<212> PRT

<213> Homo sapiens

20

<220>

<223> ECD de CD86 (B7-2)

<400> 29

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

5

<210> 30

<211> 220

<212> PRT

<213> Homo sapiens

10

<220>

<223> ECD de CD274 (PD-L1, B7-H1)

<400> 30

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

<210> 31
 <211> 201
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5

<220>
 <223> ECD de PDCD1LG2 (PD-L2, CD273)

<400> 31

Leu	Phe	Thr	Val	Thr	Val	Pro	Lys	Glu	Leu	Tyr	Ile	Ile	Glu	His	Gly
1									10					15	
Ser	Asn	Val	Thr	Leu	Glu	Cys	Asn	Phe	Asp	Thr	Gly	Ser	His	Val	Asn
									25					30	
Leu	Gly	Ala	Ile	Thr	Ala	Ser	Leu	Gln	Lys	Val	Glu	Asn	Asp	Thr	Ser
									40					45	
Pro	His	Arg	Glu	Arg	Ala	Thr	Leu	Leu	Glu	Glu	Gln	Leu	Pro	Leu	Gly
									55					60	
Lys	Ala	Ser	Phe	His	Ile	Pro	Gln	Val	Gln	Val	Arg	Asp	Glu	Gly	Gln
									70					80	
Tyr	Gln	Cys	Ile	Ile	Ile	Tyr	Gly	Val	Ala	Trp	Asp	Tyr	Lys	Tyr	Leu
									85					95	
Thr	Leu	Lys	Val	Lys	Ala	Ser	Tyr	Arg	Lys	Ile	Asn	Thr	His	Ile	Leu
									100					110	
Lys	Val	Pro	Glu	Thr	Asp	Glu	Val	Glu	Leu	Thr	Cys	Gln	Ala	Thr	Gly
									115					125	
Tyr	Pro	Leu	Ala	Glu	Val	Ser	Trp	Pro	Asn	Val	Ser	Val	Pro	Ala	Asn
									130					140	
Thr	Ser	His	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Gly	Leu	Tyr	Gln	Val	Thr	Ser	Val
									145					160	
Leu	Arg	Leu	Lys	Pro	Pro	Pro	Gly	Arg	Asn	Phe	Ser	Cys	Val	Phe	Trp
									165					175	
Asn	Thr	His	Val	Arg	Glu	Leu	Thr	Leu	Ala	Ser	Ile	Asp	Leu	Gln	Ser
									180					190	
Gln	Met	Glu	Pro	Arg	Thr	His	Pro	Thr							
									195					200	

10

<210> 32
 <211> 238
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <223> ECD de ICOSLG (B7RP1, CD275, ICOSL, B7-H2)

20

<400> 32

Asp Thr Gln Glu Lys Glu Val Arg Ala Met Val Gly Ser Asp Val Glu
 1 5 10 15
 Leu Ser Cys Ala Cys Pro Glu Gly Ser Arg Phe Asp Leu Asn Asp Val
 20 25 30
 Tyr Val Tyr Trp Gln Thr Ser Glu Ser Lys Thr Val Val Thr Tyr His
 35 40 45
 Ile Pro Gln Asn Ser Ser Leu Glu Asn Val Asp Ser Arg Tyr Arg Asn
 50 55 60
 Arg Ala Leu Met Ser Pro Ala Gly Met Leu Arg Gly Asp Phe Ser Leu
 65 70 75 80
 Arg Leu Phe Asn Val Thr Pro Gln Asp Glu Gln Lys Phe His Cys Leu
 85 90 95
 Val Leu Ser Gln Ser Leu Gly Phe Gln Glu Val Leu Ser Val Glu Val
 100 105 110
 Thr Leu His Val Ala Ala Asn Phe Ser Val Pro Val Val Ser Ala Pro
 115 120 125
 His Ser Pro Ser Gln Asp Glu Leu Thr Phe Thr Cys Thr Ser Ile Asn
 130 135 140
 Gly Tyr Pro Arg Pro Asn Val Tyr Trp Ile Asn Lys Thr Asp Asn Ser
 145 150 155 160
 Leu Leu Asp Gln Ala Leu Gln Asn Asp Thr Val Phe Leu Asn Met Arg
 165 170 175
 Gly Leu Tyr Asp Val Val Ser Val Leu Arg Ile Ala Arg Thr Pro Ser
 180 185 190
 Val Asn Ile Gly Cys Cys Ile Glu Asn Val Leu Leu Gln Gln Asn Leu
 195 200 205
 Thr Val Gly Ser Gln Thr Gly Asn Asp Ile Gly Glu Arg Asp Lys Ile
 210 215 220
 Thr Glu Asn Pro Val Ser Thr Gly Glu Lys Asn Ala Ala Thr
 225 230 235

<210> 33

<211> 438

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> ECD de CD276 (B7-H3)

10

<400> 33

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

85	90	95
Ser Ile Arg Asp Phe Gly Ser Ala Ala Val Ser Leu Gln Val Ala Ala		
100	105	110
Pro Tyr Ser Lys Pro Ser Met Thr Leu Glu Pro Asn Lys Asp Leu Arg		
115	120	125
Pro Gly Asp Thr Val Thr Ile Thr Cys Ser Ser Tyr Gln Gly Tyr Pro		
130	135	140
Glu Ala Glu Val Phe Trp Gln Asp Gly Gln Gly Val Pro Leu Thr Gly		
145	150	155
Asn Val Thr Thr Ser Gln Met Ala Asn Glu Gln Gly Leu Phe Asp Val		
165	170	175
His Ser Ile Leu Arg Val Val Leu Gly Ala Asn Gly Thr Tyr Ser Cys		
180	185	190
Leu Val Arg Asn Pro Val Leu Gln Gln Asp Ala His Ser Ser Val Thr		
195	200	205
Ile Thr Pro Gln Arg Ser Pro Thr Gly Ala Val Glu Val Gln Val Pro		
210	215	220
Glu Asp Pro Val Val Ala Leu Val Gly Thr Asp Ala Thr Leu Arg Cys		
225	230	235
Ser Phe Ser Pro Glu Pro Gly Phe Ser Leu Ala Gln Leu Asn Leu Ile		
245	250	255
Trp Gln Leu Thr Asp Thr Lys Gln Leu Val His Ser Phe Thr Glu Gly		
260	265	270
Arg Asp Gln Gly Ser Ala Tyr Ala Asn Arg Thr Ala Leu Phe Pro Asp		
275	280	285
Leu Leu Ala Gln Gly Asn Ala Ser Leu Arg Leu Gln Arg Val Arg Val		
290	295	300
Ala Asp Glu Gly Ser Phe Thr Cys Phe Val Ser Ile Arg Asp Phe Gly		
305	310	315
Ser Ala Ala Val Ser Leu Gln Val Ala Ala Pro Tyr Ser Lys Pro Ser		
325	330	335
Met Thr Leu Glu Pro Asn Lys Asp Leu Arg Pro Gly Asp Thr Val Thr		
340	345	350
Ile Thr Cys Ser Ser Tyr Arg Gly Tyr Pro Glu Ala Glu Val Phe Trp		
355	360	365
Gln Asp Gly Gln Gly Val Pro Leu Thr Gly Asn Val Thr Thr Ser Gln		
370	375	380
Met Ala Asn Glu Gln Gly Leu Phe Asp Val His Ser Val Leu Arg Val		
385	390	395
Val Leu Gly Ala Asn Gly Thr Tyr Ser Cys Leu Val Arg Asn Pro Val		
405	410	415
Leu Gln Gln Asp Ala His Gly Ser Val Thr Ile Thr Gly Gln Pro Met		
420	425	430
Thr Phe Pro Pro Glu Ala		
435		

<210> 34

<211> 235

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> ECD de VTCN1 (B7-H4)

10

<400> 34

Leu Ile Ile Gly Phe Gly Ile Ser Gly His Ser Ile Thr Val Thr			
1	5	10	15
Thr Val Ala Ser Ala Gly Asn Ile Gly Glu Asp Gly Ile Leu Ser Cys			
20	25	30	
Thr Phe Glu Pro Asp Ile Lys Leu Ser Asp Ile Val Ile Gln Trp Leu			
35	40	45	
Lys Glu Gly Val Leu Gly Leu Val His Glu Phe Lys Glu Gly Lys Asp			

50	55	60													
Glu	Leu	Ser	Glu	Gln	Asp	Glu	Met	Phe	Arg	Gly	Arg	Thr	Ala	Val	Phe
65			70			75									80
Ala	Asp	Gln	Val	Ile	Val	Gly	Asn	Ala	Ser	Leu	Arg	Leu	Lys	Asn	Val
			85			90								95	
Gln	Leu	Thr	Asp	Ala	Gly	Thr	Tyr	Lys	Cys	Tyr	Ile	Ile	Thr	Ser	Lys
			100			105								110	
Gly	Lys	Gly	Asn	Ala	Asn	Leu	Glu	Tyr	Lys	Thr	Gly	Ala	Phe	Ser	Met
			115			120								125	
Pro	Glu	Val	Asn	Val	Asp	Tyr	Asn	Ala	Ser	Ser	Glu	Thr	Leu	Arg	Cys
	130				135						140				
Glu	Ala	Pro	Arg	Trp	Phe	Pro	Gln	Pro	Thr	Val	Val	Trp	Ala	Ser	Gln
145				150			155							160	
Val	Asp	Gln	Gly	Ala	Asn	Phe	Ser	Glu	Val	Ser	Asn	Thr	Ser	Phe	Glu
				165			170							175	
Leu	Asn	Ser	Glu	Asn	Val	Thr	Met	Lys	Val	Val	Ser	Val	Leu	Tyr	Asn
				180			185							190	
Val	Thr	Ile	Asn	Asn	Thr	Tyr	Ser	Cys	Met	Ile	Glu	Asn	Asp	Ile	Ala
			195			200							205		
Lys	Ala	Thr	Gly	Asp	Ile	Lys	Val	Thr	Glu	Ser	Glu	Ile	Lys	Arg	Arg
	210				215						220				
Ser	His	Leu	Gln	Leu	Leu	Asn	Ser	Lys	Ala	Ser					
	225				230						235				

<210> 35

<211> 134

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> ECD de CD28

10

<400> 35

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

<210> 36

<211> 126

15 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

20 <223> ECD de CTLA4

<400> 36

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

<210> 37

<211> 150

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> ECD de PDCD1 (PD-1)

10

<400> 37
 Pro Gly Trp Phe Leu Asp Ser Pro Asp Arg Pro Trp Asn Pro Pro Thr
 1 5 10 15
 Phe Ser Pro Ala Leu Leu Val Val Thr Glu Gly Asp Asn Ala Thr Phe
 20 25 30
 Thr Cys Ser Phe Ser Asn Thr Ser Glu Ser Phe Val Leu Asn Trp Tyr
 35 40 45
 Arg Met Ser Pro Ser Asn Gln Thr Asp Lys Leu Ala Ala Phe Pro Glu
 50 55 60
 Asp Arg Ser Gln Pro Gly Gln Asp Cys Arg Phe Arg Val Thr Gln Leu
 65 70 75 80
 Pro Asn Gly Arg Asp Phe His Met Ser Val Val Arg Ala Arg Arg Asn
 85 90 95
 Asp Ser Gly Thr Tyr Leu Cys Gly Ala Ile Ser Leu Ala Pro Lys Ala
 100 105 110
 Gln Ile Lys Glu Ser Leu Arg Ala Glu Leu Arg Val Thr Glu Arg Arg
 115 120 125
 Ala Glu Val Pro Thr Ala His Pro Ser Pro Ser Pro Arg Pro Ala Gly
 130 135 140
 Gln Phe Gln Thr Leu Val
 145 150

<210> 38

15 <211> 120

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

20 <223> ECD de ICOS

<400> 38
 Glu Ile Asn Gly Ser Ala Asn Tyr Glu Met Phe Ile Phe His Asn Gly
 1 5 10 15
 Gly Val Gln Ile Leu Cys Lys Tyr Pro Asp Ile Val Gln Gln Phe Lys
 20 25 30
 Met Gln Leu Leu Lys Gly Gly Gln Ile Leu Cys Asp Leu Thr Lys Thr

35	40	45													
Lys	Gly	Ser	Gly	Asn	Thr	Val	Ser	Ile	Lys	Ser	Leu	Lys	Phe	Cys	His
50						55			60						
Ser	Gln	Leu	Ser	Asn	Asn	Ser	Val	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Asn	Leu	Asp
65						70			75			80			
His	Ser	His	Ala	Asn	Tyr	Tyr	Phe	Cys	Asn	Leu	Ser	Ile	Phe	Asp	Pro
							85		90			95			
Pro	Pro	Phe	Lys	Val	Thr	Leu	Thr	Gly	Gly	Tyr	Leu	His	Ile	Tyr	Glu
						100		105			110				
Ser	Gln	Leu	Cys	Cys	Gln	Leu	Lys								
						115		120							

<210> 39

<211> 127

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> ECD de BTLA (CD272)

10

<400> 39

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

<210> 40

15 <211> 371

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

20 <223> ECD de CD4

<400> 40

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

Ser Leu Thr Leu Thr Leu Glu Ser Pro Pro Gly Ser Ser Pro Ser Val
 115 120 125
 Gln Cys Arg Ser Pro Arg Gly Lys Asn Ile Gln Gly Gly Lys Thr Leu
 130 135 140
 Ser Val Ser Gln Leu Glu Leu Gln Asp Ser Gly Thr Trp Thr Cys Thr
 145 150 155 160
 Val Leu Gln Asn Gln Lys Lys Val Glu Phe Lys Ile Asp Ile Val Val
 165 170 175
 Leu Ala Phe Gln Lys Ala Ser Ser Ile Val Tyr Lys Glu Gly Glu
 180 185 190
 Gln Val Glu Phe Ser Phe Pro Leu Ala Phe Thr Val Glu Lys Leu Thr
 195 200 205
 Gly Ser Gly Glu Leu Trp Trp Gln Ala Glu Arg Ala Ser Ser Ser Lys
 210 215 220
 Ser Trp Ile Thr Phe Asp Leu Lys Asn Lys Glu Val Ser Val Lys Arg
 225 230 235 240
 Val Thr Gln Asp Pro Lys Leu Gln Met Gly Lys Lys Leu Pro Leu His
 245 250 255
 Leu Thr Leu Pro Gln Ala Leu Pro Gln Tyr Ala Gly Ser Gly Asn Leu
 260 265 270
 Thr Leu Ala Leu Glu Ala Lys Thr Gly Lys Leu His Gln Glu Val Asn
 275 280 285
 Leu Val Val Met Arg Ala Thr Gln Leu Gln Lys Asn Leu Thr Cys Glu
 290 295 300
 Val Trp Gly Pro Thr Ser Pro Lys Leu Met Leu Ser Leu Lys Leu Glu
 305 310 315 320
 Asn Lys Glu Ala Lys Val Ser Lys Arg Glu Lys Ala Val Trp Val Leu
 325 330 335
 Asn Pro Glu Ala Gly Met Trp Gln Cys Leu Leu Ser Asp Ser Gly Gln
 340 345 350
 Val Leu Leu Glu Ser Asn Ile Lys Val Leu Pro Thr Trp Ser Thr Pro
 355 360 365
 Val Gln Pro
 370

<210> 41

<211> 161

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> ECD de CD8A (CD8-alfa)

10

<400> 41
 Ser Gln Phe Arg Val Ser Pro Leu Asp Arg Thr Trp Asn Leu Gly Glu
 1 5 10 15
 Thr Val Glu Leu Lys Cys Gln Val Leu Leu Ser Asn Pro Thr Ser Gly
 20 25 30
 Cys Ser Trp Leu Phe Gln Pro Arg Gly Ala Ala Ala Ser Pro Thr Phe
 35 40 45
 Leu Leu Tyr Leu Ser Gln Asn Lys Pro Lys Ala Ala Glu Gly Leu Asp
 50 55 60
 Thr Gln Arg Phe Ser Gly Lys Arg Leu Gly Asp Thr Phe Val Leu Thr
 65 70 75 80
 Leu Ser Asp Phe Arg Arg Glu Asn Glu Gly Tyr Tyr Phe Cys Ser Ala
 85 90 95
 Leu Ser Asn Ser Ile Met Tyr Phe Ser His Phe Val Pro Val Phe Leu
 100 105 110
 Pro Ala Lys Pro Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala
 115 120 125
 Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg
 130 135 140

Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys
 145 150 155 160

Asp

15

<210> 42

<211> 149

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> ECD de CD8B (CD8-beta)

5

<400> 42

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

<210> 43

10 <211> 422

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

15 <223> ECD de LAG3

<400> 43

Val Pro Val Val Trp Ala Gln Glu Gly Ala Pro Ala Gln Leu Pro Cys
 1 5 10 15
 Ser Pro Thr Ile Pro Leu Gln Asp Leu Ser Leu Leu Arg Arg Ala Gly
 20 25 30
 Val Thr Trp Gln His Gln Pro Asp Ser Gly Pro Pro Ala Ala Ala Pro
 35 40 45
 Gly His Pro Leu Ala Pro Gly Pro His Pro Ala Ala Pro Ser Ser Trp
 50 55 60
 Gly Pro Arg Pro Arg Arg Tyr Thr Val Leu Ser Val Gly Pro Gly Gly
 65 70 75 80
 Leu Arg Ser Gly Arg Leu Pro Leu Gln Pro Arg Val Gln Leu Asp Glu
 85 90 95
 Arg Gly Arg Gln Arg Gly Asp Phe Ser Leu Trp Leu Arg Pro Ala Arg
 100 105 110
 Arg Ala Asp Ala Gly Glu Tyr Arg Ala Ala Val His Leu Arg Asp Arg
 115 120 125
 Ala Leu Ser Cys Arg Leu Arg Leu Arg Leu Gly Gln Ala Ser Met Thr

130	135	140
Ala Ser Pro Pro Gly Ser	Leu Arg Ala Ser Asp	Trp Val Ile Leu Asn
145	150	155
Cys Ser Phe Ser Arg Pro Asp Arg Pro	Ala Ser Val His	Trp Phe Arg
165	170	175
Asn Arg Gly Gln Gly Arg Val Pro Val	Arg Glu Ser Pro His	His His His
180	185	190
Leu Ala Glu Ser Phe Leu Phe	Leu Pro Gln Val Ser Pro	Met Asp Ser
195	200	205
Gly Pro Trp Gly Cys Ile	Leu Thr Tyr Arg Asp	Gly Phe Asn Val Ser
210	215	220
Ile Met Tyr Asn Leu Thr Val	Leu Gly Leu Glu Pro	Pro Thr Pro Leu
225	230	235
Thr Val Tyr Ala Gly Ala Gly Ser Arg	Val Gly Leu Pro Cys	Arg Leu
245	250	255
Pro Ala Gly Val Gly Thr Arg Ser	Phe Leu Thr Ala Lys	Trp Thr Pro
260	265	270
Pro Gly Gly Pro Asp Leu	Leu Val Thr Gly Asp	Asn Gly Asp Phe
275	280	285
Thr Leu Arg Leu Glu Asp Val	Ser Gln Ala Gln Ala	Gly Thr Tyr Thr
290	295	300
Cys His Ile His Leu Gln	Glu Gln Leu Asn Ala	Thr Val Thr Leu
305	310	315
Ala Ile Ile Thr Val Thr Pro	Lys Ser Phe Gly Ser	Pro Gly Ser Leu
325	330	335
Gly Lys Leu Leu Cys	Glu Val Thr Pro Val Ser	Gly Gln Glu Arg Phe
340	345	350
Val Trp Ser Ser Leu Asp Thr	Pro Ser Gln Arg Ser	Phe Ser Gly Pro
355	360	365
Trp Leu Glu Ala Gln Glu	Ala Gln Leu Leu Ser	Gln Pro Trp Gln Cys
370	375	380
Gln Leu Tyr Gln Gly	Glu Arg Leu Leu Gly	Ala Ala Val Tyr Phe Thr
385	390	395
Glu Leu Ser Ser Pro	Gly Ala Gln Arg Ser	Gly Arg Ala Pro Gly Ala
405	410	415
Leu Pro Ala Gly His Leu		
420		

<210> 44

<211> 181

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> ECD de HAVCR2 (TIM-3)

10

<400> 44

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

115	120	125
Arg Met Leu Thr Thr Arg Gly His	Gly Pro Ala Glu Thr Gln Thr Leu	
130	135	140
Gly Ser Leu Pro Asp Ile Asn Leu Thr Gln Ile Ser Thr Leu Ala Asn		
145	150	155
Glu Leu Arg Asp Ser Arg Leu Ala Asn Asp	Leu Arg Asp Ser Gly Ala	160
165	170	175
Thr Ile Arg Ile Gly		
180		

<210> 45

<211> 394

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> ECD de CEACAM1

10

<400> 45

Gln Leu Thr Thr Glu Ser Met Pro Phe Asn Val Ala Glu Gly Lys Glu		
1 5 10 15		
Val Leu Leu Leu Val His Asn Leu Pro Gln Gln Leu Phe Gly Tyr Ser		
20 25 30		
Trp Tyr Lys Gly Glu Arg Val Asp Gly Asn Arg Gln Ile Val Gly Tyr		
35 40 45		
Ala Ile Gly Thr Gln Gln Ala Thr Pro Gly Pro Ala Asn Ser Gly Arg		
50 55 60		
Glu Thr Ile Tyr Pro Asn Ala Ser Leu Leu Ile Gln Asn Val Thr Gln		
65 70 75 80		
Asn Asp Thr Gly Phe Tyr Thr Leu Gln Val Ile Lys Ser Asp Leu Val		
85 90 95		
Asn Glu Glu Ala Thr Gly Gln Phe His Val Tyr Pro Glu Leu Pro Lys		
100 105 110		
Pro Ser Ile Ser Ser Asn Asn Ser Asn Pro Val Glu Asp Lys Asp Ala		
115 120 125		
Val Ala Phe Thr Cys Glu Pro Glu Thr Gln Asp Thr Thr Tyr Leu Trp		
130 135 140		
Trp Ile Asn Asn Gln Ser Leu Pro Val Ser Pro Arg Leu Gln Leu Ser		
145 150 155 160		
Asn Gly Asn Arg Thr Leu Thr Leu Leu Ser Val Thr Arg Asn Asp Thr		
165 170 175		
Gly Pro Tyr Glu Cys Glu Ile Gln Asn Pro Val Ser Ala Asn Arg Ser		
180 185 190		
Asp Pro Val Thr Leu Asn Val Thr Tyr Gly Pro Asp Thr Pro Thr Ile		
195 200 205		
Ser Pro Ser Asp Thr Tyr Tyr Arg Pro Gly Ala Asn Leu Ser Leu Ser		
210 215 220		
Cys Tyr Ala Ala Ser Asn Pro Pro Ala Gln Tyr Ser Trp Leu Ile Asn		
225 230 235 240		
Gly Thr Phe Gln Gln Ser Thr Gln Glu Leu Phe Ile Pro Asn Ile Thr		
245 250 255		
Val Asn Asn Ser Gly Ser Tyr Thr Cys His Ala Asn Asn Ser Val Thr		
260 265 270		
Gly Cys Asn Arg Thr Thr Val Lys Thr Ile Ile Val Thr Glu Leu Ser		
275 280 285		
Pro Val Val Ala Lys Pro Gln Ile Lys Ala Ser Lys Thr Thr Val Thr		
290 295 300		
Gly Asp Lys Asp Ser Val Asn Leu Thr Cys Ser Thr Asn Asp Thr Gly		
305 310 315 320		
Ile Ser Ile Arg Trp Phe Phe Lys Asn Gln Ser Leu Pro Ser Ser Glu		
325 330 335		
Arg Met Lys Leu Ser Gln Gly Asn Thr Thr Leu Ser Ile Asn Pro Val		

340	345	350
Lys Arg Glu Asp Ala Gly Thr Tyr Trp Cys Glu Val Phe Asn Pro Ile		
355 360 365		
Ser Lys Asn Gln Ser Asp Pro Ile Met Leu Asn Val Asn Tyr Asn Ala		
370 375 380		
Leu Pro Gln Glu Asn Gly Leu Ser Pro Gly		
385 390		

15 <210> 46

<211> 120
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5 <220>
 <223> ECD de TIGIT

<400> 46
 Met Met Thr Gly Thr Ile Glu Thr Thr Gly Asn Ile Ser Ala Glu Lys
 1 5 10 15
 Gly Gly Ser Ile Ile Leu Gln Cys His Leu Ser Ser Thr Thr Ala Gln
 20 25 30
 Val Thr Gln Val Asn Trp Glu Gln Gln Asp Gln Leu Leu Ala Ile Cys
 35 40 45
 Asn Ala Asp Leu Gly Trp His Ile Ser Pro Ser Phe Lys Asp Arg Val
 50 55 60
 Ala Pro Gly Pro Gly Leu Gly Leu Thr Leu Gln Ser Leu Thr Val Asn
 65 70 75 80
 Asp Thr Gly Glu Tyr Phe Cys Ile Tyr His Thr Tyr Pro Asp Gly Thr
 85 90 95
 Tyr Thr Gly Arg Ile Phe Leu Glu Val Leu Glu Ser Ser Val Ala Glu
 100 105 110
 His Gly Ala Arg Phe Gln Ile Pro
 115 120

10 <210> 47
 <211> 323
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

15 <220>
 <223> ECD de PVR (CD155)

<400> 47
 Trp Pro Pro Pro Gly Thr Gly Asp Val Val Val Gln Ala Pro Thr Gln
 1 5 10 15
 Val Pro Gly Phe Leu Gly Asp Ser Val Thr Leu Pro Cys Tyr Leu Gln
 20 25 30
 Val Pro Asn Met Glu Val Thr His Val Ser Gln Leu Thr Trp Ala Arg
 35 40 45
 His Gly Glu Ser Gly Ser Met Ala Val Phe His Gln Thr Gln Gly Pro
 50 55 60
 Ser Tyr Ser Glu Ser Lys Arg Leu Glu Phe Val Ala Ala Arg Leu Gly
 65 70 75 80
 Ala Glu Leu Arg Asn Ala Ser Leu Arg Met Phe Gly Leu Arg Val Glu
 85 90 95
 Asp Glu Gly Asn Tyr Thr Cys Leu Phe Val Thr Phe Pro Gln Gly Ser
 100 105 110
 Arg Ser Val Asp Ile Trp Leu Arg Val Leu Ala Lys Pro Gln Asn Thr
 115 120 125
 Ala Glu Val Gln Lys Val Gln Leu Thr Gly Glu Pro Val Pro Met Ala
 130 135 140

20

Arg Cys Val Ser Thr Gly Gly Arg Pro Pro Ala Gln Ile Thr Trp His
 145 150 155 160
 Ser Asp Leu Gly Gly Met Pro Asn Thr Ser Gln Val Pro Gly Phe Leu
 165 170 175
 Ser Gly Thr Val Thr Val Thr Ser Leu Trp Ile Leu Val Pro Ser Ser
 180 185 190
 Gln Val Asp Gly Lys Asn Val Thr Cys Lys Val Glu His Glu Ser Phe
 195 200 205
 Glu Lys Pro Gln Leu Leu Thr Val Asn Leu Thr Val Tyr Tyr Pro Pro
 210 215 220
 Glu Val Ser Ile Ser Gly Tyr Asp Asn Asn Trp Tyr Leu Gly Gln Asn
 225 230 235 240
 Glu Ala Thr Leu Thr Cys Asp Ala Arg Ser Asn Pro Glu Pro Thr Gly
 245 250 255
 Tyr Asn Trp Ser Thr Thr Met Gly Pro Leu Pro Pro Phe Ala Val Ala
 260 265 270
 Gln Gly Ala Gln Leu Leu Ile Arg Pro Val Asp Lys Pro Ile Asn Thr
 275 280 285
 Thr Leu Ile Cys Asn Val Thr Asn Ala Leu Gly Ala Arg Gln Ala Glu
 290 295 300
 Leu Thr Val Gln Val Lys Glu Gly Pro Pro Ser Glu His Ser Gly Ile
 305 310 315 320
 Ser Arg Asn

<210> 48

<211> 329

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> ECD de PVRL2 (CD112)

10

<400> 48

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

Ser Val Arg Tyr Pro Pro Glu Val Ser Ile Ser Gly Tyr Asp Asp Asn
 225 230 235 240
 Trp Tyr Leu Gly Arg Thr Asp Ala Thr Leu Ser Cys Asp Val Arg Ser
 245 250 255
 Asn Pro Glu Pro Thr Gly Tyr Asp Trp Ser Thr Thr Ser Gly Thr Phe
 260 265 270
 Pro Thr Ser Ala Val Ala Gln Gly Ser Gln Leu Val Ile His Ala Val
 275 280 285
 Asp Ser Leu Phe Asn Thr Thr Phe Val Cys Thr Val Thr Asn Ala Val
 290 295 300
 Gly Met Gly Arg Ala Glu Gln Val Ile Phe Val Arg Glu Thr Pro Asn
 305 310 315 320
 Thr Ala Gly Ala Gly Ala Thr Gly Gly
 325

<210> 49

<211> 236

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> ECD de CD226

10

<400> 49

Glu Glu Val Leu Trp His Thr Ser Val Pro Phe Ala Glu Asn Met Ser
 1 5 10 15
 Leu Glu Cys Val Tyr Pro Ser Met Gly Ile Leu Thr Gln Val Glu Trp
 20 25 30
 Phe Lys Ile Gly Thr Gln Gln Asp Ser Ile Ala Ile Phe Ser Pro Thr
 35 40 45
 His Gly Met Val Ile Arg Lys Pro Tyr Ala Glu Arg Val Tyr Phe Leu
 50 55 60
 Asn Ser Thr Met Ala Ser Asn Asn Met Thr Leu Phe Phe Arg Asn Ala
 65 70 75 80
 Ser Glu Asp Asp Val Gly Tyr Tyr Ser Cys Ser Leu Tyr Thr Tyr Pro
 85 90 95
 Gln Gly Thr Trp Gln Lys Val Ile Gln Val Val Gln Ser Asp Ser Phe
 100 105 110
 Glu Ala Ala Val Pro Ser Asn Ser His Ile Val Ser Glu Pro Gly Lys
 115 120 125
 Asn Val Thr Leu Thr Cys Gln Pro Gln Met Thr Trp Pro Val Gln Ala
 130 135 140
 Val Arg Trp Glu Lys Ile Gln Pro Arg Gln Ile Asp Leu Leu Thr Tyr
 145 150 155 160
 Cys Asn Leu Val His Gly Arg Asn Phe Thr Ser Lys Phe Pro Arg Gln
 165 170 175
 Ile Val Ser Asn Cys Ser His Gly Arg Trp Ser Val Ile Val Ile Pro
 180 185 190
 Asp Val Thr Val Ser Asp Ser Gly Leu Tyr Arg Cys Tyr Leu Gln Ala
 195 200 205
 Ser Ala Gly Glu Asn Glu Thr Phe Val Met Arg Leu Thr Val Ala Glu
 210 215 220
 Gly Lys Thr Asp Asn Gln Tyr Thr Leu Phe Val Ala
 225 230 235

<210> 50

15 <211> 185

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

20 <223> ECD de CD2

<400> 50

Lys Glu Ile Thr Asn Ala Leu Glu Thr Trp Gly Ala Leu Gly Gln Asp
 1 5 10 15
 Ile Asn Leu Asp Ile Pro Ser Phe Gln Met Ser Asp Asp Ile Asp Asp
 20 25 30
 Ile Lys Trp Glu Lys Thr Ser Asp Lys Lys Ile Ala Gln Phe Arg
 35 40 45
 Lys Glu Lys Glu Thr Phe Lys Glu Lys Asp Thr Tyr Lys Leu Phe Lys
 50 55 60
 Asn Gly Thr Leu Lys Ile Lys His Leu Lys Thr Asp Asp Gln Asp Ile
 65 70 75 80
 Tyr Lys Val Ser Ile Tyr Asp Thr Lys Gly Lys Asn Val Leu Glu Lys
 85 90 95
 Ile Phe Asp Leu Lys Ile Gln Glu Arg Val Ser Lys Pro Lys Ile Ser
 100 105 110
 Trp Thr Cys Ile Asn Thr Thr Leu Thr Cys Glu Val Met Asn Gly Thr
 115 120 125
 Asp Pro Glu Leu Asn Leu Tyr Gln Asp Gly Lys His Leu Lys Leu Ser
 130 135 140
 Gln Arg Val Ile Thr His Lys Trp Thr Thr Ser Leu Ser Ala Lys Phe
 145 150 155 160
 Lys Cys Thr Ala Gly Asn Lys Val Ser Lys Glu Ser Ser Val Glu Pro
 165 170 175
 Val Ser Cys Pro Glu Lys Gly Leu Asp
 180 185

<210> 51

<211> 133

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> ECD de CD160

10

<400> 51

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

<210> 52

15 <211> 202

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

20 <223> ECD de CD200

<400> 52

Gln Val Gln Val Val Thr Gln Asp Glu Arg Glu Gln Leu Tyr Thr Pro
 1 5 10 15
 Ala Ser Leu Lys Cys Ser Leu Gln Asn Ala Gln Glu Ala Leu Ile Val
 20 25 30
 Thr Trp Gln Lys Lys Ala Val Ser Pro Glu Asn Met Val Thr Phe
 35 40 45
 Ser Glu Asn His Gly Val Val Ile Gln Pro Ala Tyr Lys Asp Lys Ile
 50 55 60
 Asn Ile Thr Gln Leu Gly Leu Gln Asn Ser Thr Ile Thr Phe Trp Asn
 65 70 75 80
 Ile Thr Leu Glu Asp Glu Gly Cys Tyr Met Cys Leu Phe Asn Thr Phe
 85 90 95
 Gly Phe Gly Lys Ile Ser Gly Thr Ala Cys Leu Thr Val Tyr Val Gln
 100 105 110
 Pro Ile Val Ser Leu His Tyr Lys Phe Ser Glu Asp His Leu Asn Ile
 115 120 125
 Thr Cys Ser Ala Thr Ala Arg Pro Ala Pro Met Val Phe Trp Lys Val
 130 135 140
 Pro Arg Ser Gly Ile Glu Asn Ser Thr Val Thr Leu Ser His Pro Asn
 145 150 155 160
 Gly Thr Thr Ser Val Thr Ser Ile Leu His Ile Lys Asp Pro Lys Asn
 165 170 175
 Gln Val Gly Lys Glu Val Ile Cys Gln Val Leu His Leu Gly Thr Val
 180 185 190
 Thr Asp Phe Lys Gln Thr Val Asn Lys Gly
 195 200

<210> 53

<211> 215

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> ECD de CD200R1 (CD200R)

10

<400> 53

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

His Trp Glu Val His Asn Val Ser Thr Val Thr Cys His Val Ser His
 180 185 190
 Leu Thr Gly Asn Lys Ser Leu Tyr Ile Glu Leu Leu Pro Val Pro Gly
 195 200 205

Ala Lys Lys Ser Ala Lys Leu
 210 215

15

<210> 54

<211> 117

<212> PRT

<213> Homo sapiens

20

<220>

<223> ECD de NC R3 (NKp30)

<400> 54

```

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

```

5

<210> 55

<211> 208

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> ECD de CD80 v1

15 <400> 55

```

Val Ile His Val Thr Lys Glu Val Lys Glu Val Ala Thr Leu Ser Cys
 1           5          10          15
Gly His Asn Val Ser Val Glu Glu Leu Ala Gln Thr Arg Ile Tyr Trp
 20          25          30
Gln Lys Glu Lys Lys Met Val Leu Thr Met Met Ser Gly Asp Met Asn
 35          40          45
Ile Trp Pro Glu Tyr Lys Asn Arg Thr Ile Phe Asp Ile Thr Asn Asn
 50          55          60
Leu Ser Ile Val Ile Gln Ala Leu Arg Pro Ser Asp Glu Gly Thr Tyr
 65          70          75          80
Glu Cys Val Val Leu Lys Tyr Glu Lys Asp Gly Phe Lys Arg Glu His
 85          90          95
Leu Ala Glu Val Thr Leu Ser Val Lys Ala Asp Phe Pro Thr Pro Ser
100         105         110
Ile Ser Asp Phe Glu Ile Pro Thr Ser Asn Ile Arg Arg Ile Ile Cys
115         120         125
Ser Thr Ser Gly Gly Phe Pro Glu Pro His Leu Ser Trp Leu Glu Asn
130         135         140
Gly Glu Glu Leu Asn Ala Ile Asn Thr Thr Val Ser Gln Asp Pro Glu
145         150         155         160
Thr Glu Leu Tyr Ala Val Ser Ser Lys Leu Asp Phe Asn Met Thr Thr
165         170         175
Asn His Ser Phe Met Cys Leu Ile Lys Tyr Gly His Leu Arg Val Asn
180         185         190
Gln Thr Phe Asn Trp Asn Thr Thr Lys Gln Glu His Phe Pro Asp Asn
195         200         205

```

20 <210> 56

<211> 208

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

25 <220>

<223> ECD de CD80 v2

<400> 56

Val Ile His Val Thr Lys Glu Val Lys Glu Val Ala Thr Leu Ser Cys
 1 5 10 15
 Gly His Asn Val Ser Val Glu Glu Leu Ala Gln Thr Arg Ile Tyr Trp
 20 25 30
 Gln Lys Glu Lys Lys Met Val Leu Thr Met Met Ser Gly Asp Met Asn
 35 40 45
 Ile Trp Pro Glu Tyr Lys Asn Arg Thr Ile Phe Asp Ile Thr Asn Asn
 50 55 60
 Leu Ser Ile Val Ile Gln Ala Leu Arg Pro Ser Asp Glu Gly Thr Tyr
 65 70 75 80
 Glu Cys Val Val Leu Lys Tyr Glu Lys Asp Gly Phe Lys Arg Glu His
 85 90 95
 Leu Ala Glu Val Thr Leu Ser Val Lys Ala Asp Phe Pro Thr Pro Ser
 100 105 110
 Ile Ser Asp Phe Glu Ile Pro Thr Ser Asn Ile Arg Arg Ile Ile Cys
 115 120 125
 Ser Ala Ser Gly Gly Phe Pro Glu Pro His Leu Ser Trp Leu Glu Asn
 130 135 140
 Gly Glu Glu Leu Asn Ala Ile Asn Thr Thr Val Ser Gln Asp Pro Glu
 145 150 155 160
 Thr Glu Leu Tyr Ala Val Ser Ser Lys Leu Asp Phe Asn Met Thr Thr
 165 170 175
 Asn His Ser Phe Met Cys Leu Ile Lys Tyr Gly His Leu Arg Val Asn
 180 185 190
 Gln Thr Phe Asn Trp Asn Thr Thr Lys Gln Glu His Phe Pro Asp Asn
 195 200 205

<210> 57

<211> 208

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> ECD de CD80 v3

10

<400> 57

Val Ile His Val Thr Lys Glu Val Lys Glu Val Ala Thr Leu Ser Cys
 1 5 10 15
 Gly His Asn Val Ser Val Glu Glu Leu Ala Gln Thr Arg Ile Tyr Trp
 20 25 30
 Gln Lys Glu Lys Lys Met Val Leu Thr Met Met Ser Gly Asp Met Asn
 35 40 45
 Ile Trp Pro Glu Tyr Lys Asn Arg Thr Ile Phe Asp Ile Thr Asn Asn
 50 55 60
 Leu Ser Ile Val Ile Gln Ala Leu Arg Pro Ser Asp Glu Gly Thr Tyr
 65 70 75 80
 Glu Cys Val Val Leu Lys Tyr Glu Lys Asp Gly Phe Lys Arg Glu His
 85 90 95
 Leu Ala Glu Val Thr Leu Ser Val Lys Ala Asp Phe Pro Thr Pro Ser
 100 105 110
 Ile Ser Asp Phe Glu Ala Pro Ser Ser Asn Ile Arg Arg Ile Ile Cys
 115 120 125
 Ser Ala Ser Gly Gly Phe Pro Glu Pro His Leu Ser Trp Leu Glu Asn
 130 135 140
 Gly Glu Glu Leu Asn Ala Ile Asn Thr Thr Val Ser Gln Asp Pro Glu
 145 150 155 160
 Thr Glu Leu Tyr Ala Val Ser Ser Lys Leu Asp Phe Asn Met Thr Thr
 165 170 175
 Asn His Ser Phe Met Cys Leu Ile Lys Tyr Gly His Leu Arg Val Asn
 180 185 190
 Gln Thr Phe Asn Trp Asn Thr Thr Lys Gln Glu His Phe Pro Asp Asn
 195 200 205

15

<210> 58

<211> 208

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20

<220>

<223> ECD de CD80 v4

<400> 58
 Val Ile His Met Thr Lys Glu Val Lys Glu Val Ala Thr Leu Ser Cys
 1 5 10 15
 Gly His Asn Val Ser Val Glu Glu Leu Ala Gln Thr Arg Ile Tyr Trp
 20 25 30
 Gln Lys Glu Lys Lys Met Val Leu Thr Met Met Ser Gly Asp Met Asn
 35 40 45
 Ile Trp Pro Glu Tyr Lys Asn Arg Thr Ile Phe Asp Ile Thr Asn Asn
 50 55 60
 Leu Ser Ile Val Ile Gln Ala Leu Arg Pro Ser Asp Glu Gly Thr Tyr
 65 70 75 80
 Glu Cys Val Val Leu Lys Tyr Glu Lys Asp Gly Phe Lys Arg Glu His
 85 90 95
 Leu Ala Glu Val Thr Leu Ser Val Lys Ala Asp Phe Pro Thr Pro Ser
 100 105 110
 Ile Ser Asp Phe Glu Ile Pro Ser Ser Asn Ile Arg Arg Ile Ile Cys
 115 120 125
 Ser Ala Ser Gly Gly Phe Pro Glu Pro His Leu Ser Trp Leu Glu Asn
 130 135 140
 Gly Glu Glu Leu Asn Ala Ile Asn Thr Thr Val Ser Gln Asp Pro Glu
 145 150 155 160
 Thr Glu Leu Tyr Ala Val Ser Ser Lys Leu Asp Phe Asn Met Thr Thr
 165 170 175
 Asn His Ser Phe Met Cys Leu Ile Lys Tyr Gly His Leu Arg Val Asn
 180 185 190
 Gln Thr Phe Asn Trp Asn Thr Thr Lys Gln Glu His Phe Pro Asp Asn
 195 200 205

5

10

<220>
<223> ECD de CD80 y5

<400> 59
 Val Ile His Val Thr Lys Glu Val Lys Glu Val Ala Thr Leu Ser Cys
 1 5 10 15
 Gly His Asn Val Ser Val Glu Glu Leu Ala Gln Thr Arg Ile Tyr Trp
 20 25 30
 Gln Lys Glu Lys Lys Met Val Leu Thr Met Met Ser Gly Asp Met Asn
 35 40 45
 Ile Trp Pro Glu Tyr Lys Asn Arg Thr Ile Phe Asp Ile Thr Asn Asn
 50 55 60
 Leu Ser Ile Val Ile Gln Ala Leu Arg Pro Ser Asp Glu Gly Thr Tyr
 65 70 75 80
 Glu Cys Val Val Leu Lys Tyr Glu Lys Asp Gly Phe Lys Arg Glu His
 85 90 95
 Leu Ala Glu Val Thr Leu Ser Val Lys Ala Asp Phe Pro Thr Pro Ser
 100 105 110
 Ile Ser Asp Phe Glu Ile Pro Ser Ser Asn Ile Arg Arg Ile Ile Cys
 115 120 125
 Ser Ala Ser Gly Gly Phe Pro Glu Pro His Leu Ser Trp Leu Glu Asn
 130 135 140
 Gly Glu Glu Leu Asn Ala Ile Asn Thr Thr Val Ser Gln Asp Pro Glu
 145 150 155 160
 Thr Glu Leu Tyr Ala Val Ser Ser Lys Leu Asp Phe Asn Met Thr Thr
 165 170 175
 Asn His Ser Phe Met Cys Leu Ile Lys Tyr Gly His Leu Arg Val Asn
 180 185 190
 Gln Thr Phe Asn Trp Asn Thr Thr Lys Gln Glu His Phe Pro Asp Asn
 195 200 205

15

<210> 60
<211> 208
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> ECD de CD80 v6

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

10 <210> 61
 <211> 208
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> ECD de CD80 v7

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

20 <210> 62
 <211> 208

<212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> ECD de CD80 v8

<400> 62
 Val Ile His Val Thr Lys Glu Val Lys Glu Val Ala Thr Leu Ser Cys
 1 5 10 15
 Gly His Asn Val Ser Val Glu Glu Leu Ala Gln Thr Arg Ile Tyr Trp
 20 25 30
 Gln Lys Glu Lys Lys Met Val Leu Thr Met Met Ser Gly Asp Met Asn
 35 40 45
 Ile Trp Pro Glu Tyr Lys Asn Arg Thr Ile Phe Asp Ile Thr Asn Asn
 50 55 60
 Leu Ser Ile Val Ile Gln Ala Leu Arg Pro Ser Asp Glu Gly Thr Tyr
 65 70 75 80
 Glu Cys Val Val Leu Lys Tyr Glu Lys Asp Gly Phe Lys Arg Glu His
 85 90 95

Leu Ala Glu Val Thr Leu Ser Val Lys Ala Asp Phe Pro Thr Pro Ser
 100 105 110
 Ile Ser Asp Phe Gly Ile Pro Ser Ser Asn Ile Arg Arg Ile Ile Cys
 115 120 125
 Ser Ala Ser Gly Gly Phe Pro Glu Pro His Leu Ser Trp Leu Glu Asn
 130 135 140
 Gly Glu Glu Leu Asn Ala Ile Asn Thr Thr Val Ser Gln Asp Pro Glu
 145 150 155 160
 Thr Glu Leu Tyr Ala Val Ser Ser Lys Leu Asp Phe Asn Met Thr Thr
 165 170 175
 Asn His Ser Phe Met Cys Leu Ile Lys Tyr Gly His Leu Arg Val Asn
 180 185 190
 Gln Thr Phe Asn Trp Asn Thr Thr Lys Gln Glu His Phe Pro Asp Asn
 10 195 200 205

<210> 63
 <211> 208
 <212> PRT
 15 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> ECD de CD80 v9

20 <400> 63
 Val Ile His Val Thr Lys Glu Val Lys Glu Val Ala Thr Leu Ser Cys
 1 5 10 15
 Gly His Asn Val Ser Val Glu Glu Leu Ala Gln Thr Arg Ile Tyr Trp
 20 25 30
 Gln Lys Glu Lys Lys Met Val Leu Thr Met Met Ser Gly Asp Met Asn
 35 40 45
 Ile Trp Pro Glu Tyr Lys Asn Arg Thr Ile Phe Asp Ile Thr Asn Asn
 50 55 60
 Leu Ser Ile Val Ile Leu Ala Leu Arg Pro Ser Asp Glu Gly Thr Tyr
 65 70 75 80
 Glu Cys Val Val Leu Lys Tyr Glu Lys Asp Gly Phe Lys Arg Glu His
 85 90 95
 Leu Ala Glu Val Thr Leu Ser Val Lys Ala Asp Phe Pro Thr Pro Ser
 100 105 110
 Ile Ser Asp Phe Glu Ile Pro Ser Ser Asn Ile Arg Arg Ile Ile Cys
 115 120 125
 Ser Ala Ser Gly Gly Phe Pro Glu Pro His Leu Ser Trp Leu Glu Asn
 130 135 140
 Gly Glu Glu Leu Asn Ala Ile Asn Thr Thr Val Ser Gln Asp Pro Glu
 145 150 155 160
 Thr Glu Leu Tyr Ala Val Ser Ser Lys Leu Asp Phe Asn Met Thr Thr
 165 170 175
 Asn His Ser Phe Met Cys Leu Ile Lys Tyr Gly His Leu Arg Val Asn
 180 185 190
 Gln Thr Phe Asn Trp Asn Thr Thr Lys Gln Glu His Phe Pro Asp Asn
 195 200 205

5 <210> 64
 <211> 208
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 10 <220>
 <223> ECD de CD80 v10
 10 <400> 64
 Val Ile His Val Thr Lys Glu Val Lys Glu Val Ala Thr Leu Ser Cys

1	5	10	15	
Gly	His Asn Val Ser Val Glu Glu	Leu Ala Gln Thr Arg Ile Tyr Trp		
	20	25	30	
Gln	Lys Glu Lys Lys Met Val	Leu Thr Met Met Ser	Gly Asp Met Asn	
	35	40	45	
Ile	Trp Pro Glu Tyr Lys Asn Arg Thr	Ile Phe Asp Ile Thr Asn Asn		
	50	55	60	
Leu	Ser Ile Val Ile Arg Ala	Leu Arg Pro Ser Asp Glu Gly Thr Tyr		
	65	70	75	80
Glu	Cys Val Val	Leu Lys Tyr Glu Lys Asp	Gly Phe Lys Arg Glu His	
	85	90	95	
Leu	Ala Glu Val Thr Leu Ser Val	Lys Ala Asp Phe Pro Thr Pro Ser		
	100	105	110	
Ile	Ser Asp Phe Glu Ile Pro Ser	Ser Asn Ile Arg Arg	Ile Ile Cys	
	115	120	125	
Ser	Ala Ser Gly Gly Phe Pro	Glu Pro His Leu Ser Trp	Leu Glu Asn	
	130	135	140	
Gly	Glu Glu Leu Asn Ala Ile Asn Thr	Thr Val Ser Gln Asp Pro Glu		
	145	150	155	160
Thr	Glu Leu Tyr Ala Val Ser Ser Lys	Leu Asp Phe Asn Met	Thr Thr	
	165	170	175	
Asn	His Ser Phe Met Cys Leu Ile	Lys Tyr Gly His Leu Arg Val Asn		
	180	185	190	
Gln	Thr Phe Asn Trp Asn Thr	Thr Lys Gln Glu His Phe Pro Asp Asn		
	195	200	205	

15 <210> 65
 <211> 208
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 20 <220>
 <223> ECD de CD80 v11
 <400> 65

Val Ile His Val Thr Lys Glu Val Lys Glu Val Ala Thr Leu Ser Cys
 1 5 10 15
 Gly His Asn Val Ser Val Glu Glu Leu Ala Gln Thr Arg Ile Tyr Trp
 20 25 30
 Gln Lys Glu Lys Lys Met Val Leu Thr Met Met Ser Gly Asp Met Asn
 35 40 45
 Ile Trp Pro Glu Tyr Lys Asn Arg Thr Ile Phe Asp Ile Thr Asn Asn
 50 55 60
 Leu Ser Ile Val Ile Gln Ala Leu Arg Pro Ser Asp Glu Gly Thr Tyr
 65 70 75 80
 Ala Cys Val Val Leu Lys Tyr Glu Lys Asp Gly Phe Lys Arg Glu His
 85 90 95
 Leu Ala Glu Val Thr Leu Ser Val Lys Ala Asp Phe Pro Thr Pro Ser
 100 105 110
 Ile Ser Asp Phe Glu Ile Pro Ser Ser Asn Ile Arg Arg Ile Thr Cys
 115 120 125
 Ser Ala Ser Gly Gly Phe Pro Glu Pro His Leu Ser Trp Leu Glu Asn
 130 135 140
 Gly Glu Glu Leu Asn Ala Ile Asn Thr Thr Val Ser Gln Asp Pro Glu
 145 150 155 160
 Thr Glu Leu Tyr Ala Val Ser Ser Lys Leu Asp Phe Asn Met Thr Thr
 165 170 175
 Asn His Ser Phe Met Cys Leu Ile Lys Tyr Gly His Leu Arg Val Asn
 180 185 190
 Gln Thr Phe Asn Trp Asn Thr Thr Lys Gln Glu His Phe Pro Asp Asn
 195 200 205

<210> 66

<211> 208

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> ECD de CD80 v12

10

<400> 66

Val Ile His Val Thr Lys Glu Val Lys Glu Val Ala Thr Leu Ser Cys
 1 5 10 15
 Gly His Asn Val Ser Val Glu Glu Leu Ala Gln Thr Arg Ile Tyr Trp
 20 25 30
 Gln Lys Glu Lys Lys Met Val Leu Thr Met Met Ser Gly Asp Met Asn
 35 40 45
 Ile Trp Pro Glu Tyr Lys Asn Arg Thr Ile Phe Asp Ile Thr Asn Asn
 50 55 60
 Leu Ser Ile Val Ile Gln Ala Leu Arg Pro Ser Asp Glu Gly Thr Tyr
 65 70 75 80
 Glu Cys Val Val Leu Lys Asn Glu Lys Asp Gly Phe Lys Arg Glu His
 85 90 95
 Leu Ala Glu Val Thr Leu Ser Val Lys Ala Asp Phe Pro Thr Pro Ser
 100 105 110
 Ile Ser Asp Phe Glu Ile Pro Thr Ser Asn Ile Arg Arg Ile Ile Cys
 115 120 125
 Ser Ala Ser Gly Gly Phe Pro Glu Pro His Leu Ser Trp Leu Glu Asn
 130 135 140
 Gly Glu Glu Leu Asn Ala Ile Asn Thr Thr Val Ser Gln Asp Pro Glu
 145 150 155 160
 Thr Glu Leu Tyr Ala Val Ser Ser Lys Leu Asp Phe Asn Met Thr Thr
 165 170 175
 Asn His Ser Phe Met Cys Leu Ile Lys Tyr Gly His Leu Arg Val Asn
 180 185 190
 Gln Thr Phe Asn Trp Asn Thr Thr Lys Gln Glu His Phe Pro Asp Asn
 195 200 205

<210> 67

<211> 208

15 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

20 <223> ECD de CD80 v13

<400> 67

Val Ile His Val Thr Lys Glu Val Lys Glu Val Ala Thr Leu Ser Cys
 1 5 10 15

Gly His Asn Val Ser Val Glu Glu Leu Ala Gln Ser Arg Ile Tyr Trp
 20 25 30

Gln Lys Glu Lys Lys Met Val Leu Thr Met Met Ser Gly Asp Met Asn
 35 40 45

Ile Trp Pro Glu Tyr Lys Asn Arg Thr Ile Phe Asp Ile Thr Asn Asn
 50 55 60

Leu Ser Ile Val Ile Gln Ala Leu Arg Pro Ser Asp Glu Gly Thr Tyr
 65 70 75 80

Glu Cys Val Val Leu Lys Tyr Glu Lys Asp Gly Phe Lys Arg Lys His
 85 90 95

Leu Ala Glu Val Thr Leu Ser Val Lys Ala Asp Phe Pro Thr Pro Ser
 100 105 110

Ile Ser Asp Phe Glu Ile Pro Ser Ser Asn Ile Arg Arg Ile Ile Cys
 115 120 125

Ser Ala Ser Gly Gly Phe Pro Glu Pro His Leu Ser Trp Leu Glu Asn
 130 135 140

Gly Glu Glu Leu Asn Ala Ile Asn Thr Thr Val Ser Gln Asp Pro Glu
 145 150 155 160

Thr Glu Leu Tyr Ala Val Ser Ser Lys Leu Asp Phe Asn Met Thr Thr
 165 170 175

Asn His Ser Phe Met Cys Leu Ile Lys Tyr Gly His Leu Arg Val Asn
 180 185 190

Gln Thr Phe Asn Trp Asn Thr Thr Lys Gln Glu His Phe Pro Asp Asn
 195 200 205

5 <210> 68
 <211> 208
 <212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> ECD de CD80 v14

15 <400> 68

Val Ile His Val Thr Lys Glu Val Lys Glu Val Ala Thr Leu Ser Cys
 1 5 10 15

Gly His Asn Val Ser Val Glu Glu Leu Ala Gln Thr Arg Ile Tyr Trp
 20 25 30

Gln Lys Glu Lys Lys Met Val Leu Thr Met Met Ser Gly Asp Met Asn
 35 40 45

Ile Trp Pro Glu Tyr Lys Asn Arg Thr Ile Phe Asp Ile Thr Ser Asn
 50 55 60

Leu Ser Ile Val Ile Gln Ala Leu Arg Pro Ser Asp Glu Gly Thr Tyr
 65 70 75 80

Glu Cys Val Val Leu Lys Tyr Glu Lys Asp Gly Phe Lys Arg Glu His
 85 90 95

Leu Ala Glu Val Thr Leu Ser Val Lys Ala Asp Phe Pro Thr Pro Ser
 100 105 110

Ile Ser Asp Phe Glu Ile Pro Ser Ser Asn Ile Arg Arg Ile Ile Cys
 115 120 125

Ser Ala Ser Gly Gly Phe Pro Glu Pro His Leu Ser Trp Leu Glu Asn
 130 135 140

Gly Glu Glu Leu Asn Ala Ile Asn Thr Thr Val Ser Gln Asp Pro Glu
 145 150 155 160

Thr Glu Leu Tyr Ala Val Ser Ser Lys Leu Asp Phe Asn Met Thr Thr
 165 170 175

Asn His Ser Phe Met Cys Leu Ile Lys Tyr Gly His Leu Arg Val Asn
 180 185 190

Gln Thr Phe Asn Trp Asn Thr Thr Lys Gln Glu His Phe Pro Asp Asn
 195 200 205

<210> 69
 <211> 208
 <212> PRT

20 <213> Secuencia artificial

ES 2 870 991 T3

<220>
<223> ECD de CD80 v15

<400> 69
 Val Ile His Val Thr Lys Glu Val Lys Glu Val Ala Thr Leu Ser Cys
 1 5 10 15
 Gly His Asn Val Ser Val Glu Glu Leu Ala Gln Thr Arg Ile Tyr Trp
 20 25 30
 Gln Lys Glu Glu Lys Met Val Leu Thr Met Met Ser Gly Asp Met Asn
 35 40 45
 Ile Trp Pro Glu Tyr Lys Asn Arg Thr Ile Phe Asp Ile Thr Asn Asn
 50 55 60
 Leu Ser Thr Val Ile Gln Ala Leu Arg Pro Ser Asp Glu Gly Thr Tyr
 65 70 75 80
 Glu Cys Val Val Leu Lys Tyr Glu Lys Asp Gly Phe Lys Arg Glu His
 85 90 95
 Leu Ala Glu Val Thr Leu Ser Val Lys Ala Asp Phe Pro Thr Pro Ser
 100 105 110
 Ile Ser Asp Phe Glu Ile Pro Ser Ser Asn Ile Arg Arg Ile Ile Cys
 115 120 125
 Ser Ala Ser Gly Gly Phe Pro Glu Pro His Leu Ser Trp Leu Glu Asn
 130 135 140
 Gly Glu Glu Leu Asn Ala Ile Thr Thr Thr Val Ser Gln Asp Pro Glu
 145 150 155 160
 Thr Glu Leu Tyr Ala Val Ser Ser Lys Leu Asp Phe Asn Met Thr Thr
 165 170 175
 Asn His Ser Phe Met Cys Leu Ile Lys Tyr Gly His Leu Arg Val Asn
 180 185 190
 Gln Thr Phe Asn Trp Asn Thr Thr Lys Gln Glu His Phe Pro Asp Asn
 195 200 205

<210> 70
<211> 208
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> ECD de CD80 v16

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

20 <210> 71
<211> 208

<212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> ECD de CD80 v17

<400> 71
 Val Ile His Val Thr Lys Glu Val Lys Glu Val Ala Thr Leu Ser Cys
 1 5 10 15
 Gly His Asn Val Ser Val Glu Glu Leu Ala Gln Thr Arg Ile Tyr Trp
 20 25 30
 Gln Lys Glu Lys Glu Met Val Leu Thr Met Met Ser Gly Asp Met Asn
 35 40 45
 Ile Trp Pro Glu Tyr Lys Asn Arg Thr Ile Ser Asp Ile Thr Asn Asn
 50 55 60
 Leu Ser Ile Val Ile Gln Ala Leu Arg Pro Ser Asp Glu Gly Thr Tyr
 65 70 75 80
 Glu Cys Val Val Leu Lys Tyr Glu Lys Asp Gly Phe Lys Arg Glu His
 85 90 95
 Leu Ala Glu Val Thr Leu Ser Val Lys Ala Asp Phe Pro Thr Pro Ser
 100 105 110
 Ile Ser Asp Phe Glu Ile Pro Ser Ser Asn Ile Arg Arg Ile Ile Cys
 115 120 125
 Ser Ala Ser Gly Gly Phe Pro Glu Pro His Leu Ser Trp Leu Glu Asn
 130 135 140
 Gly Glu Glu Leu Asn Ala Ile Asn Thr Thr Val Ser Gln Asp Pro Glu
 145 150 155 160
 Thr Glu Leu Tyr Ala Val Ser Ser Lys Leu Asp Phe Asn Met Thr Thr
 165 170 175
 Asn His Ser Phe Met Cys Leu Ile Lys Tyr Gly His Leu Arg Val Asn
 180 185 190
 Gln Thr Phe Asn Trp Asn Thr Thr Lys Gln Glu His Phe Pro Asp Asn
 195 200 205

10 <210> 72
 <211> 208
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> ECD de CD80 v18

<400> 72
 Val Ile His Val Thr Lys Glu Val Lys Glu Val Ala Thr Leu Ser Cys
 1 5 10 15
 Gly His Asn Val Ser Val Glu Glu Leu Ala Gln Thr Arg Ile Tyr Trp
 20 25 30
 Gln Lys Glu Lys Lys Met Val Leu Thr Met Met Ser Gly Asp Met Asn
 35 40 45
 Ile Trp Pro Glu Tyr Lys Asn Arg Thr Ile Phe Asp Ile Thr Asn Asn
 50 55 60
 Leu Ser Ile Val Ile Leu Ala Leu Arg Pro Ser Asp Glu Gly Thr Tyr
 65 70 75 80
 Glu Cys Val Val Leu Lys Tyr Glu Lys Asp Gly Phe Lys Arg Glu His
 85 90 95
 Leu Ala Glu Val Thr Leu Pro Val Lys Ala Asp Phe Pro Thr Pro Ser
 100 105 110
 Ile Ser Asp Phe Glu Ile Pro Thr Ser Asn Ile Arg Arg Ile Ile Cys
 115 120 125
 Ser Thr Ser Gly Gly Phe Pro Glu Pro His Leu Ser Trp Leu Glu Asn
 130 135 140
 Gly Glu Glu Leu Asn Ala Ile Asn Thr Thr Val Ser Gln Asp Pro Glu
 145 150 155 160
 Thr Glu Leu Tyr Ala Val Ser Ser Lys Leu Asp Phe Asn Met Thr Thr
 165 170 175
 Asn His Ser Phe Met Cys Leu Ile Lys Tyr Gly His Leu Arg Val Asn
 180 185 190
 Gln Thr Phe Asn Trp Asn Thr Thr Lys Gln Glu His Phe Pro Asp Asn
 195 200 205

5 <210> 73
 <211> 208
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 10 <220>
 <223> ECD de CD80 v19

 10 <400> 73
 Val Ile His Val Thr Lys Glu Val Lys Glu Val Ala Thr Leu Ser Cys
 1 5 10 15
 Gly His Asn Val Ser Val Glu Glu Leu Ala Gln Thr Arg Ile Tyr Trp
 20 25 30
 Gln Lys Glu Lys Lys Met Val Leu Thr Met Met Ser Gly Asp Met Asn
 35 40 45
 Ile Trp Pro Glu Tyr Lys Asn Arg Thr Ile Phe Asp Ile Thr Asn Asn
 50 55 60
 Leu Ser Ile Val Ile Leu Ala Leu Arg Pro Ser Asp Glu Gly Thr Tyr
 65 70 75 80
 Glu Cys Val Val Leu Lys Tyr Glu Asp Ala Phe Lys Arg Glu His
 85 90 95
 Leu Ala Glu Val Thr Leu Ser Val Lys Ala Asp Phe Pro Thr Pro Ser
 100 105 110
 Ile Ser Asp Phe Glu Ile Pro Thr Ser Asn Ile Arg Arg Ile Ile Cys
 115 120 125
 Ser Ala Ser Gly Gly Phe Pro Glu Pro His Leu Ser Trp Leu Glu Asn
 130 135 140
 Gly Glu Glu Leu Asn Ala Ile Asn Thr Thr Val Ser Gln Asp Pro Glu
 145 150 155 160
 Thr Glu Leu Tyr Ala Val Ser Ser Lys Leu Asp Phe Asn Met Thr Thr
 165 170 175
 Asn His Ser Phe Met Cys Leu Ile Lys Tyr Gly His Leu Arg Val Asn
 180 185 190
 Gln Thr Phe Asn Trp Asn Thr Thr Lys Gln Glu His Phe Pro Asp Asn
 195 200 205

15 <210> 74
 <211> 208
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 20 <220>
 <223> ECD de CD80 v20

 20 <400> 74
 Val Ile His Val Thr Lys Glu Val Lys Glu Val Ala Thr Leu Ser Cys
 1 5 10 15
 Gly His Asn Val Ser Val Glu Glu Leu Ala Gln Thr Arg Ile Tyr Trp
 20 25 30
 Gln Lys Glu Lys Lys Met Val Leu Thr Met Met Ser Gly Asp Met Asn
 35 40 45
 Ile Trp Pro Glu Tyr Lys Asn Arg Thr Ile Phe Asp Ile Thr Asn Asn
 50 55 60
 Leu Ser Ile Val Ile Leu Ala Leu Arg Pro Ser Asp Glu Gly Thr Tyr

65	70	75	80
Glu Cys Val Val	Leu Lys Tyr Glu Lys Asp	Gly Phe Lys Arg	Glu His
85	90	95	
Leu Ala Glu Val Thr	Leu Ser Val Lys Ala Asp Phe Pro	Thr Pro Ser	
100	105	110	
Ile Ser Asp Phe Glu	Ile Pro Thr Ser Asn Ile Arg Arg	Ile Ile Cys	
115	120	125	
Ser Thr Ser Gly	Gly Phe Pro Glu Pro His	Leu Ser Trp Leu Glu Asn	
130	135	140	
Gly Glu Glu Leu Asn	Ala Ile Asn Thr Thr Val Ser Gln Asp Pro	Glu	
145	150	155	160
Thr Glu Leu Tyr	Ala Val Ser Ser Lys Leu Asp Phe Asn Met	Thr Thr	
165	170	175	
Asn His Ser Phe Met	Cys Leu Ile Lys Tyr Gly His	Leu Arg Val Asn	
180	185	190	
Gln Thr Phe Asn Trp	Asn Thr Thr Lys Gln Glu His	Phe Pro Asp Asn	
195	200	205	

<210> 75

<211> 208

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> ECD de CD80 v21

10

<400> 75

Val Ile His Val Thr Lys Glu Val Lys Glu Val Ala Thr	Leu Ser Cys	
1 5	10 15	
Gly His Asn Val Ser Val Glu Glu	Leu Ala Gln Thr Arg Ile Tyr Trp	
20 25	30	
Gln Lys Glu Lys Lys Met Val	Leu Thr Met Met Ser Gly Asp Met Asn	
35 40	45	
Ile Trp Pro Glu Tyr Lys Asn Arg	Thr Ile Phe Val Ile Thr Asn Asn	
50 55	60	
Leu Ser Ile Val Ile	Leu Ala Arg Pro Ser Asp Glu Gly Thr Tyr	
65 70	75 80	
Glu Cys Val Val	Leu Lys Tyr Glu Lys Asp Gly Phe Lys Arg Glu His	
85 90	95	
Leu Ala Glu Val Thr	Leu Ser Val Lys Ala Asp Phe Pro	Thr Pro Ser
100 105	110	
Ile Ser Asp Phe Glu	Ile Pro Ser Ser Asn Ile Arg Arg	Ile Ile Cys
115 120	125	
Ser Ala Ser Gly	Gly Phe Pro Glu Pro His	Leu Ser Trp Leu Glu Asn
130 135	140	
Gly Glu Glu Leu Asn	Ala Ile Asn Thr Thr Val Ser Gln Asp Pro	Glu
145 150	155	160
Thr Glu Leu Tyr	Ala Val Ser Ser Lys Leu Asp Phe Asn Met	Thr Thr
165 170	175	
Asn His Ser Phe Met	Cys Leu Ile Lys Tyr Gly His	Leu Arg Val Asn
180 185	190	
Gln Thr Phe Asn Trp	Asn Thr Thr Lys Gln Glu His	Phe Pro Asp Asn
195 200	205	

<210> 76

<211> 208

15 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> ECD de CD80 v22

20

<400> 76
 Val Ile His Val Thr Lys Glu Val Lys Glu Val Ala Thr Leu Ser Cys
 1 5 10 15
 Gly His Asn Val Ser Val Glu Glu Leu Ala Gln Thr Arg Ile Tyr Trp
 20 25 30
 Gln Lys Glu Lys Lys Met Val Leu Thr Met Met Ser Gly Asp Met Asn
 35 40 45
 Ile Trp Pro Glu Tyr Met Asn Arg Thr Ile Phe Asp Ile Thr Asn Asn
 50 55 60
 Leu Ser Ile Val Ile Leu Ala Leu Arg Pro Ser Asp Glu Gly Thr Tyr
 65 70 75 80
 Glu Cys Val Val Leu Lys Tyr Glu Lys Asp Gly Phe Lys Arg Glu His
 85 90 95
 Leu Ala Glu Val Thr Leu Ser Val Lys Ala Asp Phe Pro Thr Pro Ser
 100 105 110
 Ile Ser Asp Phe Glu Ile Pro Ser Ser Asn Ile Arg Arg Ile Ile Cys
 115 120 125
 Ser Thr Ser Gly Gly Phe Pro Glu Pro His Leu Ser Trp Leu Glu Asn
 130 135 140
 Gly Glu Glu Leu Asn Ala Ile Asn Thr Thr Val Ser Gln Asp Pro Glu
 145 150 155 160
 Thr Glu Leu Tyr Ala Val Ser Ser Lys Leu Asp Phe Asn Met Thr Thr
 165 170 175
 Asn His Ser Phe Met Cys Leu Ile Lys Tyr Gly His Leu Arg Val Asn
 180 185 190
 Gln Thr Phe Asn Trp Asn Thr Thr Lys Gln Glu His Phe Pro Asp Asn
 195 200 205

<210> 77

<211> 208

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> ECD de CD80 v23

10

<400> 77
Val. T1e

```

Val Ile His Val Thr Lys Glu Val Lys Glu Val Ala Thr Leu Ser Cys
  1           5           10          15
Gly His Asn Val Ser Val Glu Glu Leu Ala Gln Thr Arg Ile Tyr Trp
  20          25          30
Gln Lys Glu Lys Lys Thr Val Leu Thr Met Met Ser Gly Asp Met Asn
  35          40          45
Ile Trp Pro Glu Tyr Lys Asn Arg Thr Ile Phe Asp Ile Thr Asn Asn
  50          55          60
Leu Ser Ile Val Ile Gln Ala Leu Arg Pro Ser Asp Gly Gly Thr Tyr
  65          70          75          80
Glu Cys Val Val Leu Lys Tyr Glu Lys Asp Gly Phe Lys Arg Glu His
  85          90          95
Leu Ala Glu Val Thr Leu Ser Val Lys Ala Asp Phe Pro Thr Pro Ser
  100         105         110
Ile Ser Asp Phe Glu Ile Pro Ser Ser Asn Ile Arg Arg Ile Ile Cys
  115         120         125
Ser Ala Ser Gly Gly Phe Pro Glu Pro His Leu Ser Trp Leu Glu Asn
  130         135         140
Gly Glu Glu Leu Asn Ala Ile Thr Thr Thr Val Ser Gln Asp Pro Glu
  145         150         155         160
Thr Glu Leu Tyr Ala Val Ser Ser Lys Leu Asp Phe Asn Met Thr Thr
  165         170         175
Asn His Ser Phe Met Cys Leu Ile Lys Tyr Gly His Leu Arg Val Asn
  180         185         190
Gln Thr Phe Asn Trp Asn Thr Thr Lys Gln Glu His Phe Pro Asp Asn
  195         200         205

```

15

<210> 78

<211> 208

<212> PRT

<220>

<223> ECD de CD80 v24

<400> 78

Val	Ile	His	Val	Thr	Lys	Glu	Val	Lys	Glu	Val	Ala	Thr	Leu	Ser	Cys
1															15
Gly	His	Asn	Val	Ser	Val	Glu	Glu	Leu	Ala	Gln	Thr	His	Ile	Tyr	Trp
															30
Gln	Lys	Glu	Lys	Lys	Met	Val	Leu	Thr	Met	Met	Ser	Gly	Asp	Met	Asn
															45
Ile	Trp	Pro	Gly	Tyr	Lys	Asn	Arg	Thr	Ile	Phe	Asp	Ile	Thr	Asn	Asn
															50
															55
Leu	Ser	Ile	Val	Ile	Arg	Ala	Leu	Arg	Pro	Ser	Asp	Glu	Gly	Thr	Tyr
															60
65															75
Glu	Cys	Val	Val	Leu	Lys	Tyr	Gly	Lys	Asp	Gly	Phe	Lys	Arg	Glu	His
															85
															90
															95
Leu	Ala	Glu	Val	Thr	Leu	Ser	Val	Lys	Ala	Asp	Phe	Pro	Thr	Pro	Ser
															100
															105
Ile	Ser	Asp	Phe	Glu	Ile	Pro	Thr	Ser	Asn	Ile	Arg	Arg	Ile	Ile	Cys
															115
															120
Ser	Ala	Ser	Gly	Gly	Phe	Pro	Glu	Pro	His	Leu	Ser	Trp	Leu	Glu	Asn
															130
															135
Gly	Glu	Glu	Leu	Asn	Ala	Ile	Asn	Thr	Thr	Val	Ser	Gln	Asp	Pro	Glu
															145
															150
															155
Thr	Glu	Leu	Tyr	Ala	Val	Ser	Ser	Lys	Leu	Asp	Phe	Asn	Met	Thr	Thr
															165
															170
Asn	His	Ser	Phe	Met	Cys	Leu	Ile	Lys	Tyr	Gly	His	Leu	Arg	Val	Asn
															180
															185
Gln	Thr	Phe	Asn	Trp	Asn	Thr	Thr	Lys	Gln	Glu	His	Phe	Pro	Asp	Asn
															195
															200
															205

5

<210> 79

<211> 208

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> ECD de CD80 v25

15

<400> 79

Val	Ile	His	Val	Thr	Lys	Glu	Val	Lys	Glu	Val	Ala	Thr	Leu	Ser	Cys
1															15
Gly	His	Asn	Val	Ser	Val	Glu	Glu	Leu	Ala	Gln	Thr	Arg	Ile	His	Trp
															30
Gln	Lys	Glu	Lys	Lys	Met	Val	Leu	Gly	Met	Met	Ser	Gly	Asp	Met	Asn
															45
Ile	Trp	Pro	Glu	Tyr	Lys	Asn	Arg	Thr	Ile	Phe	Asp	Ile	Thr	Asn	Asn
															50
															55
Leu	Ser	Ile	Val	Ile	Gln	Ala	Leu	Arg	Pro	Ser	Asp	Glu	Gly	Thr	Tyr
															60
65															75
Glu	Cys	Val	Val	Leu	Lys	Tyr	Glu	Lys	Asp	Gly	Phe	Lys	Arg	Glu	His
															85
															90
Leu	Ala	Glu	Val	Thr	Leu	Ser	Val	Lys	Ala	Asp	Phe	Pro	Thr	Pro	Ser
															100
															105
Ile	Ser	Asp	Phe	Glu	Ile	Pro	Ser	Ser	Asn	Ile	Arg	Arg	Ile	Ile	Cys
															115
															120
Ser	Ala	Ser	Gly	Gly	Phe	Pro	Glu	Pro	His	Leu	Ser	Trp	Leu	Glu	Asn
															130
															135
Gly	Glu	Glu	Leu	Asn	Ala	Ile	Asn	Thr	Thr	Val	Ser	Gln	Asp	Pro	Glu
															145
															150
															155
Thr	Glu	Leu	Tyr	Ala	Val	Ser	Ser	Lys	Leu	Asp	Phe	Asn	Met	Thr	Thr
															165
															170
Asn	His	Ser	Phe	Met	Cys	Leu	Ile	Lys	Tyr	Gly	His	Leu	Arg	Val	Asn
															180
															185
Gln	Thr	Phe	Asn	Trp	Asn	Thr	Thr	Lys	Gln	Glu	His	Phe	Pro	Asp	Asn
															195
															200
															205

20

<210> 80

<211> 208

<212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> ECD de CD80 v26

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

10 <210> 81
 <211> 208
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> ECD de CD80 v27

<400> 81
 Val Ile His Val Thr Lys Glu Val Lys Glu Val Ala Thr Leu Ser Cys
 1 5 10 15
 20
 Gly His Asn Val Ser Val Glu Glu Leu Ala Gln Thr Arg Ile Tyr Trp
 20 25 30
 Gln Lys Glu Lys Lys Met Val Leu Thr Met Met Ser Gly Asp Met Asn
 35 40 45
 Ile Trp Pro Glu Tyr Lys Asn Arg Thr Ile Phe Asp Ile Thr Asn Asn
 50 55 60
 Leu His Ile Val Ile Leu Ala Leu Arg Pro Ser Asp Glu Gly Thr Tyr
 65 70 75 80
 Glu Cys Val Val Leu Lys Tyr Glu Lys Gly Ala Phe Lys Arg Glu His
 85 90 95
 Leu Ala Glu Val Thr Leu Ser Val Lys Ala Asp Phe Pro Ala Pro Ser
 100 105 110
 Ile Ser Asp Leu Glu Ile Pro Thr Ser Asn Ile Arg Arg Ile Ile Cys
 115 120 125
 Ser Thr Ser Gly Gly Phe Pro Glu Pro His Leu Ser Trp Leu Glu Asn
 130 135 140
 Gly Glu Glu Leu Asn Ala Ile Asn Thr Thr Val Ser Gln Asp Pro Glu
 145 150 155 160
 Thr Glu Leu Tyr Ala Val Ser Ser Lys Leu Asp Phe Asn Met Thr Thr
 165 170 175
 Asn His Ser Phe Met Cys Leu Ile Lys Tyr Gly His Leu Arg Val Asn
 180 185 190
 Gln Thr Phe Asn Trp Asn Thr Thr Lys Gln Glu His Phe Pro Asp Asn
 195 200 205

5 <210> 82
 <211> 208
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 10 <220>
 <223> ECD de CD80 v28

 10 <400> 82
 Val Ile His Val Thr Lys Glu Val Lys Glu Val Ala Thr Leu Ser Cys
 1 5 10 15
 Gly His Asn Val Ser Val Glu Glu Leu Ala Gln Thr His Ile Tyr Trp
 20 25 30
 Gln Lys Glu Lys Lys Met Val Leu Thr Met Met Ser Gly Asp Met Asn
 35 40 45
 Ile Trp Pro Gly Tyr Lys Asn Arg Thr Ile Phe Asp Ile Thr Asn Asn
 50 55 60
 Leu Ser Ile Val Ile Leu Ala Leu Arg Pro Ser Asp Glu Gly Thr Tyr
 65 70 75 80
 Glu Cys Val Val Leu Lys Tyr Glu Lys Asp Ala Phe Lys Arg Glu His
 85 90 95
 Leu Ala Glu Val Thr Leu Ser Val Lys Ala Asp Phe Pro Thr Pro Ser
 100 105 110
 Ile Ser Asp Phe Glu Ile Pro Ser Ser Asn Ile Arg Arg Ile Ile Cys
 115 120 125
 Ser Ala Ser Gly Gly Phe Pro Glu Pro His Leu Ser Trp Leu Glu Asn
 130 135 140
 Gly Glu Glu Leu Asn Ala Ile Asn Thr Thr Val Ser Gln Asp Pro Glu
 145 150 155 160
 Thr Glu Leu Tyr Ala Val Ser Ser Lys Leu Asp Phe Asn Met Thr Thr
 165 170 175
 Asn His Ser Phe Met Cys Leu Ile Lys Tyr Gly His Leu Arg Val Asn
 180 185 190
 Gln Thr Phe Asn Trp Asn Thr Thr Lys Gln Glu His Phe Pro Asp Asn
 195 200 205

15 <210> 83
 <211> 208
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 20 <220>
 <223> ECD de CD80 v29

 20 <400> 83

Val Ile His Val Thr Lys Glu Val Lys Glu Val Ala Thr Leu Ser Cys
 1 5 10 15
 Gly His Asn Val Ser Val Glu Glu Leu Ala Gln Thr Arg Ile Tyr Trp
 20 25 30
 Gln Lys Glu Lys Lys Met Val Leu Thr Met Met Ser Gly Asp Met Asn
 35 40 45
 Ile Trp Pro Glu Tyr Lys Asn Arg Thr Ile Phe Asp Ile Thr Asn Asn
 50 55 60
 Leu Ser Ile Val Ile Leu Ala Leu Arg Pro Ser Asp Glu Gly Thr Tyr
 65 70 75 80
 Glu Cys Val Val Leu Lys Tyr Glu Lys Asp Gly Phe Lys Arg Glu His
 85 90 95
 Leu Ala Glu Val Thr Ser Ser Val Lys Ala Asp Phe Pro Thr Pro Ser
 100 105 110
 Ile Ser Asp Phe Glu Ile Pro Thr Ser Asn Ile Arg Arg Ile Ile Cys
 115 120 125
 Ser Thr Ser Gly Gly Phe Pro Glu Pro His Leu Ser Trp Leu Glu Asn
 130 135 140
 Gly Glu Glu Leu Asn Ala Ile Asn Thr Thr Val Ser Gln Asp Pro Glu
 145 150 155 160
 Thr Glu Leu Tyr Ala Val Ser Ser Lys Leu Asp Phe Asn Met Thr Thr
 165 170 175
 Asn His Ser Phe Met Cys Leu Ile Lys Tyr Gly His Leu Arg Val Asn
 180 185 190
 Gln Thr Phe Asn Trp Asn Thr Thr Lys Gln Glu His Phe Pro Asp Asn
 195 200 205

<210> 84

<211> 208

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> ECD de CD80 v30

10

<400> 84

Val Ile His Val Thr Lys Glu Val Lys Glu Val Ala Thr Leu Ser Cys
 1 5 10 15
 Gly His Asn Val Ser Val Glu Glu Leu Ala Gln Thr Arg Ile Tyr Trp
 20 25 30
 Gln Lys Glu Lys Lys Met Val Leu Thr Met Met Ser Gly Asp Met Asn
 35 40 45
 Ile Trp Pro Glu Tyr Lys Asn Arg Thr Ile Phe Asp Ile Thr Asn Asn
 50 55 60
 Leu Ser Thr Val Ile Gln Ala Leu Arg Pro Ser Asp Glu Gly Thr Tyr
 65 70 75 80
 Glu Cys Val Val Leu Lys Tyr Glu Lys Asp Gly Phe Lys Arg Glu His
 85 90 95
 Leu Ala Glu Val Thr Leu Ser Val Lys Ala Asp Phe Pro Thr Pro Ser
 100 105 110
 Ile Ser Asp Phe Glu Ile Pro Ser Ser Asn Ile Arg Arg Ile Ile Cys
 115 120 125
 Ser Thr Ser Gly Gly Phe Pro Glu Pro His Leu Ser Trp Leu Glu Asn
 130 135 140
 Gly Glu Glu Leu Asn Ala Ile Asn Thr Thr Val Ser Gln Asp Pro Glu
 145 150 155 160
 Thr Glu Leu Tyr Ala Val Ser Ser Lys Leu Asp Phe Asn Met Thr Thr
 165 170 175
 Asn His Ser Phe Met Cys Leu Ile Lys Tyr Gly His Leu Arg Val Asn
 180 185 190
 Gln Thr Phe Asn Trp Asn Thr Thr Lys Gln Glu His Phe Pro Asp Asn
 195 200 205

15

<210> 85

<211> 208

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20

<220>

<223> ECD de CD80 v31

<400> 85

Val	Ile	His	Val	Thr	Lys	Glu	Val	Lys	Glu	Val	Ala	Thr	Leu	Ser	Cys
1															
														15	
Gly	His	Asn	Val	Ser	Val	Glu	Glu	Leu	Ala	Gln	Thr	Arg	Ile	Tyr	Trp
														30	
Gln	Lys	Glu	Lys	Lys	Met	Val	Leu	Thr	Met	Met	Ser	Gly	Asp	Met	Asn
														45	
Ile	Trp	Pro	Glu	Tyr	Lys	Asn	Arg	Thr	Ile	Phe	Asp	Ile	Thr	Asn	Asn
														60	
Leu	Ser	Ile	Val	Ile	Gln	Ala	Leu	Arg	Pro	Ser	Asp	Glu	Gly	Thr	Tyr
														80	
65															
Glu	Cys	Val	Val	Leu	Lys	Tyr	Glu	Lys	Asp	Gly	Phe	Lys	Arg	Glu	His
														95	
85															
Leu	Ala	Glu	Val	Thr	Leu	Ser	Val	Lys	Ala	Asp	Phe	Pro	Ala	Pro	Ser
														110	
100															
Ile	Ser	Asp	Phe	Glu	Ile	Pro	Ser	Ser	Asn	Ile	Arg	Arg	Ile	Ile	Cys
														125	
115															
Ser	Ala	Ser	Gly	Gly	Phe	Pro	Glu	Pro	His	Leu	Ser	Trp	Leu	Glu	Asn
														130	
130														140	
Gly	Glu	Glu	Leu	Asn	Ala	Ile	Asn	Thr	Thr	Val	Ser	Gln	Asp	Pro	Glu
														145	
145														155	
Thr	Glu	Leu	Tyr	Ala	Val	Ser	Ser	Lys	Leu	Asp	Phe	Asn	Met	Thr	Thr
														160	
165															
Asn	His	Ser	Phe	Met	Cys	Leu	Ile	Lys	Tyr	Gly	His	Leu	Arg	Val	Asn
														180	
180														185	
Gln	Thr	Phe	Asn	Trp	Asn	Thr	Thr	Lys	Gln	Glu	His	Phe	Pro	Asp	Asn
														195	
195														200	
														205	

5

<210> 86

<211> 208

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> ECD de CD80 v32

<400> 86

Val	Ile	His	Val	Thr	Lys	Glu	Val	Lys	Glu	Val	Ala	Thr	Leu	Ser	Cys
1															
														15	
Gly	His	Asn	Val	Ser	Val	Glu	Glu	Leu	Ala	Gln	Thr	Arg	Ile	Tyr	Trp
														20	30
Gln	Lys	Glu	Lys	Lys	Val	Val	Leu	Asp	Met	Ile	Ser	Gly	Asp	Met	Asn
														35	45
Ile	Gly	Pro	Glu	Tyr	Lys	Asn	Arg	Thr	Ile	Phe	Asp	Ile	Thr	Asn	Asn
														50	60
Leu	Ser	Ile	Val	Ile	Leu	Ala	Leu	Arg	Pro	Ser	Gly	Glu	Gly	Thr	Tyr
														65	80
Glu	Cys	Ala	Val	Leu	Lys	Tyr	Glu	Glu	Asp	Ala	Phe	Lys	Arg	Glu	His
														85	95
Leu	Ala	Glu	Val	Thr	Leu	Ser	Val	Lys	Ala	Asp	Phe	Pro	Thr	Pro	Ser
														100	110
Ile	Ser	Asp	Phe	Glu	Ile	Pro	Ser	Ser	Asn	Ile	Arg	Arg	Ile	Ile	Cys
														115	125
Ser	Ala	Ser	Gly	Gly	Phe	Pro	Glu	Pro	His	Leu	Ser	Trp	Leu	Glu	Asn
														130	140
Gly	Glu	Glu	Leu	Asn	Ala	Ile	Asn	Thr	Thr	Val	Ser	Gln	Asp	Pro	Glu
														145	155
145														160	
Thr	Glu	Leu	Tyr	Ala	Val	Ser	Ser	Lys	Leu	Asp	Phe	Asn	Met	Thr	Thr
														165	175
Asn	His	Ser	Phe	Met	Cys	Leu	Ile	Lys	Tyr	Gly	His	Leu	Arg	Val	Asn
														180	190
Gln	Thr	Phe	Asn	Trp	Asn	Thr	Thr	Lys	Gln	Glu	His	Phe	Pro	Asp	Asn
														195	
195														200	205

20

<210> 87

<211> 208

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> ECD de CD80 v33

5

<400> 87

Val Ile His Val Thr Lys Glu Val Lys Glu Val Ala Thr Leu Ser Cys
 1 5 10 15
 Gly His Asn Val Ser Ala Glu Glu Leu Ala Gln Thr Arg Ile Tyr Trp
 20 25 30
 Gln Lys Glu Lys Lys Met Val Leu Thr Met Met Ser Gly Asp Met Asn
 35 40 45
 Ile Trp Pro Glu Tyr Lys Asn Arg Thr Ile Phe Asp Ile Thr Asn Asn
 50 55 60
 Leu Ser Ile Val Ile Gln Ala Leu Arg Pro Ser Asp Glu Gly Thr Tyr
 65 70 75 80
 Glu Cys Val Val Leu Lys Tyr Glu Lys Asp Ala Phe Lys Arg Glu His
 85 90 95
 Leu Ala Glu Val Thr Leu Ser Val Lys Ala Asp Phe Pro Thr Pro Ser
 100 105 110
 Ile Ser Asp Phe Glu Ile Pro Thr Pro Asn Ile Arg Arg Ile Ile Cys
 115 120 125
 Ser Thr Ser Gly Gly Phe Pro Glu Pro His Leu Ser Trp Leu Glu Asn
 130 135 140
 Gly Glu Glu Leu Asn Ala Ile Asn Thr Thr Val Ser Gln Asp Pro Glu
 145 150 155 160
 Thr Glu Leu Tyr Ala Val Ser Ser Lys Leu Asp Phe Asn Met Thr Thr
 165 170 175
 Asn His Ser Phe Met Cys Leu Ile Lys Tyr Gly His Leu Arg Val Asn
 180 185 190
 Gln Thr Phe Asn Trp Asn Thr Thr Lys Gln Glu His Phe Pro Asp Asn
 195 200 205

<210> 88

10 <211> 208

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> ECD de CD80 v34

<400> 88

Val Ile His Val Thr Lys Glu Val Lys Glu Val Val Thr Leu Phe Cys
 1 5 10 15
 Gly His Asn Val Ser Val Glu Glu Leu Ala Gln Thr Arg Ile His Trp
 20 25 30
 Gln Lys Glu Lys Lys Met Val Leu Gly Met Met Ser Gly Asp Met Asn
 35 40 45
 Ile Trp Pro Glu Tyr Lys Asn Arg Thr Ile Phe Asp Ile Thr Asn Asn
 50 55 60
 Leu Ser Ile Val Ile Leu Ala Leu Arg Pro Ser Asp Glu Gly Thr Tyr
 65 70 75 80
 Glu Cys Val Val Leu Lys Tyr Glu Lys Asp Ala Phe Lys Arg Glu His
 85 90 95
 Leu Ala Glu Val Thr Leu Ser Val Lys Ala Asp Phe Pro Thr Pro Ser
 100 105 110
 Ile Ser Asp Phe Glu Ile Pro Thr Ser Asn Ile Arg Arg Ile Ile Cys
 115 120 125
 Ser Ala Ser Gly Gly Phe Pro Glu Leu His Leu Ser Trp Leu Glu Asn
 130 135 140
 Gly Glu Glu Leu Asn Ala Ile Thr Thr Val Ser Gln Asp Pro Glu
 145 150 155 160
 Thr Glu Leu Tyr Ala Val Ser Ser Lys Leu Asp Phe Asn Met Thr Thr
 165 170 175
 Asn His Ser Phe Met Cys Leu Ile Lys Tyr Gly His Leu Arg Val Asn
 180 185 190
 Gln Thr Phe Asn Trp Asn Thr Thr Lys Gln Glu His Phe Pro Asp Asn
 195 200 205

20 <210> 89

<211> 208
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> ECD de CD80 v35

<400> 89
 Val Ile His Val Thr Lys Glu Val Lys Glu Val Ala Thr Leu Ser Cys
 1 5 10 15
 Gly His Asn Val Ser Val Glu Glu Leu Ala Gln Thr Arg Ile Tyr Trp
 20 25 30
 Gln Lys Glu Lys Lys Met Val Leu Thr Met Met Ser Gly Asp Met Asn
 35 40 45
 Ile Trp Pro Glu Tyr Lys Asn Arg Thr Ile Phe Asp Ile Thr Asn Asn
 50 55 60
 Leu Ser Phe Val Ile Arg Ala Leu Arg Pro Ser Asp Glu Gly Thr Tyr
 65 70 75 80
 Glu Cys Val Val Leu Lys Tyr Gly Lys Asp Gly Phe Lys Arg Glu His
 85 90 95
 Leu Ala Glu Val Thr Leu Ser Val Lys Ala Asp Phe Pro Thr Pro Ser
 100 105 110
 Ile Ser Asp Phe Glu Ile Pro Ser Ser Asn Ile Arg Arg Ile Ile Cys
 115 120 125
 Ser Ala Ser Gly Gly Phe Pro Glu Pro His Leu Ser Trp Leu Glu Asn
 130 135 140
 Gly Glu Glu Leu Asn Ala Ile Asn Thr Thr Val Ser Gln Asp Pro Glu
 145 150 155 160
 Thr Glu Leu Tyr Ala Val Ser Ser Lys Leu Asp Phe Asn Met Thr Thr
 10
 165 170 175
 Asn His Ser Phe Met Cys Leu Ile Lys Tyr Gly His Leu Arg Val Asn
 180 185 190
 Gln Thr Phe Asn Trp Asn Thr Thr Lys Gln Glu His Phe Pro Asp Asn
 195 200 205

<210> 90
 <211> 208
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> ECD de CD80 v36

20 <400> 90

Val Ile His Val Thr Lys Glu Val Lys Glu Val Ala Thr Leu Ser Cys
 1 5 10 15
 Gly His Asn Val Ser Val Glu Gly Pro Ala Gln Thr Arg Ile Tyr Trp
 20 25 30
 Gln Lys Glu Lys Lys Met Val Leu Thr Met Met Ser Gly Asp Met Asn
 35 40 45
 Ile Trp Pro Glu Tyr Lys Asn Arg Thr Ile Phe Asp Ile Thr Asn Asn
 50 55 60
 Leu Ser Ile Val Ile Gln Ala Leu Arg Pro Ser Asp Glu Gly Thr Tyr
 65 70 75 80
 Glu Cys Val Val Leu Lys Tyr Glu Lys Asp Ala Phe Lys Arg Glu His
 85 90 95
 Leu Ala Glu Val Thr Leu Ser Val Lys Ala Asp Phe Pro Thr Pro Ser
 100 105 110
 Ile Ser Asp Phe Glu Ile Pro Ser Ser Asn Ile Arg Arg Ile Ile Cys
 115 120 125
 Ser Thr Ser Gly Gly Phe Pro Glu Pro His Leu Ser Trp Leu Glu Asn
 130 135 140
 Gly Glu Glu Leu Asn Ala Ile Asn Thr Thr Val Ser Gln Asp Pro Glu
 145 150 155 160
 Thr Glu Leu Tyr Ala Val Ser Ser Lys Leu Asp Phe Asn Met Thr Thr
 165 170 175
 Asn His Ser Phe Met Cys Leu Ile Lys Tyr Gly His Leu Arg Val Asn
 180 185 190
 Gln Thr Phe Asn Trp Asn Thr Thr Lys Gln Glu His Phe Pro Asp Asn
 195 200 205

<210> 91

<211> 208

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> ECD de CD80 v37

10

<400> 91

Val Ile His Val Thr Lys Glu Val Lys Glu Val Ala Thr Leu Ser Cys
 1 5 10 15
 Gly His Asn Val Ser Val Glu Glu Leu Ala Gln Thr Arg Ile Tyr Trp
 20 25 30
 Gln Lys Glu Lys Lys Met Val Leu Thr Met Met Ser Gly Asp Met Asn
 35 40 45
 Ile Trp Pro Glu Tyr Lys Asn Arg Thr Ile Phe Asp Ile Thr Asn Asn
 50 55 60
 Leu Ser Ile Val Ile Leu Ala Leu Arg Pro Ser Asp Glu Gly Thr Tyr
 65 70 75 80
 Glu Cys Val Val Leu Lys Tyr Glu Lys Asp Gly Leu Lys Arg Glu His
 85 90 95
 Leu Ala Glu Val Thr Leu Ser Val Lys Ala Asp Leu Pro Thr Pro Ser
 100 105 110
 Ile Ser Asp Phe Glu Ile Pro Ser Ser Asn Ile Arg Arg Ile Ile Cys
 115 120 125
 Ser Thr Ser Gly Gly Phe Pro Glu Pro His Leu Ser Trp Leu Glu Asn
 130 135 140
 Gly Glu Glu Leu Asn Ala Ile Asn Thr Thr Val Ser Gln Asp Pro Glu
 145 150 155 160
 Thr Glu Leu Tyr Ala Val Ser Ser Lys Leu Asp Phe Asn Met Thr Thr
 165 170 175
 Asn His Ser Phe Met Cys Leu Ile Lys Tyr Gly His Leu Arg Val Asn
 180 185 190
 Gln Thr Phe Asn Trp Asn Thr Thr Lys Gln Glu His Phe Pro Asp Asn
 195 200 205

15

<210> 92

<211> 208

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20

<220>

<223> ECD de CD80 v38

<400> 92

Val	Ile	His	Val	Thr	Lys	Glu	Val	Lys	Glu	Val	Ala	Thr	Leu	Ser	Cys
1															
														15	
Gly	His	Asn	Val	Ser	Val	Glu	Glu	Leu	Ala	Gln	Thr	Asp	Ile	Leu	Trp
														30	
His	Lys	Glu	Gly	Lys	Ile	Val	Leu	Ala	Met	Arg	Ser	Gly	Asp	Thr	Asn
														45	
Ile	Trp	Pro	Glu	Tyr	Lys	Asn	Arg	Thr	Ile	Phe	Asp	Ile	Thr	Asn	Asn
														60	
Leu	Ser	Ile	Val	Ile	Leu	Ala	Leu	Arg	Pro	Ser	Asp	Glu	Gly	Thr	Tyr
														80	
65															
Val	Cys	Val	Val	Arg	Lys	Tyr	Glu	Asn	Asp	Thr	Pro	Val	Leu	Glu	His
														95	
85															
Leu	Ala	Glu	Val	Thr	Leu	Ser	Val	Lys	Ala	Asp	Phe	Pro	Thr	Pro	Ser
														110	
100															
Ile	Ser	Asp	Phe	Glu	Thr	Pro	Thr	Ser	Asn	Ile	Arg	Arg	Ile	Ile	Cys
														125	
115															
Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Phe	Pro	Glu	Pro	His	Leu	Ser	Trp	Leu	Glu	Asn
														130	
130															
Gly	Glu	Glu	Leu	Ser	Ala	Ile	Asn	Thr	Thr	Val	Ser	Gln	Asp	Pro	Glu
														145	
145															
Thr	Glu	Leu	Tyr	Ala	Val	Ser	Ser	Lys	Leu	Asp	Phe	Asn	Met	Thr	Thr
														160	
165															
Asn	His	Ser	Phe	Met	Cys	Leu	Ile	Lys	Tyr	Gly	His	Leu	Arg	Val	Asn
														180	
180															
Gln	Thr	Phe	Asn	Trp	Asn	Thr	Thr	Lys	Gln	Glu	His	Phe	Pro	Asp	Asn
														195	
195															

5

<210> 93

<211> 208

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> ECD de CD80 v39

<400> 93

Val	Ile	His	Val	Thr	Lys	Glu	Val	Lys	Glu	Val	Ala	Thr	Leu	Ser	Cys
1															
														15	
Gly	His	Asn	Val	Ser	Val	Glu	Glu	Leu	Ala	Gln	Thr	Asp	Ile	Leu	Trp
														20	
His	Lys	Glu	Gly	Lys	Ile	Val	Leu	Ala	Met	Arg	Ser	Gly	Asp	Thr	Asn
														35	
Ile	Trp	Pro	Glu	Tyr	Lys	Asn	Arg	Thr	Ile	Phe	Asp	Ile	Thr	Asn	Asn
														50	
Leu	Ser	Ile	Val	Ile	Leu	Ala	Leu	Arg	Pro	Ser	Asp	Glu	Gly	Thr	Tyr
														65	
65															
Val	Cys	Val	Val	Arg	Lys	Tyr	Glu	Asn	Asp	Thr	Pro	Val	Leu	Glu	His
														85	
85															
Leu	Ala	Glu	Val	Thr	Leu	Ser	Val	Lys	Ala	Asp	Phe	Pro	Thr	Pro	Ser
														100	
100															
Ile	Ser	Asp	Phe	Glu	Ile	Pro	Thr	Ser	Asn	Ile	Arg	Arg	Ile	Ile	Cys
														115	
115															
Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Phe	Pro	Glu	Pro	His	Leu	Ser	Trp	Leu	Glu	Ser
														130	
130															
Gly	Glu	Glu	Leu	Ser	Ala	Ile	Asn	Thr	Thr	Val	Ser	Gln	Asp	Pro	Glu
														145	
145															
Thr	Glu	Leu	Tyr	Ala	Val	Ser	Ser	Lys	Leu	Asp	Phe	Asn	Met	Thr	Thr
														165	
165															
Asn	His	Ser	Phe	Met	Cys	Leu	Ile	Lys	Tyr	Gly	His	Leu	Arg	Val	Asn
														180	
180															
Gln	Thr	Phe	Asn	Trp	Asn	Thr	Thr	Lys	Gln	Glu	His	Phe	Pro	Asp	Asn
														195	
195															

15

<210> 94

<211> 208

<212> PRT

20

<213> Secuencia artificial

<220>
<223> ECD de CD80 v40

5 <400> 94
 Val Ile His Val Thr Lys Glu Val Lys Glu Val Ala Thr Leu Ser Cys
 1 5 10 15
 Gly His Asn Val Ser Val Glu Glu Leu Ala Gln Thr Asp Ile Leu Trp
 20 25 30
 His Lys Glu Gly Lys Ile Val Leu Ala Thr Arg Ser Gly Asp Thr Asn
 35 40 45
 Ile Trp Pro Glu Tyr Lys Asn Arg Thr Ile Phe Asp Ile Thr Asn Asn
 50 55 60
 Leu Ser Ile Val Ile Leu Ala Leu Arg Pro Ser Asp Glu Gly Thr Tyr
 65 70 75 80
 Val Cys Val Val Arg Lys Tyr Glu Asn Asp Thr Pro Val Leu Glu His
 85 90 95
 Leu Ala Glu Val Thr Leu Ser Val Lys Ala Asp Phe Pro Thr Pro Ser
 100 105 110
 Ile Ser Asp Phe Glu Ile Pro Thr Ser Asn Ile Arg Arg Ile Ile Cys
 115 120 125
 Ser Thr Ser Gly Gly Phe Pro Glu Pro His Leu Ser Trp Leu Glu Asn
 130 135 140
 Gly Glu Glu Ser Ser Ala Ile Asn Thr Thr Val Ser Gln Asp Pro Glu
 145 150 155 160
 Thr Glu Leu Tyr Ala Val Ser Ser Lys Leu Asp Phe Asn Met Thr Thr
 165 170 175
 Asn His Ser Phe Met Cys Leu Ile Lys Tyr Gly His Leu Arg Val Asn
 180 185 190
 Gln Thr Phe Asn Trp Asn Thr Thr Lys Gln Glu His Phe Pro Asp Asn

195 200 205

10 <210> 95
 <211> 208
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> ECD de CD80 v41

<400> 95
 Val Ile His Val Thr Lys Glu Val Lys Glu Val Ala Thr Leu Ser Cys
 1 5 10 15
 Gly His Asn Val Ser Val Glu Gly Leu Ala Gln Thr Asp Ile Leu Trp
 20 25 30
 His Lys Glu Gly Lys Ile Val Leu Ala Met Arg Ser Gly Asp Thr Asn
 35 40 45
 Ile Trp Pro Glu Tyr Lys Asn Arg Thr Ile Leu Asp Ile Thr Asn Asn
 50 55 60
 Leu Ser Ile Val Ile Leu Ala Leu Arg Pro Ser Asp Glu Gly Thr Tyr
 65 70 75 80
 Val Cys Val Val Arg Lys Tyr Glu Asn Asp Thr Pro Val Leu Glu Arg
 85 90 95
 Leu Ala Glu Val Thr Leu Ser Val Lys Ala Asp Phe Pro Thr Pro Ser
 100 105 110
 Ile Ser Asp Phe Glu Ile Pro Thr Ser Asn Ile Arg Arg Ile Ile Cys
 115 120 125
 Ser Thr Ser Gly Gly Phe Pro Glu Pro His Leu Ser Trp Leu Glu Asn
 130 135 140
 Gly Glu Glu Leu Ser Ala Ile Asn Thr Thr Val Ser Gln Asp Pro Glu
 145 150 155 160
 Thr Glu Leu Tyr Ala Val Ser Ser Lys Leu Asp Phe Asn Met Thr Thr
 165 170 175
 Asn His Ser Phe Met Ser Leu Ile Lys Tyr Gly His Leu Arg Val Asn
 180 185 190
 Gln Thr Phe Asn Trp Asn Thr Thr Lys Gln Glu His Phe Pro Asp Asn

20 <210> 96
 <211> 208

<212> PRT
<213> Secuencia artificial

5 <220>
5 <223> ECD de CD80 v42

```

<400> 96
Val Ile His Val Thr Lys Glu Val Lys Glu Val Ala Thr Leu Ser Cys
      1           5           10          15
Gly His Asn Val Ser Val Glu Glu Leu Ala Gln Thr Asp Ile Leu Trp
      20          25          30
His Lys Glu Gly Lys Ile Val Leu Ala Met Arg Ser Gly Asp Thr Asn
      35          40          45
Ile Trp Pro Glu Tyr Lys Asn Arg Thr Ile Phe Asp Ile Thr Asn Asn
      50          55          60
Leu Ser Ile Val Ile Leu Ala Leu Arg Pro Ser Asp Glu Gly Thr Tyr
      65          70          75          80
Val Cys Val Val Arg Lys Tyr Glu Asn Asp Thr Pro Val Leu Glu His
      85          90          95
Leu Ala Glu Val Thr Leu Ser Val Lys Ala Asp Phe Pro Thr Pro Ser
      100         105         110
Ile Ser Asp Phe Glu Ile Pro Thr Ser Asn Ile Arg Arg Ile Ile Cys
      115         120         125
Ser Thr Ser Gly Gly Phe Pro Glu Pro His Leu Ser Trp Leu Glu Asn
      130         135         140
Gly Glu Glu Leu Ser Ala Ile Asn Thr Thr Val Ser Gln Asp Pro Glu
      145         150         155          160
Thr Glu Leu Tyr Ala Val Ser Ser Lys Leu Asp Phe Asn Met Thr Thr
      165         170         175
Asn His Ser Phe Met Cys Leu Ile Lys Tyr Gly His Leu Arg Val Asn
      180         185         190
Gln Thr Phe Asn Trp Asn Thr Thr Lys Gln Glu His Phe Pro Asp Asn
      195         200         205

```

10 195 200 205

<210> 97
<211> 208
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> ECD de CD80 v43

20 <400> 97
 Val Ile His Val Thr Lys Glu Val Lys Glu Val Ala Thr Leu Ser Cys
 1 5 10 15
 Gly His Asn Val Ser Val Glu Glu Leu Ala Gln Thr Val Ile Tyr Trp
 20 25 30
 Gln Lys Glu Lys Lys Met Val Leu Thr Met Gln Ser Gly Asp Met Asn
 35 40 45
 Ile Trp Pro Glu Tyr Lys Asn Arg Thr Ile Phe Asp Ile Thr Asn Asn
 50 55 60
 Leu Ser Ile Val Ile Leu Ala Leu Arg Pro Ser Asp Glu Gly Thr Tyr
 65 70 75 80
 Arg Cys Val Val Ile Lys Tyr Glu Arg Leu Glu Asn Gln Gly Glu His
 85 90 95
 Leu Ala Glu Val Thr Leu Ser Val Lys Ala Asp Phe Pro Thr Pro Ser
 100 105 110
 Ile Ser Asp Phe Glu Ile Pro Thr Ser Asn Ile Arg Arg Ile Ile Cys
 115 120 125
 Ser Thr Ser Gly Gly Phe Pro Glu Pro His Leu Ser Trp Leu Glu Asn
 130 135 140
 Gly Glu Glu Leu Asn Ala Ile Asn Thr Thr Val Ser Gln Asp Pro Glu
 145 150 155 160
 Thr Glu Leu Tyr Ala Val Ser Ser Lys Leu Asp Phe Asn Met Thr Thr
 165 170 175
 Asn His Ser Phe Met Cys Leu Ile Lys Tyr Gly His Leu Arg Val Asn
 180 185 190
 Gln Thr Phe Asn Trp Asn Thr Thr Lys Gln Glu His Phe Pro Asp Asn
 195 200 205

5 <210> 98
 <211> 208
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 10 <220>
 <223> ECD de CD80 v44
 10 <400> 98
 Val Ile His Val Thr Lys Glu Val Lys Glu Val Ala Thr Leu Ser Cys
 1 5 10 15
 Gly His Asn Val Ser Val Glu Glu Leu Ala Gln Thr Arg Ile Tyr Trp
 20 25 30
 Gln Lys Glu Lys Lys Met Val Leu Ile Met Met Ser Gly Asp Met Asn
 35 40 45
 Ile Trp Pro Glu Tyr Lys Asn Arg Thr Ile Phe Asp Ile Thr Asn Asn
 50 55 60
 Leu Ser Ile Val Ile Leu Ala Leu Arg Pro Ser Asp Glu Gly Thr Tyr
 65 70 75 80
 Glu Cys Val Val Leu Lys Tyr Glu Lys Asp Gly Phe Lys Arg Glu His
 85 90 95
 Leu Ala Glu Val Thr Leu Ser Val Lys Ala Asp Phe Pro Thr Pro Ser
 100 105 110
 Ile Ser Asp Phe Glu Ile Pro Thr Ser Asn Ile Arg Arg Ile Ile Cys
 115 120 125
 Ser Thr Ser Gly Gly Phe Pro Glu Pro His Leu Ser Trp Leu Glu Asn
 130 135 140
 Gly Glu Glu Leu Asn Ala Ile Asn Thr Thr Val Ser Gln Asp Pro Glu
 145 150 155 160
 Thr Glu Leu Tyr Ala Val Ser Ser Lys Leu Asp Phe Asn Met Thr Thr
 165 170 175
 Asn His Ser Phe Met Cys Leu Ile Lys Tyr Gly His Leu Arg Val Asn
 180 185 190
 Gln Thr Phe Asn Trp Asn Thr Thr Lys Gln Glu His Phe Pro Asp Asn
 195 200 205

15 <210> 99
 <211> 208
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 20 <220>
 <223> ECD de CD80 v45
 <400> 99

Val Ile His Val Thr Lys Glu Val Lys Glu Val Ala Thr Leu Ser Cys
 1 5 10 15
 Gly His Asn Val Ser Val Glu Glu Leu Ala Gln Thr Arg Ile Tyr Trp
 20 25 30
 Gln Lys Glu Lys Lys Met Val Leu Thr Met Met Ser Gly Asp Met Asn
 35 40 45
 Ile Trp Pro Glu Tyr Lys Asn Arg Thr Ile Phe Asp Ile Thr Asn Asn
 50 55 60
 Leu Ser Ile Val Ile Leu Ala Leu Arg Pro Ser Asp Glu Gly Thr Tyr
 65 70 75 80
 Glu Cys Val Val Leu Lys Tyr Glu Arg Lys Gly Tyr Arg Arg Glu His
 85 90 95
 Leu Ala Glu Val Thr Leu Ser Val Lys Ala Asp Phe Pro Thr Pro Ser
 100 105 110
 Ile Ser Asp Phe Glu Ile Pro Thr Ser Ser Ile Arg Arg Ile Ile Cys
 115 120 125
 Ser Thr Ser Gly Gly Phe Pro Glu Pro His Leu Ser Trp Leu Glu Asn
 130 135 140
 Gly Glu Glu Leu Asn Ala Ile Asn Thr Thr Val Ser Gln Asp Pro Glu
 145 150 155 160
 Thr Glu Leu Tyr Ala Val Ser Ser Lys Leu Asp Phe Asn Met Thr Thr
 165 170 175
 Ser His Ser Phe Met Cys Leu Ile Lys Tyr Gly His Leu Arg Val Asn
 180 185 190
 Gln Thr Phe Asn Trp Asn Thr Thr Lys Gln Glu His Phe Pro Asp Asn
 195 200 205

<210> 100

<211> 208

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> ECD de CD80 v46

10

<400> 100

Val Ile His Val Thr Lys Glu Val Lys Glu Val Ala Thr Leu Ser Cys
 1 5 10 15
 Gly His Asn Val Ser Val Glu Glu Leu Ala Gln Thr Arg Ile Tyr Trp
 20 25 30
 Gln Lys Glu Lys Lys Met Val Leu Thr Met Met Ser Gly Asp Met Asn
 35 40 45
 Ile Trp Pro Glu Tyr Lys Asn Arg Thr Ile Phe Asp Ile Thr Asn Asn
 50 55 60
 Leu Ser Ile Val Ile Leu Ala Leu Arg Pro Ser Asp Glu Gly Thr Tyr
 65 70 75 80
 Glu Cys Val Val Leu Lys Tyr Glu Arg Lys Gly Tyr Arg Arg Glu His
 85 90 95
 Leu Ala Glu Val Thr Leu Ser Val Lys Ala Asp Phe Pro Thr Pro Ser
 100 105 110
 Ile Ser Asp Phe Glu Ile Pro Thr Ser Asn Ile Arg Arg Ile Ile Cys
 115 120 125
 Ser Thr Ser Gly Gly Phe Pro Glu Pro His Leu Ser Trp Leu Glu Asn
 130 135 140
 Gly Glu Glu Leu Asn Ala Ile Asn Thr Thr Val Ser Gln Asp Pro Glu
 145 150 155 160
 Thr Glu Leu Tyr Ala Val Ser Ser Lys Leu Asp Phe Asn Met Thr Thr
 165 170 175
 Asn His Ser Phe Met Cys Leu Ile Lys Tyr Gly His Leu Arg Val Asn
 180 185 190
 Gln Thr Phe Asn Trp Asn Thr Thr Lys Gln Glu His Phe Pro Asp Asn
 195 200 205

<210> 101

15 <211> 208

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

20 <223> ECD de CD80 v47

<400> 101

Val	Ile	His	Val	Thr	Lys	Glu	Val	Lys	Glu	Val	Ala	Thr	Leu	Ser	Cys
1															15
Gly	His	Asn	Val	Ser	Val	Glu	Glu	Leu	Ala	Gln	Thr	Arg	Ile	Tyr	Trp
															30
Gln	Lys	Glu	Gly	Gln	Ile	Val	Leu	Thr	Met	Met	Ser	Gly	Asp	Met	Asn
															45
Ile	Trp	Pro	Glu	Tyr	Lys	Asn	Arg	Thr	Ile	Leu	Asp	Ile	Thr	Asn	Asn
															50
															55
Leu	Ser	Ile	Val	Ile	Leu	Ala	Leu	Arg	Pro	Ser	Asp	Glu	Gly	Thr	Tyr
															60
65															80
Val	Cys	Val	Val	Arg	Lys	Tyr	Glu	Asn	Asp	Thr	Pro	Val	Leu	Glu	His
															85
															90
Leu	Ala	Gly	Val	Thr	Leu	Ser	Val	Lys	Ala	Asp	Phe	Pro	Thr	Pro	Ser
															100
															105
Ile	Ser	Asp	Phe	Glu	Ile	Pro	Thr	Ser	Asn	Ile	Arg	Arg	Ile	Ile	Cys
															115
															120
Ser	Ala	Ser	Gly	Gly	Phe	Pro	Glu	Pro	His	Leu	Ser	Trp	Leu	Glu	Asn
															130
															135
															140
Gly	Glu	Glu	Leu	Ser	Ala	Ile	Asn	Thr	Thr	Val	Ser	Gln	Asp	Pro	Glu
145															150
															155
Thr	Glu	Leu	Tyr	Ala	Val	Ser	Ser	Lys	Leu	Asp	Phe	Asn	Met	Thr	Thr
															165
															170
Asn	His	Ser	Phe	Met	Cys	Leu	Ile	Lys	Tyr	Gly	His	Leu	Arg	Val	Asn
															180
															185
Gln	Thr	Phe	Asn	Trp	Asn	Thr	Thr	Lys	Gln	Glu	His	Phe	Pro	Asp	Asn
5															195
															200
															205

<210> 102

<211> 208

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> ECD de CD80 v48

15 <400> 102

Val	Ile	His	Val	Thr	Lys	Glu	Val	Lys	Glu	Val	Ala	Thr	Leu	Ser	Cys
1															15
Gly	His	Asn	Val	Ser	Val	Glu	Glu	Leu	Ala	Gln	Thr	Arg	Ile	Tyr	Trp
															30
Gln	Lys	Lys	Lys	Met	Val	Leu	Thr	Met	Met	Ser	Gly	Asp	Met	Asn	
															45
Ile	Trp	Pro	Glu	Tyr	Lys	Asn	Arg	Thr	Ile	Phe	Asp	Ile	Thr	Asn	Asn
															50
															55
Leu	Ser	Ile	Val	Ile	Leu	Ala	Leu	Arg	Pro	Ser	Asp	Glu	Gly	Thr	Tyr
															60
65															
Glu	Cys	Val	Val	Leu	Lys	Tyr	Asp	Arg	Lys	Gly	Tyr	Arg	Arg	Glu	His
															85
															90
Leu	Ala	Glu	Val	Thr	Leu	Ser	Val	Lys	Ala	Asp	Phe	Pro	Thr	Pro	Ser
															100
															105
Ile	Ser	Asp	Phe	Glu	Ile	Pro	Thr	Ser	Asn	Ile	Arg	Arg	Ile	Ile	Cys
															115
															120
Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Phe	Pro	Glu	Pro	His	Leu	Ser	Trp	Leu	Glu	Asn
															130
															135
															140
Gly	Glu	Glu	Leu	Asn	Ala	Ile	Asn	Thr	Thr	Val	Ser	Gln	Asp	Pro	Glu
145															150
															155
Thr	Glu	Leu	Tyr	Ala	Val	Ser	Ser	Lys	Leu	Asp	Phe	Asn	Met	Thr	Thr
															165
															170
Asn	His	Ser	Phe	Met	Cys	Leu	Ile	Lys	Tyr	Gly	His	Leu	Arg	Val	Asn
															180
															185
Gln	Thr	Phe	Asn	Trp	Asn	Thr	Thr	Lys	Gln	Glu	His	Phe	Pro	Asp	Asn
															195
															200
															205

<210> 103

<211> 208

<212> PRT

20 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> ECD de CD80 v49

<400> 103

Val	Ile	His	Val	Thr	Lys	Glu	Val	Lys	Glu	Val	Ala	Thr	Leu	Ser	Cys	
1															15	
Gly	His	Asn	Val	Ser	Val	Glu	Glu	Leu	Ala	Gln	Thr	Arg	Ile	Tyr	Trp	
20															30	
Gln	Lys	Glu	Gly	Gln	Ile	Val	Met	Thr	Met	Met	Ser	Gly	Asp	Met	Asn	
35															45	
5	Ile	Trp	Pro	Glu	Tyr	Lys	Asn	Arg	Thr	Ile	Phe	Asp	Ile	Thr	Asn	Asn
	50			55					60							
Leu	Ser	Ile	Val	Ile	Leu	Ala	Leu	Arg	Pro	Ser	Asp	Glu	Gly	Thr	Tyr	
65															80	
Glu	Cys	Val	Val	Leu	Lys	Tyr	Glu	Lys	Asp	Ala	Phe	Lys	Arg	Glu	His	
															95	
Leu	Ala	Glu	Val	Thr	Leu	Ser	Val	Lys	Ala	Asp	Phe	Pro	Thr	Pro	Ser	
															110	
Ile	Ser	Asp	Phe	Glu	Ile	Pro	Thr	Ser	Asn	Ile	Arg	Arg	Ile	Ile	Cys	
															125	
Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Phe	Pro	Glu	Pro	His	Leu	Ser	Trp	Leu	Glu	Asn	
															140	
Gly	Glu	Glu	Leu	Asn	Ala	Ile	Asn	Thr	Thr	Val	Ser	Gln	Asp	Pro	Glu	
145															160	
Thr	Glu	Leu	Tyr	Ala	Val	Ser	Ser	Lys	Leu	Asp	Phe	Asn	Met	Thr	Thr	
															175	
Asn	His	Ser	Phe	Met	Cys	Leu	Ile	Lys	Tyr	Gly	His	Leu	Arg	Val	Asn	
															190	
Gln	Thr	Phe	Asn	Trp	Asn	Thr	Thr	Lys	Gln	Glu	His	Phe	Pro	Asp	Asn	
															205	
	195				200				205							

<210> 104

10 <211> 208
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> ECD de CD80 v50

<400> 104

Val	Ile	His	Val	Thr	Lys	Glu	Val	Lys	Glu	Val	Ala	Thr	Leu	Ser	Cys
1															15
Gly	His	Asn	Val	Ser	Val	Glu	Glu	Leu	Ala	Gln	Thr	Arg	Ile	Tyr	Trp
															30
Gln	Lys	Glu	Gly	Lys	Met	Val	Leu	Thr	Met	Met	Ser	Gly	Asp	Met	Asn
															45
Ile	Trp	Pro	Glu	Tyr	Lys	Asn	Arg	Thr	Ile	Phe	Asp	Ile	Thr	Asn	Asn
															50
Leu	Ser	Ile	Val	Ile	Leu	Ala	Leu	Arg	Pro	Ser	Asp	Glu	Gly	Thr	Tyr
65															80
Glu	Cys	Val	Val	Leu	Lys	Tyr	Glu	Lys	Asp	Ala	Phe	Lys	Arg	Glu	His
															95
Leu	Ala	Glu	Val	Thr	Leu	Ser	Val	Lys	Ala	Asp	Phe	Pro	Thr	Pro	Ser
															110
Ile	Ser	Asp	Phe	Glu	Ile	Pro	Thr	Ser	Asn	Ile	Arg	Arg	Ile	Ile	Cys
															125
Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Phe	Pro	Glu	Pro	His	Leu	Ser	Trp	Leu	Glu	Asn
															130
Gly	Glu	Glu	Leu	Asn	Ala	Ile	Asn	Thr	Thr	Val	Ser	Gln	Asp	Pro	Glu
145															155
Thr	Glu	Leu	Tyr	Ala	Val	Ser	Ser	Lys	Leu	Asp	Phe	Asn	Met	Thr	Thr
															165
Asn	His	Ser	Phe	Met	Cys	Leu	Ile	Lys	Tyr	Gly	His	Leu	Arg	Val	Asn
															180
Gln	Thr	Phe	Asn	Trp	Asn	Thr	Thr	Lys	Gln	Glu	His	Phe	Pro	Asp	Asn
															195
	195				200				205						

20 <210> 105
 <211> 208

<212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> ECD de CD80 v51

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

10 <210> 106
 <211> 208
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> ECD de CD80 v52

<400> 106
 Val Ile His Val Thr Lys Glu Val Lys Glu Val Thr Thr Leu Ser Cys
 1 5 10 15
 Gly Leu Asn Val Ser Val Glu Glu Leu Ala Gln Thr Arg Ile Tyr Trp
 20 25 30
 Gln Lys Glu Lys Lys Met Val Leu Thr Met Val Ser Gly Asp Met Asn
 35 40 45
 Ile Trp Pro Glu Tyr Lys Asn Arg Thr Ile Leu Asp Ile Thr Asn Asn
 50 55 60
 Leu Ser Ile Val Ile Leu Ala Leu Arg Pro Ser Asp Lys Gly Thr Tyr
 65 70 75 80
 Glu Cys Val Val Leu Lys Tyr Glu Lys Asp Ala Phe Lys Arg Glu His
 85 90 95
 Leu Ala Glu Val Thr Leu Ser Val Lys Ala Asp Phe Ser Thr Pro Ser
 100 105 110
 Ile Ser Asp Phe Glu Thr Pro Thr Ser Asn Ile Arg Arg Ile Ile Cys
 115 120 125
 Ser Thr Ser Gly Gly Phe Pro Glu Pro His Leu Ser Trp Leu Glu Asn
 130 135 140
 Gly Glu Glu Leu Asn Ala Ile Asn Thr Thr Val Ser Gln Asp Pro Glu
 145 150 155 160
 Thr Glu Leu Tyr Ala Val Ser Ser Lys Leu Asp Phe Asn Met Thr Thr
 165 170 175
 Asn His Ser Phe Met Cys Leu Ile Lys Tyr Gly His Leu Arg Val Asn
 180 185 190
 Gln Thr Phe Asn Trp Asn Thr Thr Lys Gln Glu His Phe Pro Asp Asn
 195 200 205

20

<210> 107
 <211> 208
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> ECD de CD80 v53

<400> 107
 Val Ile His Val Thr Lys Glu Val Lys Glu Val Ala Thr Leu Ser Cys
 1 5 10 15
 Gly His Asn Val Ser Val Glu Glu Leu Ala Gln Thr Val Ile Phe Trp
 20 25 30
 Gln Lys Glu Gly Lys Leu Val Leu Thr Met Gln Ser Gly Asp Met Asn
 35 40 45
 Ile Trp Pro Glu Tyr Lys Asn Arg Thr Ile Phe Asp Ile Thr Asn Asn
 50 55 60
 Leu Ser Ile Val Ile Leu Ala Leu Arg Pro Ser Asp Glu Gly Thr Tyr
 65 70 75 80
 Arg Cys Ile Val Ile Lys Tyr Glu Arg Leu Glu Asn Gln Gly Glu His
 85 90 95
 Leu Ala Glu Val Thr Leu Ser Val Lys Ala Asp Phe Pro Thr Pro Ser
 100 105 110
 Ile Ser Asp Phe Glu Ile Pro Thr Ser Asn Ile Arg Arg Ile Ile Cys
 115 120 125
 Ser Thr Ser Gly Gly Phe Pro Glu Pro His Leu Ser Trp Leu Glu Asn
 130 135 140
 Gly Glu Glu Leu Asn Ala Ile Asn Thr Thr Val Ser Gln Asp Pro Glu
 145 150 155 160
 Thr Glu Leu Tyr Ala Val Ser Ser Lys Leu Asp Phe Asn Met Thr Thr
 165 170 175
 Asn His Ser Phe Met Cys Leu Ile Lys Tyr Gly His Leu Arg Val Asn
 180 185 190
 Gln Thr Phe Asn Trp Asn Thr Thr Lys Gln Glu His Phe Pro Asp Asn
 195 200 205

10

<210> 108
 <211> 208
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15

<220>
 <223> ECD de CD80 v54

20

<400> 108
 Val Ile His Val Thr Lys Glu Val Lys Glu Val Ala Thr Leu Ser Cys
 1 5 10 15
 Gly His Asn Val Ser Val Glu Glu Leu Ala Gln Thr Arg Ile Tyr Trp
 20 25 30
 Gln Lys Glu Lys Lys Met Val Leu Thr Met Met Ser Gly Asp Met Asn
 35 40 45
 Ile Trp Pro Glu Tyr Lys Asn Arg Thr Ile Phe Asp Ile Thr Asn Asn
 50 55 60
 Leu Ser Ile Met Ile Pro Ala Pro Arg Pro Ser Asp Glu Gly Thr Tyr
 65 70 75 80
 Glu Cys Val Val Leu Glu Tyr Glu Lys Asp Ala Phe Lys Arg Glu His

85	90	95
Leu Ala Glu Val Thr Leu Ser Val Lys Ala Asp Phe Pro Thr Pro Ser		
100	105	110
Ile Ser Asp Phe Glu Ile Pro Thr Ser Asn Ile Arg Arg Ile Ile Cys		
115	120	125
Ser Thr Ser Gly Gly Phe Pro Glu Pro His Leu Ser Trp Leu Glu Asn		
130	135	140
Gly Glu Glu Leu Asn Ala Ile Asn Thr Thr Val Ser Gln Asp Pro Glu		
145	150	155
Thr Glu Leu Tyr Ala Val Ser Ser Lys Leu Asp Phe Asn Met Thr Thr		
165	170	175
Asn His Ser Phe Met Cys Leu Ile Lys Tyr Gly His Leu Arg Val Asn		
180	185	190
Gln Thr Phe Asn Trp Asn Thr Thr Lys Gln Glu His Phe Pro Asp Asn		
195	200	205

<210> 109

<211> 238

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> ECD de ICOSL v1

10

<400> 109

Asp Thr Gln Glu Lys Glu Val Arg Ala Met Val Gly Ser Asp Val Glu		
1	5	10
Leu Ser Cys Ala Cys Pro Glu Gly Ser Arg Phe Asp Leu Asn Asp Val		
20	25	30
Tyr Val Tyr Trp Gln Thr Ser Glu Ser Lys Thr Val Val Thr Tyr His		
35	40	45
Ile Pro Gln Ser Ser Ser Leu Glu Asn Val Asp Ser Arg Tyr Arg Asn		
50	55	60
Arg Ala Leu Met Ser Pro Ala Gly Met Leu Arg Gly Asp Phe Ser Leu		
65	70	75
Arg Leu Phe Asn Val Thr Pro Gln Asp Glu Gln Lys Phe His Cys Leu		
85	90	95
Val Leu Ser Gln Ser Leu Gly Phe Gln Glu Val Leu Ser Val Glu Val		
100	105	110
Thr Leu His Val Ala Ala Asn Phe Ser Val Pro Val Val Ser Ala Pro		
115	120	125
His Ser Pro Ser Gln Asp Glu Leu Thr Phe Thr Cys Thr Ser Ile Asn		
130	135	140
Gly Tyr Pro Arg Pro Asn Val Tyr Trp Ile Asn Lys Thr Asp Asn Ser		
145	150	155
Leu Leu Asp Gln Ala Leu Gln Asn Asp Thr Val Phe Leu Asn Met Arg		
165	170	175
Gly Leu Tyr Asp Val Val Ser Val Leu Arg Ile Ala Arg Thr Pro Ser		
180	185	190
Val Asn Ile Gly Cys Cys Ile Glu Asn Val Leu Leu Gln Gln Asn Leu		
195	200	205
Thr Val Gly Ser Gln Thr Gly Asn Asp Ile Gly Glu Arg Asp Lys Ile		
210	215	220
Thr Glu Asn Pro Val Ser Thr Gly Glu Lys Asn Ala Ala Thr		
225	230	235

<210> 110

15 <211> 238

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

20 <223> ECD de ICOSL v2

<400> 110

Asp Thr Gln Glu Lys Glu Val Arg Ala Met Val Gly Ser Asp Val Glu
 1 5 10 15
 Leu Ser Cys Ala Cys Pro Glu Gly Ser Arg Phe Asp Leu Asn Asp Val
 20 25 30
 Tyr Val Tyr Trp Gln Thr Ser Glu Ser Lys Thr Val Val Thr Tyr His
 35 40 45
 Ile Pro Gln His Ser Ser Leu Glu Asn Val Asp Ser Arg Tyr Arg Asn
 50 55 60
 Arg Ala Leu Met Ser Pro Ala Gly Met Leu Arg Gly Asp Phe Ser Leu
 65 70 75 80
 Arg Leu Phe Asn Val Thr Pro Gln Asp Glu Gln Lys Phe His Cys Leu
 85 90 95
 Val Leu Ser Gln Ser Leu Gly Phe Gln Glu Val Leu Ser Val Glu Val
 100 105 110
 Thr Leu His Val Ala Ala Asn Phe Ser Val Pro Val Val Ser Ala Pro
 115 120 125
 His Ser Pro Ser Gln Asp Glu Leu Thr Phe Thr Cys Thr Ser Ile Asn
 130 135 140
 Gly Tyr Pro Arg Pro Asn Val Tyr Trp Ile Asn Lys Thr Asp Asn Ser
 145 150 155 160
 Leu Leu Asp Gln Ala Leu Gln Asn Asp Thr Val Phe Leu Asn Met Arg
 165 170 175
 Gly Leu Tyr Asp Val Val Ser Val Leu Arg Ile Ala Arg Thr Pro Ser
 180 185 190
 Val Asn Ile Gly Cys Cys Ile Glu Asn Val Leu Leu Gln Gln Asn Leu
 195 200 205
 Thr Val Gly Ser Gln Thr Gly Asn Asp Ile Gly Glu Arg Asp Lys Ile
 210 215 220
 Thr Glu Asn Pro Val Ser Thr Gly Glu Lys Asn Ala Ala Thr
 225 230 235
 <210> 111
 <211> 238
 <212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> ECD de ICOSL v3

10 <400> 111

Asp Thr Gln Glu Lys Glu Val Arg Ala Met Val Gly Ser Asp Val Glu
 1 5 10 15
 Leu Ser Cys Ala Cys Pro Glu Gly Ser Arg Phe Asp Leu Asn Asp Val
 20 25 30
 Tyr Val Tyr Trp Gln Thr Ser Glu Ser Lys Thr Val Val Thr Tyr His
 35 40 45
 Ile Pro Gln Asp Ser Ser Leu Glu Asn Val Asp Ser Arg Tyr Arg Asn
 50 55 60
 Arg Ala Leu Met Ser Pro Ala Gly Met Leu Arg Gly Asp Phe Ser Leu
 65 70 75 80
 Arg Leu Phe Asn Val Thr Pro Gln Asp Glu Gln Lys Phe His Cys Leu
 85 90 95
 Val Leu Ser Gln Ser Leu Gly Phe Gln Glu Val Leu Ser Val Glu Val
 100 105 110
 Thr Leu His Val Ala Ala Asn Phe Ser Val Pro Val Val Ser Ala Pro
 115 120 125
 His Ser Pro Ser Gln Asp Glu Leu Thr Phe Thr Cys Thr Ser Ile Asn
 130 135 140
 Gly Tyr Pro Arg Pro Asn Val Tyr Trp Ile Asn Lys Thr Asp Asn Ser
 145 150 155 160
 Leu Leu Asp Gln Ala Leu Gln Asn Asp Thr Val Phe Leu Asn Met Arg
 165 170 175
 Gly Leu Tyr Asp Val Val Ser Val Leu Arg Ile Ala Arg Thr Pro Ser
 180 185 190
 Val Asn Ile Gly Cys Cys Ile Glu Asn Val Leu Leu Gln Gln Asn Leu
 195 200 205
 Thr Val Gly Ser Gln Thr Gly Asn Asp Ile Gly Glu Arg Asp Lys Ile
 210 215 220
 Thr Glu Asn Pro Val Ser Thr Gly Glu Lys Asn Ala Ala Thr
 225 230 235

<210> 112
 <211> 238
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> ECD de ICOSL v4

<400> 112
 Asp Thr Gln Glu Lys Glu Val Arg Ala Met Val Gly Ser Asp Val Glu
 1 5 10 15
 Leu Ser Cys Ala Cys Pro Glu Gly Ser Arg Phe Asp Leu Asn Asp Val
 20 25 30
 Tyr Val Tyr Trp Gln Thr Ser Glu Ser Lys Thr Val Val Thr Tyr His
 35 40 45
 Ile Pro Gln Tyr Ser Ser Leu Glu Tyr Val Asp Ser Arg Tyr Arg Asn
 50 55 60
 Arg Ala Leu Met Ser Pro Ala Gly Met Leu Arg Gly Asp Phe Ser Leu
 65 70 75 80
 Arg Leu Phe Asn Val Thr Pro Gln Asp Glu Gln Lys Phe His Cys Leu
 85 90 95
 Val Leu Ser Gln Ser Leu Gly Phe Gln Glu Val Leu Ser Val Glu Val
 100 105 110
 Thr Leu His Val Ala Ala Asn Phe Ser Val Pro Val Val Ser Ala Pro
 115 120 125
 His Ser Pro Ser Gln Asp Glu Leu Thr Leu Thr Cys Thr Ser Ile Asn
 130 135 140
 Gly Tyr Pro Arg Pro Asn Val Tyr Trp Ile Asn Lys Thr Asp Asn Ser
 145 150 155 160
 Leu Leu Asp Gln Ala Leu Gln Asn Asp Thr Val Phe Leu Asn Met Arg
 165 170 175
 Gly Leu Tyr Asp Val Val Ser Val Leu Arg Ile Ala Arg Thr Pro Ser
 180 185 190
 Val Asn Ile Gly Cys Cys Ile Glu Asn Val Pro Leu Gln Gln Asn Leu
 195 200 205
 Thr Val Gly Ser Gln Thr Gly Asn Asp Ile Gly Glu Arg Asp Lys Ile
 210 215 220
 Thr Glu Asn Pro Val Ser Thr Gly Glu Lys Asn Ala Ala Thr
 225 230 235

10

<210> 113
 <211> 238
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> ECD de ICOSL v5

20 <400> 113

Asp Thr Gln Glu Lys Glu Val Arg Ala Met Val Gly Ser Asp Val Glu
 1 5 10 15
 Leu Ser Cys Ala Cys Pro Glu Gly Ser Arg Phe Asp Leu Asn Asp Val
 20 25 30
 Tyr Val Tyr Trp Gln Thr Ser Glu Ser Lys Thr Val Val Thr Tyr His
 35 40 45
 Ile Pro Gln His Ser Ser Leu Glu Tyr Val Asp Ser Arg Tyr Arg Asn
 50 55 60
 Arg Ala Leu Met Ser Pro Ala Gly Met Leu Arg Gly Asp Phe Ser Leu
 65 70 75 80
 Arg Leu Phe Asn Val Thr Pro Gln Asp Glu Gln Lys Phe His Cys Leu
 85 90 95
 Val Leu Ser Pro Ser Leu Gly Phe Gln Glu Val Leu Ser Val Glu Val
 100 105 110
 Thr Leu His Val Ala Ala Asn Phe Ser Val Pro Val Val Ser Ala Pro
 115 120 125
 His Ser Pro Ser Gln Asp Glu Leu Thr Phe Thr Cys Thr Ser Ile Asn
 130 135 140
 Gly Tyr Pro Arg Pro Asn Val Tyr Trp Ile Asn Lys Thr Asp Asn Ser
 145 150 155 160
 Leu Leu Asp Gln Ala Leu Gln Asn Asp Thr Val Phe Leu Asn Met Arg
 165 170 175
 Gly Leu Tyr Asp Val Val Ser Val Leu Arg Ile Ala Arg Thr Pro Ser
 180 185 190
 Val Asn Ile Gly Cys Cys Ile Glu Asn Val Leu Leu Gln Gln Asn Leu
 195 200 205
 Thr Val Gly Ser Gln Thr Gly Asn Asp Ile Gly Glu Arg Asp Lys Ile
 210 215 220
 Thr Glu Asn Pro Val Ser Thr Gly Glu Lys Asn Ala Ala Thr
 225 230 235
 <210> 114
 <211> 238
 <212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> ECD de ICOSL v6

10 <400> 114

Asp Thr Gln Glu Lys Glu Val Arg Ala Met Val Gly Ser Asp Val Glu
 1 5 10 15
 Leu Ser Cys Ala Cys Pro Glu Gly Ser Arg Phe Asp Leu Asn Asp Val
 20 25 30
 Tyr Val Tyr Trp Gln Thr Ser Glu Ser Lys Thr Val Val Thr Tyr His
 35 40 45
 Ile Pro Gln Ser Ser Ser Leu Glu Asn Val Asp Ser Arg Tyr Arg Asn
 50 55 60
 Arg Ala Leu Met Ser Pro Ala Gly Met Leu Arg Gly Asp Phe Ser Leu
 65 70 75 80
 Arg Leu Phe Asn Val Thr Pro Gln Asp Glu Gln Lys Phe His Cys Leu
 85 90 95
 Val Leu Ser Gln Ser Leu Gly Phe Gln Glu Val Leu Ser Val Glu Val
 100 105 110
 Thr Leu His Val Ala Ala Asn Phe Ser Val Pro Val Val Ser Ala Pro
 115 120 125
 His Ser Pro Ser Gln Asp Glu Leu Thr Phe Thr Cys Thr Ser Ile Asn
 130 135 140
 Gly Cys Pro Arg Pro Asn Val Cys Trp Ile Asn Lys Thr Asp Asn Ser
 145 150 155 160
 Leu Leu Asp Gln Ala Leu Gln Asn Asp Thr Val Phe Leu Asn Met Arg
 165 170 175
 Gly Leu Tyr Asp Val Val Ser Val Leu Arg Ile Ala Arg Thr Pro Ser
 180 185 190
 Val Asn Ile Gly Cys Cys Ile Glu Asn Val Leu Leu Gln Gln Asn Leu
 195 200 205
 Thr Val Gly Ser Gln Thr Gly Asn Asp Ile Gly Glu Arg Asp Lys Ile
 210 215 220
 Thr Glu Asn Pro Val Ser Thr Gly Glu Lys Asn Ala Ala Thr
 225 230 235

<210> 115
 <211> 238
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> ECD de ICOSL v7

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

10

<210> 116
 <211> 238
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> ECD de ICOSL v8

20

<400> 116
 Asp Thr Gln Glu Lys Glu Val Arg Ala Met Val Gly Ser Asp Val Glu
 1 5 10 15

Leu Ser Cys Ala Cys Pro Glu Gly Ser Arg Phe Asp Leu Asn Asp Val
 20 25 30
 Tyr Val Tyr Trp Gln Thr Ser Glu Ser Lys Thr Val Val Thr Tyr His
 35 40 45
 Ile Pro Gln His Ser Ser Leu Glu Asn Val Asp Ser Arg Tyr Arg Asn
 50 55 60
 Arg Ala Leu Met Ser Pro Ala Gly Met Leu Arg Gly Asp Phe Ser Leu
 65 70 75 80
 Arg Leu Phe Asn Val Thr Pro Gln Asp Glu Gln Lys Phe His Cys Leu
 85 90 95
 Val Leu Ser Gln Ser Leu Gly Phe Gln Glu Val Leu Ser Val Glu Val
 100 105 110
 Thr Leu His Val Ala Ala Asn Phe Ser Val Pro Val Val Ser Ala Pro
 115 120 125
 His Ser Pro Ser Gln Asp Glu Leu Thr Phe Thr Asp Thr Ser Ile Asn
 130 135 140
 Gly Tyr Pro Arg Pro Asn Val Tyr Trp Ile Asn Lys Thr Asp Asn Ser
 145 150 155 160
 Leu Leu Asp Gln Ala Leu Gln Asn Asp Thr Val Phe Leu Asn Met Arg
 165 170 175
 Gly Leu Tyr Asp Val Val Ser Val Leu Arg Ile Ala Arg Thr Pro Ser
 180 185 190
 Val Asn Ile Gly Cys Cys Ile Glu Asn Val Leu Leu Gln Gln Asn Leu
 195 200 205
 Thr Val Gly Ser Gln Thr Gly Asn Asp Ile Gly Glu Arg Asp Lys Ile
 210 215 220
 Ala Glu Asn Pro Val Ser Thr Gly Glu Lys Asn Ala Ala Thr
 225 230 235

<210> 117

<211> 238

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> ECD de ICOSL v9

10

<400> 117

Asp Thr Gln Glu Lys Glu Val Arg Ala Met Val Gly Ser Asp Val Glu
 1 5 10 15
 Leu Ser Cys Ala Cys Pro Glu Gly Ser Arg Phe Asp Leu Asn Asp Val
 20 25 30
 Tyr Val Tyr Trp Gln Thr Ser Glu Ser Lys Thr Val Val Thr Tyr His
 35 40 45
 Ile Pro Gln His Ser Ser Leu Glu Asn Val Asp Ser Arg Tyr Arg Asn
 50 55 60
 Arg Ala Leu Met Ser Pro Ala Gly Met Leu Arg Gly Asp Phe Ser Leu
 65 70 75 80
 Arg Leu Phe Asn Val Thr Pro Gln Asp Glu Gln Lys Phe His Cys Leu
 85 90 95
 Val Leu Ser Gln Ser Leu Gly Phe Gln Glu Val Leu Ser Val Glu Val
 100 105 110
 Thr Leu His Val Ala Ala Asn Phe Ser Val Pro Val Val Ser Ala Pro
 115 120 125
 His Ser Pro Ser Gln Asp Glu Leu Thr Phe Thr Cys Thr Ser Ile Asn
 130 135 140
 Gly Tyr Pro Arg Pro Asn Val Tyr Trp Ile Asn Lys Thr Asp Asn Ser
 145 150 155 160
 Leu Leu Asp Gln Ala Leu Gln Asn Asp Thr Val Phe Leu Asn Met Arg
 165 170 175
 Gly Leu Tyr Asp Val Val Ser Val Leu Arg Ile Ala Arg Thr Pro Ser
 180 185 190

 Val Asn Ile Gly Cys Arg Ile Glu Asn Val Leu Leu Gln Gln Asn Leu
 195 200 205
 Thr Val Gly Ser Gln Thr Gly Asn Asp Ile Gly Glu Arg Asp Lys Ile
 210 215 220
 Ala Glu Asn Pro Val Ser Thr Gly Glu Lys Asn Ala Ala Thr
 225 230 235

15

<210> 118

<211> 238
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> ECD de ICOSL v10

<400> 118
 Asp Thr Gln Glu Lys Glu Val Arg Ala Met Val Gly Ser Asp Val Glu
 1 5 10 15
 Leu Ser Cys Ala Cys Pro Glu Gly Ser Arg Phe Asp Leu Asn Asp Val
 20 25 30
 Tyr Val Tyr Trp Gln Thr Ser Glu Ser Lys Thr Val Val Thr Tyr His
 35 40 45
 Ile Pro Gln His Ser Ser Leu Glu Asn Val Asp Ser Arg Tyr Arg Asn
 50 55 60
 Arg Ala Leu Met Ser Pro Ala Gly Met Leu Arg Gly Asp Phe Ser Leu
 65 70 75 80
 Arg Leu Phe Asn Val Thr Pro Gln Asp Glu Gln Arg Phe His Cys Leu
 85 90 95
 Val Leu Ser Gln Ser Leu Gly Phe Gln Glu Val Leu Ser Val Glu Val
 100 105 110
 Thr Leu His Val Ala Ala Asn Phe Ser Val Pro Val Val Ser Ala Pro
 115 120 125
 His Ser Pro Ser Gln Asp Glu Leu Thr Phe Thr Cys Thr Ser Ile Asn
 130 135 140
 Gly Tyr Pro Arg Pro Asn Val Tyr Trp Ile Asn Lys Thr Asp Asn Ser
 145 150 155 160
 Leu Leu Asp Gln Ala Leu Gln Asn Asp Thr Val Phe Leu Asn Met Arg
 165 170 175
 Gly Leu Tyr Asp Val Val Ser Val Leu Arg Ile Ala Arg Thr Pro Ser
 180 185 190
 Val Asn Ile Gly Cys Cys Ile Glu Asn Val Leu Leu Gln Gln Asn Leu
 195 200 205
 Thr Val Gly Ser Gln Thr Gly Asn Asp Ile Gly Glu Arg Asp Lys Ile
 210 215 220
 Thr Glu Asn Pro Val Ser Thr Gly Glu Lys Asn Ala Ala Thr
 225 230 235

10 <210> 119
 <211> 238
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> ECD de ICOSL v11

<400> 119
 Asp Thr Gln Glu Lys Glu Val Arg Ala Met Val Gly Ser Asp Val Glu
 1 5 10 15
 Leu Ser Cys Ala Cys Pro Glu Gly Ser Arg Phe Asp Leu Asn Asp Val
 20 25 30
 Tyr Val Tyr Trp Gln Thr Ser Glu Ser Lys Thr Val Val Thr Tyr His

35	40	45	
Ile Pro Gln His Ser Ser	Leu Glu Asn Val Asp	Ser Arg Tyr Arg Asn	
50	55	60	
Arg Ala Leu Met Ser Pro	Ala Gly Met Leu Arg Gly Asp Phe Ser	Leu	
65	70	75	80
Arg Leu Phe Asn Val Thr Pro	Gln Asp Glu Gln Lys Phe His Cys	Leu	
85	90	95	
Val Leu Gly Gln Ser Leu Gly	Phe Gln Glu Val Leu Ser Val	Glu Val	
100	105	110	
Thr Leu His Val Ala Ala Asn	Phe Ser Val Pro Val Val	Ser Ala Pro	
115	120	125	
His Ser Pro Ser Gln Asp	Glu Leu Thr Phe Thr Cys	Thr Ser Ile Asn	
130	135	140	
Gly Tyr Pro Arg Pro Asn Val	Tyr Trp Ile Asn Lys Thr Asp Asn	Ser	
145	150	155	160
Leu Leu Asp Gln Ala Leu Gln Asn Asp	Thr Val Phe Leu Asn Met	Arg	
165	170	175	
Gly Leu Tyr Asp Val Val Ser	Val Leu Arg Ile Ala Arg Thr Pro	Ser	
180	185	190	
Val Asn Ile Gly Cys Cys	Ile Glu Asn Val Leu Leu Gln	Gln Asn Leu	
195	200	205	
Thr Val Gly Ser Gln Thr Gly	Asn Asp Ile Gly Glu Arg Asp	Lys Ile	
210	215	220	
Thr Glu Asn Pro Val Ser	Thr Gly Glu Lys Asn Ala Ala	Thr	
225	230	235	

<210> 120

<211> 238

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> ECD de ICOSL v12

10

<400> 120

Asp Thr Gln Glu Lys Glu Val Arg	Ala Met Val Gly Ser Asp Val	Glu	
1	5	10	15
Leu Ser Cys Ala Cys Pro	Glu Gly Ser Arg Phe Asp	Leu Asn Asp Val	
20	25	30	
Tyr Val Tyr Trp Gln Thr Ser	Glu Ser Lys Thr Val Val	Thr Tyr His	
35	40	45	
Ile Pro Gln Tyr Ser Ser	Leu Glu Asn Val Asp	Ser Arg Tyr Arg Asn	
50	55	60	
Arg Ala Leu Met Ser Pro	Ala Gly Met Leu Arg Gly	Asp Phe Ser	
65	70	75	80
Arg Leu Phe Asn Val Thr Pro	Gln Asp Glu Gln Lys	Phe His Cys	
85	90	95	
Val Leu Ser Gln Ser Leu Gly	Phe Gln Glu Val	Leu Ser Val	
100	105	110	
Thr Leu His Val Ala Ala Asn	Phe Ser Val Pro Val	Val Val Ser Ala Pro	
115	120	125	
His Ser Pro Ser Gln Asp	Glu Leu Thr Phe	Thr Cys Thr Ser Ile Asn	
130	135	140	
Gly Tyr Pro Arg Pro Asn Val	Tyr Trp Ile Asn Lys	Thr Asp Asn Ser	
145	150	155	160
Leu Leu Asp Gln Ala Leu Gln	Asn Asp Thr Val Phe	Leu Asn Met	
165	170	175	
Gly Leu Tyr Asp Val Val Ser	Val Leu Arg Ile Ala Arg	Thr Pro Ser	
180	185	190	
Val Asn Ile Gly Cys Cys	Ile Glu Asn Val Leu Leu Gln	Gln Asn Leu	
195	200	205	
Thr Val Gly Ser Gln Thr Gly	Asn Asp Ile Gly Glu Arg Asp	Lys Ile	

210

215

220

Thr Glu Asn Pro Val Ser	Thr Gly Glu Lys Asn	Ala Ala Thr
225	230	235

15

<210> 121

<211> 238

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> ECD de ICOSL v13

5 <400> 121
 Asp Thr Gln Glu Lys Glu Val Arg Ala Met Val Gly Ser Asp Val Glu
 1 5 10 15
 Leu Ser Cys Ala Cys Pro Glu Gly Ser Arg Phe Asp Leu Asn Asp Val
 20 25 30
 Tyr Val Tyr Trp Gln Thr Ser Glu Ser Lys Thr Val Val Thr Tyr His
 35 40 45
 Ile Pro Gln Asn Ser Ser Leu Glu Tyr Val Asp Ser Arg Tyr Arg Asn
 50 55 60
 Arg Ala Leu Met Ser Pro Ala Gly Met Leu Arg Gly Asp Phe Ser Leu
 65 70 75 80
 Arg Leu Phe Asn Val Thr Pro Gln Asp Glu Gln Lys Phe His Cys Leu
 85 90 95
 Val Leu Ser Gln Ser Leu Gly Phe Gln Glu Val Leu Ser Val Glu Val
 100 105 110
 Thr Leu His Val Ala Ala Asn Phe Ser Val Pro Val Val Ser Ala Pro
 115 120 125
 His Ser Pro Ser Gln Asp Glu Leu Thr Phe Thr Cys Thr Ser Ile Asn
 130 135 140
 Gly Tyr Pro Arg Pro Asn Val Tyr Trp Ile Asn Lys Thr Asp Asn Ser
 145 150 155 160
 Leu Leu Asp Gln Ala Leu Gln Asn Asp Thr Val Phe Leu Asn Met Arg
 165 170 175
 Gly Leu Tyr Asp Val Val Ser Val Leu Arg Ile Ala Arg Thr Pro Ser
 180 185 190
 Val Asn Ile Gly Cys Cys Ile Glu Asn Val Leu Leu Gln Gln Asn Leu
 195 200 205
 Thr Val Gly Ser Gln Thr Gly Asn Asp Ile Gly Glu Arg Asp Lys Ile
 210 215 220
 Thr Glu Asn Pro Val Ser Thr Gly Glu Lys Asn Ala Ala Thr
 225 230 235

<210> 122

<211> 238

10 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> ECD de ICOSL v14

15 <400> 122
 Asp Thr Gln Glu Lys Glu Val Arg Ala Met Val Gly Ser Asp Val Glu
 1 5 10 15
 Leu Ser Cys Ala Cys Pro Glu Gly Ser Arg Phe Asp Leu Asn Asp Val
 20 25 30
 Tyr Val Tyr Trp Gln Thr Ser Glu Ser Lys Thr Val Val Thr Tyr His
 35 40 45
 Ile Pro Gln Asn Ser Ser Leu Glu Tyr Val Asp Ser Arg Tyr Arg Asn
 50 55 60

Arg Ala Leu Met Ser Pro Ala Gly Met Leu Arg Gly Asp Phe Ser Leu
 65 70 75 80
 Arg Leu Phe Asn Val Thr Pro Gln Asp Glu Gln Lys Phe His Cys Leu
 85 90 95
 Val Leu Ser Pro Ser Leu Gly Phe Gln Glu Val Leu Ser Val Glu Val
 100 105 110
 Thr Leu His Val Ala Ala Asn Phe Ser Val Pro Val Val Ser Ala Pro
 115 120 125
 His Ser Pro Ser Gln Asp Glu Leu Thr Phe Thr Cys Thr Ser Ile Asn
 130 135 140
 Gly Tyr Pro Arg Pro Asn Val Tyr Trp Ile Asn Lys Thr Asp Asn Ser
 145 150 155 160
 Leu Leu Asp Gln Ala Leu Gln Asn Asp Thr Val Phe Leu Asn Met Arg
 165 170 175
 Gly Leu Tyr Asp Val Val Ser Val Leu Arg Ile Ala Arg Thr Pro Ser
 180 185 190
 Val Asn Ile Gly Cys Cys Ile Glu Asn Val Leu Leu Gln Gln Asn Leu
 195 200 205
 Thr Val Gly Ser Gln Thr Gly Asn Asp Ile Gly Glu Arg Asp Lys Ile
 210 215 220
 Thr Glu Asn Pro Val Ser Thr Gly Glu Lys Asn Ala Ala Thr
 225 230 235

<210> 123

<211> 238

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> ECD de ICOSL v15

10

<400> 123
 Asp Thr Gln Glu Lys Glu Val Arg Ala Met Val Gly Ser Asp Val Glu
 1 5 10 15
 Leu Ser Cys Ala Cys Pro Glu Gly Ser Arg Phe Asp Leu Asn Asp Val
 20 25 30
 Tyr Val Tyr Trp Gln Thr Ser Glu Ser Lys Thr Val Val Thr Tyr His
 35 40 45
 Ile Pro Gln Ser Ser Ser Leu Glu Asn Val Asp Ser Arg Tyr Arg Asn
 50 55 60
 Arg Ala Leu Met Ser Pro Ala Gly Met Leu Arg Gly Asp Phe Ser Leu
 65 70 75 80
 Arg Leu Phe Asn Val Thr Pro Gln Asp Glu Gln Lys Phe His Cys Leu
 85 90 95
 Val Leu Ser Gln Ser Leu Gly Phe Gln Glu Val Leu Ser Val Glu Val
 100 105 110
 Thr Leu His Val Ala Ala Asn Phe Ser Val Pro Val Val Ser Ala Pro
 115 120 125
 His Gly Pro Ser Gln Asp Glu Leu Thr Phe Thr Cys Thr Ser Ile Asn
 130 135 140
 Gly Tyr Pro Arg Pro Asn Val Cys Trp Ile Asn Lys Thr Asp Asn Ser
 145 150 155 160
 Leu Leu Asp Gln Ala Leu Gln Asn Asp Thr Val Phe Leu Asn Met Arg
 165 170 175
 Gly Leu Tyr Asp Val Val Ser Val Leu Arg Ile Ala Arg Thr Pro Ser
 180 185 190
 Val Asn Ile Gly Cys Cys Ile Glu Asn Val Leu Leu Gln Gln Asn Leu
 195 200 205
 Thr Val Gly Ser Gln Thr Gly Asn Asp Ile Gly Glu Arg Asp Lys Ile
 210 215 220
 Thr Glu Asn Pro Val Ser Thr Gly Glu Lys Asn Ala Ala Thr
 225 230 235

<210> 124

15 <211> 238

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

20 <223> ECD de ICOSL v16

<400> 124

Asp Thr Gln Glu Lys Glu Val Arg Ala Met Val Gly Ser Asp Val Glu
 1 5 10 15
 Leu Ser Cys Ala Cys Pro Glu Gly Ser Arg Phe Asp Leu Asn Asp Val
 20 25 30
 Tyr Val Tyr Trp Gln Thr Ser Glu Ser Lys Thr Val Val Thr Tyr His
 35 40 45
 Ile Pro Gln Ser Ser Ser Leu Glu Asn Val Asp Ser Arg Tyr Arg Asn
 50 55 60
 Arg Ala Leu Met Ser Pro Ala Gly Met Leu Arg Gly Asp Phe Ser Leu
 65 70 75 80
 Arg Leu Phe Asn Val Thr Pro Gln Asp Glu Gln Lys Phe His Cys Leu
 85 90 95
 Val Leu Ser Gln Ser Leu Gly Phe Gln Glu Val Leu Ser Val Glu Val
 100 105 110
 Thr Leu His Val Ala Ala Asn Phe Ser Val Pro Val Val Ser Ala Pro
 115 120 125
 His Ser Pro Ser Gln Asp Glu Leu Thr Phe Thr Cys Thr Ser Ile Asn
 130 135 140
 Gly Tyr Pro Arg Pro Asn Val Cys Trp Ile Asn Lys Thr Asp Asn Ser
 145 150 155 160
 Leu Leu Asp Gln Ala Leu Gln Asn Asp Thr Val Phe Leu Asn Met Arg
 165 170 175
 Gly Leu Tyr Asp Val Val Ser Val Leu Arg Ile Ala Arg Thr Pro Ser
 180 185 190
 Val Asn Ile Gly Cys Cys Ile Glu Asn Val Leu Leu Gln Gln Asn Leu
 195 200 205
 Thr Val Gly Ser Gln Thr Gly Asn Asp Ile Gly Glu Arg Asp Lys Ile
 210 215 220
 Thr Glu Asn Pro Val Ser Thr Gly Glu Lys Asn Ala Ala Thr
 225 230 235

5 <210> 125

<211> 238

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10 <220>

<223> ECD de ICOSL v17

<400> 125

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

15

85	90	95
Val Leu Ser Gln Ser Leu Gly Phe Gln	Glu Val Leu Ser Val	Glu Val
100	105	110
Thr Leu His Val Ala Ala Asn Phe Ser Val Pro Val Val	Ser Ala Pro	
115	120	125
His Ser Pro Ser Gln Asp Glu Leu Thr Phe Thr Cys	Thr Ser Ile Asn	
130	135	140
Gly Tyr Pro Arg Pro Asn Val Tyr Trp Ile Asn Lys Thr Asp Asn Ser		
145	150	155
Leu Leu Asp Gln Ala Leu Gln Asn Asp Thr Val Phe Leu Asn Met Arg		
165	170	175
Gly Leu Tyr Asp Val Val Ser Val Leu Arg Ile Ala Arg Thr Pro Ser		
180	185	190
Val Asn Ile Gly Cys Arg Ile Glu Asn Val Leu Leu Gln Gln Asn Leu		
195	200	205
Thr Val Gly Ser Gln Thr Gly Asn Asp Ile Gly Glu Arg Asp Lys Ile		
210	215	220
Thr Glu Asn Pro Val Ser Thr Gly Glu Lys Asn Ala Ala Thr		
225	230	235

<210> 126

<211> 238

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> ECD de ICOSL v18

10

<400> 126

Asp Thr Gln Glu Lys Glu Val Arg Ala Met Val Gly Ser Asp Val Glu		
1	5	10
Leu Ser Cys Ala Cys Pro Glu Gly Ser Arg Phe Asp Leu Asn Asp Val		
20	25	30
Tyr Val Tyr Trp Gln Thr Ser Glu Ser Lys Thr Val Val Thr Tyr His		
35	40	45
Ile Pro Gln Tyr Ser Ser Leu Glu Tyr Val Asp Ser Arg Tyr Arg Asn		
50	55	60
Arg Ala Leu Met Ser Pro Ala Gly Met Leu Arg Gly Asp Phe Ser Leu		
65	70	75
Arg Leu Phe Asn Val Thr Pro Gln Asp Glu Gln Lys Phe His Cys Leu		
85	90	95
Val Leu Ser Gln Ser Leu Gly Phe Gln Glu Val Leu Ser Val Glu Val		
100	105	110
Thr Leu His Val Ala Ala Asn Phe Ser Val Pro Val Val Ser Ala Pro		
115	120	125
His Ser Pro Ser Gln Asp Glu Leu Thr Phe Thr Cys Thr Ser Ile Asn		
130	135	140
Gly Tyr Pro Arg Pro Asn Val Cys Trp Ile Asn Lys Thr Asp Asn Ser		
145	150	155
Leu Leu Asp Gln Ala Leu Gln Asn Asp Thr Val Phe Leu Asn Met Arg		
165	170	175
Gly Leu Tyr Asp Val Val Ser Val Leu Arg Ile Ala Arg Thr Pro Ser		
180	185	190
Val Asn Ile Gly Cys Cys Ile Glu Asn Val Leu Leu Gln Gln Asn Leu		
195	200	205
Thr Val Gly Ser Gln Thr Gly Asn Asp Ile Gly Glu Arg Asp Lys Ile		
210	215	220
Thr Glu Asn Pro Val Ser Thr Gly Glu Lys Asn Ala Ala Thr		
225	230	235

<210> 127

<211> 238

15 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> ECD de ICOSL v19

20 <400> 127

Asp Thr Gln Glu Lys Glu Val Arg Ala Met Val Gly Ser Asp Val Glu
 1 5 10 15
 Leu Ser Cys Ala Cys Pro Glu Gly Ser Arg Phe Asp Leu Asn Asp Val
 20 25 30
 Tyr Val Tyr Trp Gln Thr Ser Glu Ser Lys Thr Val Val Thr Tyr His
 35 40 45
 Ile Pro Gln Tyr Ser Ser Leu Glu Tyr Val Asp Ser Arg Tyr Arg Asn
 50 55 60
 Arg Ala Leu Met Ser Pro Ala Gly Met Leu Arg Gly Asp Phe Ser Leu
 65 70 75 80
 Arg Leu Phe Asn Val Thr Pro Gln Asp Glu Gln Lys Phe His Cys Leu
 85 90 95
 Val Leu Ser Gln Ser Leu Gly Phe Gln Glu Val Leu Ser Val Glu Val
 100 105 110
 Thr Leu His Val Ala Ala Asn Phe Ser Val Pro Val Val Ser Ala Pro
 115 120 125
 Pro Ser Pro Ser Gln Asp Glu Leu Thr Phe Thr Cys Thr Ser Ile Asn
 130 135 140
 Gly Tyr Pro Arg Pro Asn Val Tyr Trp Ile Asn Lys Thr Asp Asn Ser
 145 150 155 160
 Leu Leu Asp Gln Ala Leu Gln Asn Asp Thr Val Phe Leu Asn Met Arg
 165 170 175
 Gly Leu Tyr Asp Val Val Ser Val Leu Arg Ile Ala Arg Thr Pro Ser
 180 185 190
 Val Asn Ile Gly Cys Arg Ile Glu Asn Val Leu Leu Gln Gln Asn Leu
 195 200 205
 Thr Val Gly Ser Gln Thr Gly Asn Asp Ile Gly Glu Arg Asp Lys Ile
 210 215 220
 Thr Glu Asn Pro Val Ser Thr Gly Glu Lys Asn Ala Ala Thr
 225 230 235

<210> 128

<211> 238

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> ECD de ICOSL v20

10

<400> 128

Asp Thr Gln Glu Lys Glu Val Arg Ala Met Val Gly Ser Asp Val Glu
 1 5 10 15
 Leu Ser Cys Ala Cys Pro Glu Gly Ser Arg Phe Asp Leu Asn Asp Val
 20 25 30
 Tyr Val Tyr Trp Gln Thr Ser Glu Ser Lys Thr Val Val Thr Tyr His
 35 40 45
 Ile Pro Gln His Ser Ser Leu Glu Asn Val Asp Ser Arg Tyr Arg Asn
 50 55 60
 Arg Ala Leu Met Ser Pro Ala Gly Met Leu Arg Gly Asp Phe Ser Leu
 65 70 75 80
 Arg Leu Phe Asn Val Thr Pro Gln Asp Glu Gln Lys Phe His Cys Leu
 85 90 95
 Val Leu Ser Gln Ser Leu Gly Phe Gln Glu Val Leu Ser Val Glu Val
 100 105 110
 Thr Leu His Val Ala Ala Asn Phe Ser Val Pro Val Val Ser Ala Pro
 115 120 125
 His Ser Pro Ser Gln Asp Glu Leu Thr Phe Thr Cys Thr Ser Ile Asn
 130 135 140
 Gly Tyr Pro Arg Pro Asn Val Tyr Trp Ile Asn Lys Thr Asp Asn Ser
 145 150 155 160
 Pro Leu Asp Gln Ala Leu Gln Asn Asp Thr Val Phe Leu Asn Met Arg
 165 170 175
 Gly Leu Tyr Asp Val Val Ser Val Leu Arg Ile Ala Arg Thr Pro Ser
 180 185 190
 Val Asn Ile Gly Cys Arg Ile Glu Asn Val Leu Leu Gln Gln Asn Leu
 195 200 205
 Thr Val Gly Ser Gln Thr Gly Asn Asp Ile Gly Glu Arg Asp Lys Ile
 210 215 220
 Thr Glu Asn Pro Val Ser Thr Gly Glu Lys Asn Ala Ala Thr
 225 230 235

5 <210> 129
 <211> 238
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 10 <220>
 <223> ECD de ICOSL v21
 <400> 129
 Asp Thr Gln Glu Lys Glu Val Arg Ala Met Val Gly Ser Asp Val Glu
 1 5 10 15
 Leu Ser Cys Ala Cys Pro Glu Gly Ser Arg Phe Asp Leu Asn Asp Val
 20 25 30
 Tyr Val Tyr Trp Gln Thr Ser Glu Ser Lys Thr Val Val Thr Tyr His
 35 40 45
 Ile Pro Gln Ser Ser Ser Leu Glu Asn Val Asp Ser Arg Tyr Arg Asn
 50 55 60
 Arg Ala Leu Met Ser Pro Ala Gly Met Leu Arg Gly Asp Phe Ser Leu
 65 70 75 80
 Arg Leu Phe Asn Val Thr Pro Gln Asp Glu Gln Lys Phe His Cys Leu
 85 90 95
 Val Leu Ser Gln Ser Leu Gly Phe Gln Glu Val Leu Ser Val Glu Val
 100 105 110
 Glu Leu His Val Ala Ala Asn Phe Ser Val Pro Val Val Ser Ala Pro
 115 120 125
 His Ser Pro Ser Gln Asp Glu Leu Thr Phe Thr Cys Thr Ser Ile Asn
 130 135 140
 Gly Tyr Pro Arg Pro Asn Val Tyr Trp Ile Asn Lys Thr Asp Asn Ser
 145 150 155 160
 Leu Leu Asp Gln Ala Leu Gln Asn Asp Thr Val Phe Leu Asn Met Arg
 165 170 175
 Gly Leu Tyr Asp Val Val Ser Val Leu Arg Ile Ala Arg Thr Pro Ser
 180 185 190
 Val Asn Ile Gly Cys Cys Ile Glu Asn Val Leu Leu Gln Gln Asn Leu
 195 200 205
 Thr Val Gly Ser Gln Thr Gly Asn Asp Ile Gly Glu Arg Asp Lys Ile
 210 215 220
 Thr Glu Asn Pro Val Ser Thr Gly Glu Lys Asn Ala Ala Thr
 225 230 235

15 <210> 130
 <211> 238
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 20 <220>
 <223> ECD de ICOSL v22
 <400> 130

Asp Thr Gln Glu Lys Glu Val Arg Ala Met Val Gly Ser Asp Val Glu
 1 5 10 15
 Leu Ser Cys Ala Cys Pro Glu Gly Ser Arg Phe Asp Leu Asn Asp Val
 20 25 30
 Tyr Val Tyr Trp Gln Thr Ser Glu Ser Lys Thr Val Val Thr Tyr His
 35 40 45
 Ile Pro Gln Asn Ser Ala Leu Glu Asn Val Asp Ser Arg Tyr Arg Asn
 50 55 60
 Arg Ala Leu Met Ser Pro Ala Gly Met Leu Arg Gly Asp Phe Ser Leu
 65 70 75 80
 Arg Leu Phe Asn Val Thr Pro Gln Asp Glu Gln Lys Phe His Cys Leu
 85 90 95
 Val Leu Ser Gln Ser Leu Gly Phe Gln Glu Val Leu Ser Val Glu Val
 100 105 110
 Thr Leu His Val Ala Ala Asn Phe Ser Val Pro Val Val Ser Ala Pro
 115 120 125
 His Ser Pro Ser Gln Asp Glu Leu Thr Phe Thr Cys Thr Ser Ile Asn
 130 135 140
 Gly Tyr Pro Arg Pro Asn Val Tyr Trp Ile Asn Lys Thr Asp Asn Ser
 145 150 155 160
 Leu Leu Asp Gln Ala Leu Gln Asn Asp Thr Val Phe Leu Asn Met Arg
 165 170 175
 Gly Leu Tyr Asp Val Val Ser Val Leu Arg Ile Ala Arg Thr Pro Ser
 180 185 190
 Val Asn Ile Gly Cys Cys Ile Glu Asn Val Leu Gln Gln Asn Leu
 195 200 205
 Thr Val Gly Ser Gln Thr Gly Asn Asp Ile Gly Glu Arg Asp Lys Ile
 210 215 220
 Thr Glu Asn Pro Val Ser Thr Gly Glu Lys Asn Ala Ala Thr
 225 230 235

<210> 131

<211> 238

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> ECD de ICOSL v23

10

<400> 131

Asp Thr Gln Glu Lys Glu Val Arg Ala Met Val Gly Ser Asp Val Glu
 1 5 10 15
 Leu Ser Cys Ala Cys Pro Glu Gly Ser Arg Phe Asp Leu Asn Asp Val
 20 25 30
 Tyr Val Tyr Trp Gln Thr Ser Glu Ser Lys Thr Val Val Thr Tyr His
 35 40 45
 Ile Pro Gln Asp Ser Pro Leu Glu Asn Val Asp Ser Arg Tyr Arg Asn
 50 55 60
 Arg Ala Leu Met Ser Pro Ala Gly Met Leu Arg Gly Asp Phe Ser Leu
 65 70 75 80
 Arg Leu Phe Asn Val Thr Pro Gln Asp Glu Gln Lys Phe His Cys Leu
 85 90 95
 Val Leu Ser Gln Ser Leu Gly Phe Gln Glu Val Leu Ser Val Glu Val
 100 105 110
 Thr Leu His Val Ala Ala Asn Phe Ser Val Pro Val Val Ser Ala Pro
 115 120 125
 His Ser Pro Ser Gln Asp Glu Leu Thr Phe Thr Cys Thr Ser Ile Asn
 130 135 140
 Gly Tyr Pro Arg Pro Asn Val Tyr Trp Ile Asn Lys Thr Asp Asn Ser
 145 150 155 160
 Leu Leu Asp Gln Ala Leu Gln Asn Asp Thr Val Phe Leu Asn Met Arg
 165 170 175
 Gly Leu Tyr Asp Val Val Ser Val Leu Arg Ile Ala Arg Thr Pro Ser
 180 185 190
 Val Asn Ile Gly Cys Cys Ile Glu Asn Val Leu Gln Gln Asn Leu
 195 200 205
 Thr Val Gly Ser Gln Thr Gly Asn Asp Ile Gly Glu Arg Asp Lys Ile
 210 215 220
 Thr Glu Asn Pro Val Ser Thr Gly Glu Lys Asn Ala Ala Thr
 225 230 235

5 <210> 132
 <211> 238
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 10 <220>
 <223> ECD de ICOSL v24

 10 <400> 132
 Asp Thr Gln Glu Lys Glu Val Arg Ala Met Val Gly Ser Asp Val Glu
 1 5 10 15
 Leu Ser Cys Ala Cys Pro Glu Gly Ser Arg Phe Asp Leu Asn Asp Val
 20 25 30
 Tyr Val Tyr Trp Gln Thr Ser Glu Ser Lys Thr Val Val Thr Tyr His
 35 40 45
 Ile Pro Gln Lys Ser Ser Leu Glu Asn Val Asp Ser Arg Tyr Arg Asn
 50 55 60
 Arg Ala Leu Met Ser Pro Ala Gly Met Leu Arg Gly Asp Phe Ser Leu
 65 70 75 80
 Arg Leu Phe Asn Val Thr Pro Gln Asp Glu Gln Lys Phe His Cys Leu
 85 90 95
 Val Leu Ser Gln Ser Leu Gly Phe Gln Glu Val Leu Ser Val Glu Val
 100 105 110
 Thr Leu His Val Ala Ala Asn Phe Ser Val Pro Val Val Ser Ala Pro
 115 120 125
 His Ser Pro Ser Gln Asp Glu Leu Thr Phe Thr Cys Thr Ser Ile Asn
 130 135 140
 Gly Tyr Pro Arg Pro Asn Val Tyr Trp Ile Asn Lys Thr Asp Asn Ser
 145 150 155 160
 Leu Leu Asp Gln Ala Leu Gln Asn Asp Thr Val Phe Leu Asn Met Arg
 165 170 175
 Gly Leu Tyr Asp Val Val Ser Val Leu Arg Ile Ala Arg Thr Pro Ser
 180 185 190
 Val Asn Ile Gly Cys Cys Ile Glu Asn Val Leu Leu Gln Gln Asn Pro
 195 200 205
 Thr Val Gly Ser Gln Thr Gly Asn Asp Ile Gly Glu Arg Asp Lys Ile
 210 215 220
 Thr Glu Asn Pro Val Ser Thr Gly Glu Lys Asn Ala Ala Thr
 225 230 235

15 <210> 133
 <211> 238
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 20 <220>
 <223> ECD de ICOSL v25
 <400> 133

Asp Thr Gln Glu Lys Glu Val Arg Ala Met Val Gly Ser Asp Val Glu
 1 5 10 15
 Leu Ser Cys Ala Cys Pro Glu Gly Ser Arg Phe Asp Leu Asn Asp Val
 20 25 30
 Tyr Val Tyr Trp Gln Thr Ser Glu Ser Lys Thr Val Val Thr Tyr His
 35 40 45
 Ile Pro Gln Ser Ser Ser Leu Glu Asn Val Asp Ser Arg Tyr Arg Asn
 50 55 60
 Arg Ala Leu Met Ser Pro Ala Gly Met Leu Arg Gly Asp Phe Ser Leu
 65 70 75 80
 Arg Leu Phe Asn Val Thr Pro Gln Asp Glu Gln Lys Phe His Cys Leu
 85 90 95
 Val Leu Ser Gln Ser Leu Gly Phe Gln Glu Val Leu Ser Val Glu Val
 100 105 110
 Thr Leu His Val Ala Ala Asn Phe Ser Val Pro Val Val Ser Ala Pro
 115 120 125
 His Ser Pro Ser Gln Asp Glu Leu Thr Phe Thr Cys Thr Ser Ile Asn
 130 135 140
 Gly Tyr Pro Arg Pro Asn Val His Trp Ile Asn Lys Thr Asp Asn Ser
 145 150 155 160
 Leu Leu Asp Gln Ala Leu Gln Asn Asp Thr Val Phe Leu Asn Met Arg
 165 170 175
 Gly Leu Tyr Asp Val Val Ser Val Leu Arg Ile Ala Arg Thr Pro Ser
 180 185 190
 Val Asn Ile Gly Cys Cys Ile Glu Asn Val Leu Leu Gln Gln Asn Leu
 195 200 205
 Thr Val Gly Ser Gln Thr Gly Asn Asp Ile Gly Glu Arg Asp Lys Ile
 210 215 220
 Thr Glu Asn Pro Val Ser Thr Gly Glu Lys Asn Ala Ala Thr
 225 230 235

<210> 134

<211> 238

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> ECD de ICOSL v26

10

<400> 134

Asp Thr Gln Glu Lys Glu Val Arg Ala Met Val Gly Ser Asp Val Glu
 1 5 10 15
 Leu Ser Cys Ala Cys Pro Glu Gly Ser Arg Phe Asp Leu Asn Asp Val
 20 25 30
 Tyr Val Tyr Trp Gln Thr Ser Glu Ser Lys Thr Val Val Thr Tyr His
 35 40 45
 Ile Pro Gln Asp Ser Ser Ser Leu Glu Asn Val Asp Ser Arg Tyr Arg Asn
 50 55 60
 Arg Ala Leu Met Ser Pro Ala Gly Met Leu Arg Gly Asp Phe Ser Leu
 65 70 75 80
 Arg Leu Phe Asn Val Thr Pro Gln Asp Glu Gln Lys Phe His Cys Leu
 85 90 95
 Val Leu Ser Gln Ser Leu Gly Phe Gln Glu Val Leu Ser Val Glu Val
 100 105 110
 Thr Leu His Val Ala Ala Asn Phe Ser Val Pro Val Val Ser Ala Pro
 115 120 125
 His Ser Pro Ser Gln Asp Glu Leu Thr Phe Thr Cys Thr Ser Ile Asn
 130 135 140
 Gly Tyr Pro Arg Pro Asn Ala Tyr Trp Ile Asn Lys Thr Asp Asn Ser
 145 150 155 160
 Leu Leu Asp Gln Ala Leu Gln Asn Asp Thr Val Phe Leu Asn Met Arg
 165 170 175
 Gly Leu Tyr Asp Val Val Ser Val Leu Arg Ile Ala Arg Thr Pro Ser
 180 185 190
 Val Asn Ile Gly Cys Cys Ile Glu Asn Val Leu Leu Gln Gln Asn Leu
 195 200 205
 Thr Val Gly Ser Gln Thr Gly Asn Asp Ile Gly Glu Arg Asp Lys Ile
 210 215 220
 Thr Glu Asn Pro Val Ser Thr Gly Glu Lys Asn Ala Ala Thr
 225 230 235

5 <210> 135
 <211> 238
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 10 <220>
 <223> ECD de ICOSL v27

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

15 <210> 136
 <211> 238
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 20 <220>
 <223> ECD de ICOSL v28

 20 <400> 136
 Asp Thr Gln Glu Lys Glu Val Arg Ala Met Val Gly Ser Asp Val Glu

1	5	10	15
Leu Ser Cys Ala Cys Pro Glu Gly Ser Arg Phe Asp Leu Asn Asp Val			
20	25	30	
Tyr Val Tyr Trp Gln Thr Ser Glu Ser Lys Thr Val Val Thr Tyr His			
35	40	45	
Ile Pro Gln Ser Ser Ser Leu Glu Asn Val Asp Ser Arg Tyr Arg Asn			
50	55	60	
Arg Ala Leu Met Ser Pro Ala Gly Met Leu Arg Gly Asp Phe Ser Pro			
65	70	75	80
Arg Leu Phe Asn Val Thr Pro Gln Asp Glu Gln Lys Phe His Cys Leu			
85	90	95	
Val Leu Ser Gln Ser Leu Gly Phe Gln Glu Val Leu Ser Val Glu Val			
100	105	110	
Thr Leu His Val Ala Ala Asn Phe Ser Val Pro Val Val Ser Ala Pro			
115	120	125	
His Ser Pro Ser Gln Asp Glu Leu Thr Phe Thr Cys Thr Ser Ile Asn			
130	135	140	
Gly Tyr Pro Arg Pro Asn Val Tyr Trp Ile Asn Lys Thr Asp Asn Ser			
145	150	155	160
Leu Leu Asp Gln Ala Leu Gln Asn Asp Thr Val Phe Leu Asn Met Arg			
165	170	175	
Gly Leu Tyr Asp Val Val Ser Val Leu Arg Ile Ala Arg Thr Pro Ser			
180	185	190	
Val Asn Ile Gly Cys Cys Ile Glu Asn Val Leu Leu Gln Gln Asn Leu			
195	200	205	
Thr Val Gly Ser Gln Thr Gly Asn Asp Ile Gly Glu Arg Asp Lys Ile			
210	215	220	
Thr Glu Asn Pro Val Ser Thr Gly Glu Lys Asn Ala Ala Thr			
225	230	235	

<210> 137

<211> 238

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> ECD de ICOSL v29

10

<400> 137

Asp Thr Gln Glu Lys Glu Val Arg Ala Met Val Gly Ser Asp Val Glu			
1	5	10	15
Leu Ser Cys Ala Cys Pro Glu Gly Ser Arg Phe Asp Leu Asn Asp Val			
20	25	30	
Tyr Val Tyr Trp Gln Thr Ser Glu Ser Lys Thr Val Val Thr Tyr His			
35	40	45	
Ile Pro Gln Asn Ser Ser Leu Glu Asn Val Asp Ser Arg Tyr Arg Asn			
50	55	60	
Arg Ala Leu Met Ser Pro Ala Gly Met Leu Arg Gly Asp Phe Ser Leu			
65	70	75	80
Arg Leu Phe Asn Val Thr Pro Gln Asp Glu Gln Lys Phe His Cys Leu			
85	90	95	
Val Leu Ser Gln Ser Leu Gly Phe Gln Glu Val Leu Ser Val Glu Val			
100	105	110	
Thr Leu His Val Ala Ala Asn Ser Ser Val Pro Val Val Ser Ala Pro			
115	120	125	
His Ser Pro Ser Gln Asp Glu Leu Thr Phe Thr Cys Thr Ser Ile Asn			
130	135	140	
Gly Tyr Pro Arg Pro Asn Val His Trp Ile Asn Lys Thr Asp Asn Ser			
145	150	155	160
Leu Leu Asp Gln Ala Leu Gln Asn Asp Thr Val Phe Leu Asn Met Arg			
165	170	175	
Gly Leu Tyr Asp Val Val Ser Val Leu Arg Ile Ala Arg Thr Pro Ser			
180	185	190	
Val Asn Ile Gly Cys Cys Ile Glu Ser Val Leu Leu Gln Gln Asn Leu			
195	200	205	
Thr Val Gly Ser Gln Thr Gly Asn Asp Ile Gly Glu Arg Asp Lys Ile			
210	215	220	
Thr Glu Asn Pro Val Ser Thr Gly Glu Lys Asn Ala Ala Thr			
225	230	235	

15 <210> 138

<211> 238
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> ECD de ICOSL v30

<400> 138
 Asp Thr Gln Glu Lys Glu Val Arg Ala Met Val Gly Ser Asp Val Glu
 1 5 10 15
 Leu Ser Cys Ala Cys Pro Glu Gly Ser Arg Phe Asp Leu Asn Asp Val
 20 25 30
 Tyr Val Tyr Trp Gln Thr Ser Glu Ser Lys Thr Val Val Thr Tyr His
 35 40 45
 Ile Pro Gln Ser Ser Ser Leu Glu Asn Val Asp Ser Arg Tyr Arg Asn
 50 55 60
 Arg Ala Leu Met Ser Pro Ala Gly Met Leu Gln Gly Asp Phe Ser Leu
 65 70 75 80
 Arg Leu Phe Asn Val Thr Pro Gln Asp Glu Gln Lys Phe His Cys Leu
 85 90 95
 Val Leu Ser Gln Ser Leu Gly Phe Gln Glu Val Leu Ser Val Glu Val
 100 105 110
 Thr Leu His Val Ala Ala Asn Phe Ser Val Pro Val Val Ser Ala Pro
 115 120 125
 His Ser Pro Ser Gln Asp Glu Leu Thr Phe Thr Cys Thr Ser Ile Asn
 130 135 140
 Gly Tyr Pro Arg Pro Asn Val Tyr Trp Ile Asn Lys Thr Asp Asn Ser
 145 150 155 160
 Leu Leu Asp Gln Ala Leu Gln Asn Asp Thr Val Phe Leu Asn Met Arg
 165 170 175
 Gly Leu Tyr Asp Val Val Ser Val Leu Arg Ile Ala Arg Thr Pro Ser
 180 185 190
 Val Asn Ile Gly Cys Cys Ile Glu Asn Val Pro Leu Gln Gln Asn Leu
 195 200 205
 Thr Val Gly Ser Gln Thr Gly Asn Asp Ile Gly Glu Arg Asp Lys Ile
 210 215 220
 Thr Glu Asn Pro Val Ser Thr Gly Glu Lys Asn Ala Ala Thr
 225 230 235

10 <210> 139
 <211> 238
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> ECD de ICOSL v31

<400> 139
 Asp Thr Gln Glu Lys Glu Val Arg Ala Met Val Gly Ser Asp Val Glu
 1 5 10 15
 Leu Ser Cys Ala Cys Pro Glu Gly Ser Arg Phe Asp Leu Asn Asp Val
 20 25 30

Tyr Val Tyr Trp Gln Thr Ser Glu Ser Lys Thr Val Val Thr Tyr His
 35 40 45
 Ile Pro Gln Ser Ser Ser Leu Glu Asn Val Asp Ser Arg Tyr Arg Asn
 50 55 60
 Arg Ala Leu Met Ser Pro Ala Gly Met Leu Arg Gly Asp Phe Ser Leu
 65 70 75 80
 Arg Leu Phe Asn Val Thr Pro Gln Asp Glu Gln Lys Phe His Cys Leu
 85 90 95
 Val Leu Ser Gln Ser Leu Gly Phe Gln Glu Val Leu Ser Val Glu Val
 100 105 110
 Thr Leu His Val Ala Ala Asn Phe Ser Val Pro Val Val Ser Ala Pro
 115 120 125
 His Ser Pro Ser Gln Asp Glu Leu Thr Phe Thr Cys Thr Ser Ile Asn
 130 135 140
 Gly Tyr Pro Arg Pro Asn Val Tyr Trp Ile Asn Lys Thr Gly Asn Ser
 145 150 155 160
 Leu Leu Asp Gln Ala Leu Gln Asn Asp Thr Val Phe Leu Asn Met Arg
 165 170 175
 Gly Leu Tyr Asp Val Val Ser Val Leu Arg Ile Ala Arg Thr Pro Ser
 180 185 190
 Val Asn Ile Gly Cys Cys Ile Glu Asn Val Leu Leu Gln Gln Asn Leu
 195 200 205
 Thr Val Gly Ser Gln Thr Gly Asn Asp Ile Gly Glu Arg Asp Lys Ile
 210 215 220
 Thr Glu Asn Pro Val Ser Thr Gly Glu Lys Asn Ala Ala Thr
 225 230 235

<210> 140

<211> 238

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> ECD de ICOSL v32

10

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

Thr Val Gly Ser Gln Thr Gly Asn Asp Ile Gly Glu Arg Asp Lys Ile
 210 215 220
 Thr Glu Asn Pro Val Ser Thr Gly Glu Lys Asn Ala Ala Thr
 225 230 235

15

<210> 141

<211> 238

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> ECD de ICOSL v33

5

<400> 141

Asp	Thr	Gln	Glu	Lys	Glu	Val	Arg	Ala	Met	Val	Gly	Ser	Asp	Val	Glu
1			5			10					15				
Leu	Ser	Cys	Ala	Cys	Pro	Glu	Gly	Ser	Arg	Phe	Asp	Leu	Asn	Asp	Val
			20			25					30				
Tyr	Val	Tyr	Trp	Gln	Thr	Ser	Glu	Ser	Lys	Thr	Val	Val	Thr	Tyr	His
	35				40					45					
Ile	Pro	Gln	Ser	Ser	Ser	Leu	Glu	Tyr	Val	Asp	Ser	Arg	Tyr	Arg	Asn
	50					55				60					
Arg	Ala	Leu	Met	Ser	Pro	Ala	Gly	Met	Leu	Arg	Gly	Asp	Phe	Ser	Leu
65						70			75			80			
Arg	Leu	Phe	Asn	Val	Thr	Pro	Gln	Asp	Glu	Gln	Lys	Phe	Asp	Cys	Phe
		85					90				95				
Val	Phe	Ser	Arg	Ser	Leu	Gly	Phe	Gln	Glu	Val	Leu	Ser	Val	Glu	Val
	100					105				110					
Thr	Leu	His	Val	Ala	Ala	Asn	Phe	Ser	Val	Pro	Val	Val	Ser	Ala	Pro
	115					120				125					
His	Ser	Pro	Ser	Gln	Asp	Glu	Leu	Thr	Phe	Thr	Cys	Thr	Ser	Ile	Asn
	130					135			140						
Gly	Tyr	Pro	Arg	Pro	Asn	Val	Tyr	Trp	Ile	Asn	Lys	Thr	Asp	Asn	Ser
145						150			155			160			
Leu	Leu	Asp	Gln	Ala	Leu	Gln	Asn	Asp	Thr	Val	Phe	Leu	Asn	Met	Arg
	165					170			175						
Gly	Leu	Tyr	Asp	Val	Val	Ser	Val	Leu	Arg	Ile	Ala	Arg	Thr	Pro	Ser
	180					185			190						
Val	Asn	Ile	Gly	Cys	Cys	Ile	Glu	Asn	Val	Leu	Leu	Gln	Gln	Asn	Leu
	195					200			205						
Thr	Val	Gly	Ser	Gln	Thr	Gly	Asn	Asp	Ile	Gly	Glu	Arg	Asp	Lys	Ile
210						215			220						
Thr	Glu	Asn	Pro	Val	Ser	Thr	Gly	Glu	Lys	Asn	Ala	Ala	Thr		
225						230			235						

<210> 142

10 <211> 238

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> ECD de ICOSL v34

<400> 142

Asp	Thr	Gln	Glu	Lys	Glu	Val	Arg	Ala	Met	Val	Gly	Ser	Asp	Val	Glu
1			5			10					15				
Leu	Ser	Cys	Ala	Cys	Pro	Glu	Gly	Ser	Arg	Phe	Asp	Leu	Asn	Asp	Val
			20			25				30					
Tyr	Val	Tyr	Trp	Gln	Thr	Ser	Glu	Ser	Lys	Thr	Val	Val	Thr	Tyr	His
	35				40				45						
Ile	Pro	Gln	Ser	Ser	Ser	Leu	Glu	Tyr	Val	Asp	Ser	Arg	Tyr	Arg	Asn

50	55	60
Arg Ala Leu Met Ser Pro Ala Gly Met Leu Arg Gly Asp Phe Ser Leu		
65	70	75
Arg Leu Phe Asn Val Thr Pro Gln Asp Glu Gln Lys Phe Asp Cys Phe		80
85	90	95
Val Phe Ser Arg Ser Leu Glu Phe Gln Glu Val Leu Ser Val Glu Val		
100	105	110
Thr Leu His Val Ala Ala Asn Ser Ser Val Pro Val Val Ser Ala Pro		
115	120	125
His Ser Pro Ser Gln Asp Glu Leu Thr Phe Thr Cys Thr Ser Ile Asn		
130	135	140
Gly Tyr Pro Arg Pro Asn Val Tyr Trp Ile Asn Lys Thr Asp Asn Ser		
145	150	155
Leu Leu Asp Gln Ala Leu Gln Asn Asp Thr Val Phe Leu Asn Met Arg		160
165	170	175
Gly Leu Tyr Asp Val Val Ser Val Leu Arg Ile Ala Arg Thr Pro Ser		
180	185	190
Val Asn Ile Gly Cys Cys Ile Glu Asn Val Leu Leu Gln Gln Asn Leu		
195	200	205
Thr Val Gly Ser Gln Thr Gly Asn Asp Ile Gly Glu Arg Asp Lys Ile		
210	215	220
Thr Glu Asn Pro Val Ser Thr Gly Glu Lys Asn Ala Ala Thr		
225	230	235

<210> 143

<211> 117

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> ECD de NKp30 v1

10

<400> 143

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

<210> 144

15 <211> 117

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

20 <223> ECD de NKp30 v2

<400> 144

Leu Trp Val Ser Gln Pro Pro Glu Ile Arg Thr Leu Glu Gly Ser Ser		
1	5	10
15		

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

<210> 145

<211> 117

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> ECD de NKp30 v3

10

<400> 145

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

<210> 146

15 <211> 117

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

20 <223> ECD de NKp30 v4

<400> 146

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

<210> 147

<211> 117

<212> PRT
 <213> Homo sapiens

5 <220>
 <223> ECD de NKp30 v5

<400> 147
 Leu Trp Val Ser Gln Pro Pro Glu Ile Arg Thr Leu Glu Gly Ser Ser
 1 5 10 15
 Ala Phe Leu Pro Cys Ser Phe Asn Ala Ser Gln Gly Arg Leu Ala Ile
 20 25 30
 Gly Ser Val Thr Trp Phe Arg Asp Glu Val Val Pro Gly Lys Glu Val
 35 40 45
 Arg Asn Gly Thr Pro Glu Phe Arg Gly Arg Leu Ala Pro Leu Ala Ser
 50 55 60
 Ser Arg Phe Leu His Asp His Gln Ala Glu Leu His Ile Arg Asp Val
 65 70 75 80
 Arg Gly His Asp Ala Gly Ile Tyr Val Cys Arg Val Glu Val Leu Gly
 85 90 95
 Leu Gly Val Gly Thr Gly Asn Gly Thr Arg Leu Val Val Glu Lys Glu
 100 105 110
 His Pro Gln Leu Gly
 115

10 <210> 148
 <211> 224
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> ECD de CD86 v1

<400> 148
 Ala Pro Leu Lys Ile Gln Ala Tyr Phe Asn Glu Thr Ala Asp Leu Pro
 1 5 10 15
 Cys Gln Phe Ala Asn Ser Gln Asn Gln Ser Leu Ser Glu Leu Val Val
 20 25 30
 Phe Trp His Asp Gln Glu Asn Leu Val Leu Asn Glu Val Tyr Leu Gly
 35 40 45
 Lys Glu Lys Phe Asp Ser Val His Ser Lys Tyr Met Gly Arg Thr Ser
 50 55 60
 Phe Asp Ser Asp Ser Trp Thr Leu Arg Leu His Asn Leu Gln Ile Lys
 65 70 75 80
 Asp Lys Gly Leu Tyr Gln Cys Ile Ile Leu His Lys Lys Pro Thr Gly
 85 90 95
 Met Ile Arg Ile His His Met Asn Ser Glu Leu Ser Val Leu Ala Asn
 100 105 110
 Phe Ser Gln Pro Glu Ile Val Pro Ile Ser Asn Ile Thr Glu Asn Val
 115 120 125
 Tyr Ile Asn Leu Thr Cys Ser Ser Ile His Gly Tyr Pro Glu Pro Lys
 130 135 140
 Lys Met Ser Val Leu Leu Arg Thr Lys Asn Ser Thr Ile Glu Tyr Asp
 145 150 155 160

20 <210> 149
 <211> 224
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

Gly Val Met Gln Lys Ser Gln Asp Asn Val Thr Glu Leu Tyr Asp Val
 165 170 175
 Ser Ile Ser Leu Ser Val Ser Phe Pro Asp Val Thr Ser Asn Met Thr
 180 185 190
 Ile Phe Cys Ile Leu Glu Thr Asp Lys Thr Arg Leu Leu Ser Ser Pro
 195 200 205
 Phe Ser Ile Glu Leu Glu Asp Pro Gln Pro Pro Pro Asp His Ile Pro
 210 215 220

25 <220>
 <223> ECD de CD86 v2

<400> 149

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

5 <210> 150
 <211> 224
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> ECD de CD86 v3

<400> 150

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

<210> 151
 <211> 224

<212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> ECD de CD86 v4

<400> 151
 Ala Pro Leu Lys Ile Gln Ala Tyr Phe Asn Glu Thr Ala Asp Leu Pro
 1 5 10 15
 Cys Gln Phe Ala Asn Ser Gln Asn Gln Ser Leu Ser Glu Leu Val Val
 20 25 30
 Phe Trp Gln Asp Gln Glu Asn Leu Val Leu Asn Glu Val Tyr Leu Gly
 35 40 45
 Lys Glu Lys Phe Asp Ser Val His Ser Lys Tyr Met Gly Arg Thr Ser
 50 55 60
 Phe Asp Ser Asp Ser Trp Thr Leu Arg Leu His Asn Leu Gln Ile Lys
 65 70 75 80
 Asp Lys Gly Leu Tyr Gln Cys Ile Ile His His Lys Lys Pro Thr Gly
 85 90 95
 Met Ile Arg Ile His His Met Asn Ser Glu Leu Ser Val Leu Ala Asn
 100 105 110
 Phe Ser Gln Pro Glu Ile Val Pro Ile Ser Asn Ile Thr Glu Asn Val
 115 120 125
 Tyr Ile Asn Leu Thr Cys Ser Ser Ile His Gly Tyr Pro Glu Pro Lys
 130 135 140
 Lys Met Ser Val Leu Leu Arg Thr Lys Asn Ser Thr Ile Glu Tyr Asp
 145 150 155 160
 Gly Val Met Gln Lys Ser Gln Asp Asn Val Thr Glu Leu Tyr Asp Val
 165 170 175
 Ser Ile Ser Leu Ser Val Ser Phe Pro Asp Val Thr Ser Asn Met Thr
 180 185 190
 Ile Phe Cys Ile Leu Glu Thr Asp Lys Thr Arg Leu Leu Ser Ser Pro
 195 200 205
 Phe Ser Ile Glu Leu Glu Asp Pro Gln Pro Pro Pro Asp His Ile Pro
 210 215 220

10 <210> 152
 <211> 101
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> IgV de CD80 WT

<400> 152
 Val Ile His Val Thr Lys Glu Val Lys Glu Val Ala Thr Leu Ser Cys
 1 5 10 15
 Gly His Asn Val Ser Val Glu Glu Leu Ala Gln Thr Arg Ile Tyr Trp
 20 25 30
 Gln Lys Glu Lys Lys Met Val Leu Thr Met Met Ser Gly Asp Met Asn
 35 40 45
 Ile Trp Pro Glu Tyr Lys Asn Arg Thr Ile Phe Asp Ile Thr Asn Asn
 50 55 60
 Leu Ser Ile Val Ile Leu Ala Leu Arg Pro Ser Asp Glu Gly Thr Tyr
 65 70 75 80
 Glu Cys Val Val Leu Lys Tyr Glu Lys Asp Ala Phe Lys Arg Glu His
 85 90 95
 Leu Ala Glu Val Thr
 100

20 <210> 153
 <211> 101
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> IgV de CD80 v1
 <400> 153

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

<210> 154

<211> 101

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> IgV de CD80 v4

10

<400> 154

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

15

<210> 155

<211> 101

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20

<220>

<223> IgV de CD80 v6

<400> 155

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

25

100

<210> 156

<211> 101

<212> PRT

30 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> IgV de CD80 v7

<400> 156
 Val Ile His Val Thr Lys Glu Val Lys Glu Val Ala Thr Leu Ser Cys
 1 5 10 15
 Gly His Asn Val Ser Val Glu Glu Leu Ala Gln Thr Arg Ile Tyr Trp
 20 25 30
 Gln Lys Glu Lys Lys Met Val Leu Thr Met Met Pro Gly Asp Met Asn
 35 40 45
 Ile Trp Pro Glu Tyr Lys Asn Arg Thr Ile Phe Asp Ile Thr Asn Asn
 50 55 60
 Leu Ser Ile Val Ile Gln Ala Leu Arg Pro Ser Asp Glu Gly Thr Tyr
 65 70 75 80
 Glu Cys Val Val Leu Lys Tyr Glu Lys Asp Gly Phe Lys Arg Glu His
 85 90 95
 Leu Ala Glu Val Thr
 100

5

<210> 157

<210> 101

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> IgV de CD80 v9

<400> 157

212-152

<210> 158
<211> 101

<211> 101
<212> PBT

<212> Tri

20 <213> Secuencia artificial

<220>

220 lg v de 0000 v10

25 <400> 158
Val Ile

<210> 159

<211> 101

30 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> IgV de CD80 v11

5

<400> 159

10

<210> 160

<211> 101

<211> PRT

<213> Secuencia artificial

15

<220>

<223> lgV

EEG 1980 V12

<400> 160
Val 11e

```

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

```

20

<210> 161

<211> 101

<212> PRT

25

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> IgV

120-121

Val Ille

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

5 <210> 162
 <211> 101
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> IgV de CD80 v14

10 <400> 162
 Val Ile His Val Thr Lys Glu Val Lys Glu Val Ala Thr Leu Ser Cys
 1 5 10 15
 Gly His Asn Val Ser Val Glu Glu Leu Ala Gln Thr Arg Ile Tyr Trp
 20 25 30
 Gln Lys Glu Lys Lys Met Val Leu Thr Met Met Ser Gly Asp Met Asn
 35 40 45
 Ile Trp Pro Glu Tyr Lys Asn Arg Thr Ile Phe Asp Ile Thr Ser Asn
 50 55 60
 Leu Ser Ile Val Ile Gln Ala Leu Arg Pro Ser Asp Glu Gly Thr Tyr
 65 70 75 80
 Glu Cys Val Val Leu Lys Tyr Glu Lys Asp Gly Phe Lys Arg Glu His
 85 90 95
 Leu Ala Glu Val Thr
 100

<210> 163
 <211> 101
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> IgV de CD80 v15

20 <400> 163
 Val Ile His Val Thr Lys Glu Val Lys Glu Val Ala Thr Leu Ser Cys
 1 5 10 15
 Gly His Asn Val Ser Val Glu Glu Leu Ala Gln Thr Arg Ile Tyr Trp
 20 25 30
 Gln Lys Glu Lys Lys Met Val Leu Thr Met Met Ser Gly Asp Met Asn
 35 40 45
 Ile Trp Pro Glu Tyr Lys Asn Arg Thr Ile Phe Asp Ile Thr Asn Asn
 50 55 60
 Leu Ser Thr Val Ile Gln Ala Leu Arg Pro Ser Asp Glu Gly Thr Tyr
 65 70 75 80
 Glu Cys Val Val Leu Lys Tyr Glu Lys Asp Gly Phe Lys Arg Glu His
 85 90 95
 Leu Ala Glu Val Thr
 100

25 <210> 164
 <211> 101
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> IgV de CD80 v16

<400> 164
 Val Ile His Val Thr Lys Glu Val Lys Glu Val Ala Thr Leu Ser Cys
 1 5 10 15
 Gly His Asn Val Ser Val Glu Glu Leu Ala Gln Thr Arg Ile Tyr Trp
 20 25 30
 Gln Lys Glu Lys Lys Met Val Leu Thr Met Met Ser Gly Asp Met Asn

	35	40	45
5	Ile Trp Pro Gly Tyr Lys Asn Arg Thr Ile Phe Asp Ile Thr Asn Asn		
	50	55	60
	Leu Ser Ile Val Ile Gln Ala Leu Arg Pro Ser Asp Glu Gly Thr Tyr		
	65	70	75
	Glu Cys Val Val Leu Lys Tyr Glu Lys Asp Gly Phe Lys Arg Glu His		
	85	90	95
10	Leu Ala Glu Val Thr		
	100		
	<210> 165		
	<211> 101		
	<212> PRT		
	<213> Secuencia artificial		
15	<220>		
	<223> IgV de CD80 v17		
20	<400> 165		
	Val Ile His Val Thr Lys Glu Val Lys Glu Val Ala Thr Leu Ser Cys		
	1	5	10
	Gly His Asn Val Ser Val Glu Glu Leu Ala Gln Thr Arg Ile Tyr Trp		
	20	25	30
	Gln Lys Glu Lys Glu Met Val Leu Thr Met Met Ser Gly Asp Met Asn		
	35	40	45
	Ile Trp Pro Glu Tyr Lys Asn Arg Thr Ile Ser Asp Ile Thr Asn Asn		
	50	55	60
	Leu Ser Ile Val Ile Gln Ala Leu Arg Pro Ser Asp Glu Gly Thr Tyr		
	65	70	75
	Glu Cys Val Val Leu Lys Tyr Glu Lys Asp Gly Phe Lys Arg Glu His		
	85	90	95
	Leu Ala Glu Val Thr		
	100		
25	<210> 166		
	<211> 101		
	<212> PRT		
	<213> Secuencia artificial		
30	<220>		
	<223> IgV de CD80 v19		
	<400> 166		
	Val Ile His Val Thr Lys Glu Val Lys Glu Val Ala Thr Leu Ser Cys		
	1	5	10
	Gly His Asn Val Ser Val Glu Glu Leu Ala Gln Thr Arg Ile Tyr Trp		
	20	25	30
	Gln Lys Glu Lys Lys Met Val Leu Thr Met Met Ser Gly Asp Met Asn		
	35	40	45
	Ile Trp Pro Glu Tyr Lys Asn Arg Thr Ile Phe Asp Ile Thr Asn Asn		
	50	55	60
	Leu Ser Ile Val Ile Leu Ala Leu Arg Pro Ser Asp Glu Gly Thr Tyr		
	65	70	75
	Glu Cys Val Val Leu Lys Tyr Glu Glu Asp Ala Phe Lys Arg Glu His		
	85	90	95
	Leu Ala Glu Val Thr		
	100		
35	<210> 167		
	<211> 101		
	<212> PRT		
	<213> Secuencia artificial		
40	<220>		
	<223> IgV de CD80 v21		
	<400> 167		

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

<210> 168

<211> 101

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> IgV de CD80 v22

10

<400> 168

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

<210> 169

15 <211> 101

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

20 <223> IgV de CD80 v23

<400> 169

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

<210> 170

<211> 101

25 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> IgV de CD80 v24

<400> 170
 Val Ile His Val Thr Lys Glu Val Lys Glu Val Ala Thr Leu Ser Cys
 1 5 10 15
 Gly His Asn Val Ser Val Glu Glu Leu Ala Gln Thr His Ile Tyr Trp
 20 25 30
 Gln Lys Glu Lys Lys Met Val Leu Thr Met Met Ser Gly Asp Met Asn
 35 40 45
 Ile Trp Pro Gly Tyr Lys Asn Arg Thr Ile Phe Asp Ile Thr Asn Asn
 50 55 60
 Leu Ser Ile Val Ile Arg Ala Leu Arg Pro Ser Asp Glu Gly Thr Tyr
 65 70 75 80
 Glu Cys Val Val Leu Lys Tyr Gly Lys Asp Gly Phe Lys Arg Glu His
 85 90 95
 Leu Ala Glu Val Thr
 100

5

<210> 171

<211> 101

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> IgV de CD80 v25

15 <400> 171

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

<210> 172

<211> 101

20 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>
 <223> IgV de CD80 v26

25

<400> 172

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

<210> 173

30 <211> 101

<212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> IgV de CD80 v27

<400> 173
 Val Ile His Val Thr Lys Glu Val Lys Glu Val Ala Thr Leu Ser Cys
 1 5 10 15
 Gly His Asn Val Ser Val Glu Glu Leu Ala Gln Thr Arg Ile Tyr Trp
 20 25 30
 Gln Lys Glu Lys Lys Met Val Leu Thr Met Met Ser Gly Asp Met Asn
 35 40 45
 Ile Trp Pro Glu Tyr Lys Asn Arg Thr Ile Phe Asp Ile Thr Asn Asn
 50 55 60
 Leu His Ile Val Ile Leu Ala Leu Arg Pro Ser Asp Glu Gly Thr Tyr
 65 70 75 80
 Glu Cys Val Val Leu Lys Tyr Glu Lys Gly Ala Phe Lys Arg Glu His
 85 90 95
 Leu Ala Glu Val Thr
 100

10 <210> 174
 <211> 101
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> IgV de CD80 v28

<400> 174
 Val Ile His Val Thr Lys Glu Val Lys Glu Val Ala Thr Leu Ser Cys
 1 5 10 15
 Gly His Asn Val Ser Val Glu Glu Leu Ala Gln Thr His Ile Tyr Trp
 20 25 30
 Gln Lys Glu Lys Lys Met Val Leu Thr Met Met Ser Gly Asp Met Asn
 35 40 45
 Ile Trp Pro Gly Tyr Lys Asn Arg Thr Ile Phe Asp Ile Thr Asn Asn
 50 55 60
 Leu Ser Ile Val Ile Leu Ala Leu Arg Pro Ser Asp Glu Gly Thr Tyr
 65 70 75 80
 Glu Cys Val Val Leu Lys Tyr Glu Lys Asp Ala Phe Lys Arg Glu His
 85 90 95
 Leu Ala Glu Val Thr
 100

20 <210> 175
 <211> 101
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> IgV de CD80 v30

25 <400> 175
 Val Ile His Val Thr Lys Glu Val Lys Glu Val Ala Thr Leu Ser Cys
 1 5 10 15
 Gly His Asn Val Ser Val Glu Glu Leu Ala Gln Thr Arg Ile Tyr Trp
 20 25 30
 Gln Lys Glu Lys Lys Met Val Leu Thr Met Met Ser Gly Asp Met Asn
 35 40 45
 Ile Trp Pro Glu Tyr Lys Asn Arg Thr Ile Phe Asp Ile Thr Asn Asn
 50 55 60
 Leu Ser Thr Val Ile Gln Ala Leu Arg Pro Ser Asp Glu Gly Thr Tyr
 65 70 75 80
 Glu Cys Val Val Leu Lys Tyr Glu Lys Asp Gly Phe Lys Arg Glu His
 85 90 95
 Leu Ala Glu Val Thr
 100

5 <210> 176
 <211> 101
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 10 <220>
 <223> IgV de CD80 v32

 10 <400> 176
 Val Ile His Val Thr Lys Glu Val Lys Glu Val Ala Thr Leu Ser Cys
 1 5 10 15
 Gly His Asn Val Ser Val Glu Glu Leu Ala Gln Thr Arg Ile Tyr Trp
 20 25 30
 Gln Lys Glu Lys Lys Val Val Leu Asp Met Ile Ser Gly Asp Met Asn
 35 40 45
 Ile Gly Pro Glu Tyr Lys Asn Arg Thr Ile Phe Asp Ile Thr Asn Asn
 50 55 60
 Leu Ser Ile Val Ile Leu Ala Leu Arg Pro Ser Gly Glu Gly Thr Tyr
 65 70 75 80
 Glu Cys Ala Val Leu Lys Tyr Glu Glu Asp Ala Phe Lys Arg Glu His
 85 90 95
 Leu Ala Glu Val Thr
 100

15 <210> 177
 <211> 101
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 15 <220>
 <223> IgV de CD80 v33

 20 <400> 177
 Val Ile His Val Thr Lys Glu Val Lys Glu Val Ala Thr Leu Ser Cys
 1 5 10 15
 Gly His Asn Val Ser Ala Glu Glu Leu Ala Gln Thr Arg Ile Tyr Trp
 20 25 30
 Gln Lys Glu Lys Lys Met Val Leu Thr Met Met Ser Gly Asp Met Asn
 35 40 45
 Ile Trp Pro Glu Tyr Lys Asn Arg Thr Ile Phe Asp Ile Thr Asn Asn
 50 55 60
 Leu Ser Ile Val Ile Gln Ala Leu Arg Pro Ser Asp Glu Gly Thr Tyr
 65 70 75 80
 Glu Cys Val Val Leu Lys Tyr Glu Lys Asp Ala Phe Lys Arg Glu His
 85 90 95
 Leu Ala Glu Val Thr
 100

25 <210> 178
 <211> 101
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 30 <220>
 <223> IgV de CD80 v34

 <400> 178

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

<210> 179

<211> 101

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> IgV de CD80 v35

10

<400> 179
 Val Ile His Val Thr Lys Glu Val Lys Glu Val Ala Thr Leu Ser Cys
 1 5 10 15
 Gly His Asn Val Ser Val Glu Glu Leu Ala Gln Thr Arg Ile Tyr Trp
 20 25 30
 Gln Lys Glu Lys Lys Met Val Leu Thr Met Met Ser Gly Asp Met Asn
 35 40 45
 Ile Trp Pro Glu Tyr Lys Asn Arg Thr Ile Phe Asp Ile Thr Asn Asn
 50 55 60

 Leu Ser Phe Val Ile Arg Ala Leu Arg Pro Ser Asp Glu Gly Thr Tyr
 65 70 75 80
 Glu Cys Val Val Leu Lys Tyr Gly Lys Asp Gly Phe Lys Arg Glu His
 85 90 95
 Leu Ala Glu Val Thr
 100

15

<210> 180

<211> 101

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20

<220>

<223> IgV de CD80 v36

<400> 180
 Val Ile His Val Thr Lys Glu Val Lys Glu Val Ala Thr Leu Ser Cys
 1 5 10 15
 Gly His Asn Val Ser Val Glu Gly Pro Ala Gln Thr Arg Ile Tyr Trp
 20 25 30
 Gln Lys Glu Lys Lys Met Val Leu Thr Met Met Ser Gly Asp Met Asn
 35 40 45
 Ile Trp Pro Glu Tyr Lys Asn Arg Thr Ile Phe Asp Ile Thr Asn Asn
 50 55 60
 Leu Ser Ile Val Ile Gln Ala Leu Arg Pro Ser Asp Glu Gly Thr Tyr
 65 70 75 80
 Glu Cys Val Val Leu Lys Tyr Glu Lys Asp Ala Phe Lys Arg Glu His
 85 90 95
 Leu Ala Glu Val Thr
 100

25

<210> 181

<211> 101

<212> PRT

30 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> IgV de CD80 v37

<400> 181
 Val Ile His Val Thr Lys Glu Val Lys Glu Val Ala Thr Leu Ser Cys
 1 5 10 15
 Gly His Asn Val Ser Val Glu Glu Leu Ala Gln Thr Arg Ile Tyr Trp
 20 25 30
 Gln Lys Glu Lys Lys Met Val Leu Thr Met Met Ser Gly Asp Met Asn
 35 40 45
 Ile Trp Pro Glu Tyr Lys Asn Arg Thr Ile Phe Asp Ile Thr Asn Asn
 50 55 60
 Leu Ser Ile Val Ile Leu Ala Leu Arg Pro Ser Asp Glu Gly Thr Tyr
 65 70 75 80
 Glu Cys Val Val Leu Lys Tyr Glu Lys Asp Gly Leu Lys Arg Glu His
 85 90 95
 Leu Ala Glu Val Thr
 100

5

<210> 182

<211> 101

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> IgV de CD80 v38

15 <400> 182

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

<210> 183

<211> 101

20 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> IgV de CD80 v40

25

<400> 183

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

<210> 184

30 <211> 101

<212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> IgV de CD80 v41

<400> 184
 Val Ile His Val Thr Lys Glu Val Lys Glu Val Ala Thr Leu Ser Cys
 1 5 10 15
 Gly His Asn Val Ser Val Glu Gly Leu Ala Gln Thr Asp Ile Leu Trp
 20 25 30
 His Lys Glu Gly Lys Ile Val Leu Ala Met Arg Ser Gly Asp Thr Asn
 35 40 45
 Ile Trp Pro Glu Tyr Lys Asn Arg Thr Ile Leu Asp Ile Thr Asn Asn
 50 55 60
 Leu Ser Ile Val Ile Leu Ala Leu Arg Pro Ser Asp Glu Gly Thr Tyr
 65 70 75 80
 Val Cys Val Val Arg Lys Tyr Glu Asn Asp Thr Pro Val Leu Glu Arg
 85 90 95
 Leu Ala Glu Val Thr
 10 100

15 <210> 185
 <211> 101
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> IgV de CD80 v43

20 <400> 185
 Val Ile His Val Thr Lys Glu Val Lys Glu Val Ala Thr Leu Ser Cys
 1 5 10 15
 Gly His Asn Val Ser Val Glu Glu Leu Ala Gln Thr Val Ile Tyr Trp
 20 25 30
 Gln Lys Glu Lys Lys Met Val Leu Thr Met Gln Ser Gly Asp Met Asn
 35 40 45
 Ile Trp Pro Glu Tyr Lys Asn Arg Thr Ile Phe Asp Ile Thr Asn Asn
 50 55 60
 Leu Ser Ile Val Ile Leu Ala Leu Arg Pro Ser Asp Glu Gly Thr Tyr
 65 70 75 80
 Arg Cys Val Val Ile Lys Tyr Glu Arg Leu Glu Asn Gln Gly Glu His
 85 90 95
 Leu Ala Glu Val Thr
 100

25 <210> 186
 <211> 101
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> IgV de CD80 v44

30 <400> 186

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

<210> 187
 <211> 101
 5 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <223> IgV de CD80 v45

10 <400> 187
 Val Ile His Val Thr Lys Glu Val Lys Glu Val Ala Thr Leu Ser Cys
 1 5 10 15
 Gly His Asn Val Ser Val Glu Glu Leu Ala Gln Thr Arg Ile Tyr Trp
 20 25 30
 Gln Lys Glu Lys Lys Met Val Leu Thr Met Met Ser Gly Asp Met Asn
 35 40 45
 Ile Trp Pro Glu Tyr Lys Asn Arg Thr Ile Phe Asp Ile Thr Asn Asn
 50 55 60
 Leu Ser Ile Val Ile Leu Ala Leu Arg Pro Ser Asp Glu Gly Thr Tyr
 65 70 75 80
 Glu Cys Val Val Leu Lys Tyr Glu Arg Lys Gly Tyr Arg Arg Glu His
 85 90 95
 Leu Ala Glu Val Thr
 100

15 <210> 188
 <211> 101
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> IgV de CD80 v47

<400> 188
 Val Ile His Val Thr Lys Glu Val Lys Glu Val Ala Thr Leu Ser Cys
 1 5 10 15
 Gly His Asn Val Ser Val Glu Glu Leu Ala Gln Thr Arg Ile Tyr Trp
 20 25 30
 Gln Lys Glu Gly Gln Ile Val Leu Thr Met Met Ser Gly Asp Met Asn
 35 40 45
 Ile Trp Pro Glu Tyr Lys Asn Arg Thr Ile Leu Asp Ile Thr Asn Asn
 50 55 60
 Leu Ser Ile Val Ile Leu Ala Leu Arg Pro Ser Asp Glu Gly Thr Tyr
 65 70 75 80
 Val Cys Val Val Arg Lys Tyr Glu Asn Asp Thr Pro Val Leu Glu His
 85 90 95
 Leu Ala Gly Val Thr
 100

25 <210> 189
 <211> 101
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30 <220>

<223> IgV de CD80 v48

<400> 189
 Val Ile His Val Thr Lys Glu Val Lys Glu Val Ala Thr Leu Ser Cys
 1 5 10 15
 Gly His Asn Val Ser Val Glu Glu Leu Ala Gln Thr Arg Ile Tyr Trp
 20 25 30
 Gln Lys Glu Lys Lys Met Val Leu Thr Met Met Ser Gly Asp Met Asn
 35 40 45
 Ile Trp Pro Glu Tyr Lys Asn Arg Thr Ile Phe Asp Ile Thr Asn Asn
 50 55 60
 Leu Ser Ile Val Ile Leu Ala Leu Arg Pro Ser Asp Glu Gly Thr Tyr
 65 70 75 80

5
 Glu Cys Val Val Leu Lys Tyr Asp Arg Lys Gly Tyr Arg Arg Glu His
 85 90 95
 Leu Ala Glu Val Thr
 100

<210> 190

<211> 101

10 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> IgV de CD80 v49

15 <400> 190
 Val Ile His Val Thr Lys Glu Val Lys Glu Val Ala Thr Leu Ser Cys
 1 5 10 15
 Gly His Asn Val Ser Val Glu Glu Leu Ala Gln Thr Arg Ile Tyr Trp
 20 25 30
 Gln Lys Glu Gly Gln Ile Val Met Thr Met Met Ser Gly Asp Met Asn
 35 40 45
 Ile Trp Pro Glu Tyr Lys Asn Arg Thr Ile Phe Asp Ile Thr Asn Asn
 50 55 60
 Leu Ser Ile Val Ile Leu Ala Leu Arg Pro Ser Asp Glu Gly Thr Tyr
 65 70 75 80
 Glu Cys Val Val Leu Lys Tyr Glu Lys Asp Ala Phe Lys Arg Glu His
 85 90 95
 Leu Ala Glu Val Thr
 100

<210> 191

20 <211> 101

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> IgV de CD80 v50

25

<400> 191
 Val Ile His Val Thr Lys Glu Val Lys Glu Val Ala Thr Leu Ser Cys
 1 5 10 15
 Gly His Asn Val Ser Val Glu Glu Leu Ala Gln Thr Arg Ile Tyr Trp
 20 25 30
 Gln Lys Glu Gly Lys Met Val Leu Thr Met Met Ser Gly Asp Met Asn
 35 40 45
 Ile Trp Pro Glu Tyr Lys Asn Arg Thr Ile Phe Asp Ile Thr Asn Asn
 50 55 60
 Leu Ser Ile Val Ile Leu Ala Leu Arg Pro Ser Asp Glu Gly Thr Tyr
 65 70 75 80
 Glu Cys Val Val Leu Lys Tyr Glu Lys Asp Ala Phe Lys Arg Glu His
 85 90 95
 Leu Ala Glu Val Thr
 100

<210> 192

30 <211> 101

<212> PRT

<213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> IgV de CD80 v51
 5 <400> 192
 Val Ile His Val Thr Lys Glu Val Lys Glu Val Ala Thr Leu Ser Cys
 1 5 10 15
 Gly His Asn Val Ser Val Glu Glu Leu Ala Gln Thr His Ile His Trp
 20 25 30
 Gln Lys Glu Lys Lys Met Val Leu Gly Met Met Ser Gly Asp Met Asn
 35 40 45
 Ile Trp Pro Glu Tyr Lys Asn Arg Thr Ile Phe Asp Ile Thr Asn Asn
 50 55 60
 Leu Ser Ile Val Ile Leu Ala Leu Arg Pro Ser Asp Glu Gly Thr Tyr
 65 70 75 80
 Glu Cys Val Val Leu Lys Asn Gly Glu Asn Gly Phe Lys Arg Glu His
 85 90 95
 Leu Ala Glu Val Thr
 100

10 <210> 193
 <211> 101
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> IgV de CD80 v52
 <400> 193
 Val Ile His Val Thr Lys Glu Val Lys Glu Val Thr Thr Leu Ser Cys
 1 5 10 15
 Gly Leu Asn Val Ser Val Glu Glu Leu Ala Gln Thr Arg Ile Tyr Trp
 20 25 30
 Gln Lys Glu Lys Lys Met Val Leu Thr Met Val Ser Gly Asp Met Asn
 35 40 45
 Ile Trp Pro Glu Tyr Lys Asn Arg Thr Ile Leu Asp Ile Thr Asn Asn
 50 55 60
 Leu Ser Ile Val Ile Leu Ala Leu Arg Pro Ser Asp Lys Gly Thr Tyr
 65 70 75 80
 Glu Cys Val Val Leu Lys Tyr Glu Lys Asp Ala Phe Lys Arg Glu His
 85 90 95
 Leu Ala Glu Val Thr
 100

20 <210> 194
 <211> 101
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> IgV de CD80 v53
 <400> 194
 Val Ile His Val Thr Lys Glu Val Lys Glu Val Ala Thr Leu Ser Cys
 1 5 10 15
 Gly His Asn Val Ser Val Glu Glu Leu Ala Gln Thr Val Ile Phe Trp
 20 25 30
 Gln Lys Glu Gly Lys Leu Val Leu Thr Met Gln Ser Gly Asp Met Asn
 35 40 45
 Ile Trp Pro Glu Tyr Lys Asn Arg Thr Ile Phe Asp Ile Thr Asn Asn
 50 55 60
 Leu Ser Ile Val Ile Leu Ala Leu Arg Pro Ser Asp Glu Gly Thr Tyr
 65 70 75 80
 Arg Cys Ile Val Ile Lys Tyr Glu Arg Leu Glu Asn Gln Gly Glu His

30 85 90 95
 Leu Ala Glu Val Thr
 100

5 <210> 195
 <211> 101
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 10 <220>
 <223> IgV de CD80 v54

 10 <400> 195
 Val Ile His Val Thr Lys Glu Val Lys Glu Val Ala Thr Leu Ser Cys
 1 5 10 15
 Gly His Asn Val Ser Val Glu Glu Leu Ala Gln Thr Arg Ile Tyr Trp
 20 25 30
 Gln Lys Glu Lys Lys Met Val Leu Thr Met Met Ser Gly Asp Met Asn
 35 40 45
 Ile Trp Pro Glu Tyr Lys Asn Arg Thr Ile Phe Asp Ile Thr Asn Asn
 50 55 60
 Leu Ser Ile Met Ile Pro Ala Pro Arg Pro Ser Asp Glu Gly Thr Tyr
 65 70 75 80
 Glu Cys Val Val Leu Glu Tyr Glu Lys Asp Ala Phe Lys Arg Glu His
 85 90 95
 Leu Ala Glu Val Thr
 100

 <210> 196
 <211> 111
 15 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> IgV de ICOSL WT
 20 <400> 196
 Asp Thr Gln Glu Lys Glu Val Arg Ala Met Val Gly Ser Asp Val Glu
 1 5 10 15
 Leu Ser Cys Ala Cys Pro Glu Gly Ser Arg Phe Asp Leu Asn Asp Val
 20 25 30
 Tyr Val Tyr Trp Gln Thr Ser Glu Ser Lys Thr Val Val Thr Tyr His
 35 40 45
 Ile Pro Gln Asn Ser Ser Leu Glu Asn Val Asp Ser Arg Tyr Arg Asn
 50 55 60
 Arg Ala Leu Met Ser Pro Ala Gly Met Leu Arg Gly Asp Phe Ser Leu
 65 70 75 80
 Arg Leu Phe Asn Val Thr Pro Gln Asp Glu Gln Lys Phe His Cys Leu
 85 90 95
 Val Leu Ser Gln Ser Leu Gly Phe Gln Glu Val Leu Ser Val Glu
 100 105 110

 <210> 197
 25 <211> 111
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 30 <223> IgV de ICOSL v1

 <400> 197

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

<210> 198

<211> 111

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> IgV de ICOSL v2

10

<400> 198

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

<210> 199

15 <211> 111

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

20 <223> IgV de ICOSL v3

<400> 199

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

Val Leu Ser Gln Ser Leu Gly Phe Gln Glu Val Leu Ser Val Glu

25 100 105 110

<210> 200

<211> 111

<212> PRT

30 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> IgV de ICOSL v4

<400> 200
 Asp Thr Gln Glu Lys Glu Val Arg Ala Met Val Gly Ser Asp Val Glu
 1 5 10 15
 Leu Ser Cys Ala Cys Pro Glu Gly Ser Arg Phe Asp Leu Asn Asp Val
 20 25 30
 Tyr Val Tyr Trp Gln Thr Ser Glu Ser Lys Thr Val Val Thr Tyr His
 35 40 45
 Ile Pro Gln Tyr Ser Ser Leu Glu Tyr Val Asp Ser Arg Tyr Arg Asn
 50 55 60
 Arg Ala Leu Met Ser Pro Ala Gly Met Leu Arg Gly Asp Phe Ser Leu
 65 70 75 80
 Arg Leu Phe Asn Val Thr Pro Gln Asp Glu Gln Lys Phe His Cys Leu
 85 90 95
 Val Leu Ser Gln Ser Leu Gly Phe Gln Glu Val Leu Ser Val Glu
 100 105 110

5

<210> 201

<211> 111

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> IgV de ICOSL v5

15 <400> 201

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

<210> 202

<211> 111

20 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> IgV de ICOSL v10

25

<400> 202

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

<210> 203

30 <211> 111

<212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> IgV de ICOSL v11

<400> 203
 Asp Thr Gln Glu Lys Glu Val Arg Ala Met Val Gly Ser Asp Val Glu
 1 5 10 15
 Leu Ser Cys Ala Cys Pro Glu Gly Ser Arg Phe Asp Leu Asn Asp Val
 20 25 30
 Tyr Val Tyr Trp Gln Thr Ser Glu Ser Lys Thr Val Val Thr Tyr His
 35 40 45
 Ile Pro Gln His Ser Ser Leu Glu Asn Val Asp Ser Arg Tyr Arg Asn
 50 55 60
 Arg Ala Leu Met Ser Pro Ala Gly Met Leu Arg Gly Asp Phe Ser Leu
 65 70 75 80
 Arg Leu Phe Asn Val Thr Pro Gln Asp Glu Gln Lys Phe His Cys Leu
 85 90 95
 Val Leu Gly Gln Ser Leu Gly Phe Gln Glu Val Leu Ser Val Glu
 100 105 110

10 <210> 204
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

15 <220>
 <223> IgV de ICOSL v12

<400> 204
 Asp Thr Gln Glu Lys Glu Val Arg Ala Met Val Gly Ser Asp Val Glu
 1 5 10 15
 Leu Ser Cys Ala Cys Pro Glu Gly Ser Arg Phe Asp Leu Asn Asp Val
 20 25 30
 Tyr Val Tyr Trp Gln Thr Ser Glu Ser Lys Thr Val Val Thr Tyr His
 35 40 45
 Ile Pro Gln Tyr Ser Ser Leu Glu Asn Val Asp Ser Arg Tyr Arg Asn
 50 55 60
 Arg Ala Leu Met Ser Pro Ala Gly Met Leu Arg Gly Asp Phe Ser Leu
 65 70 75 80
 Arg Leu Phe Asn Val Thr Pro Gln Asp Glu Gln Lys Phe His Cys Leu
 85 90 95
 Val Leu Ser Gln Ser Leu Gly Phe Gln Glu Val Leu Ser Val Glu

20 100 105 110

<210> 205
 <211> 111
 25 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> IgV de ICOSL v13
 30 <400> 205

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

<210> 206

<211> 111

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> IgV de ICOSL v14

10

<400> 206

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

<210> 207

15 <211> 111

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> IgV de ICOSL v22

20

<400> 207

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

25

<210> 208

<211> 111

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

30

<220>

<223> IgV de ICOSL v23

<400> 208

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

5

<210> 209

<211> 111

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> IgV de ICOSL v24

<400> 209

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

15

<210> 210

<211> 111

<212> PRT

20 <213> Homo sapiens

<220>

<223> IgV de ICOSL v28

25

<400> 210

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

30

<210> 211

<211> 111

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> IgV de ICOSL v30

5 <400> 211
 Asp Thr Gln Glu Lys Glu Val Arg Ala Met Val Gly Ser Asp Val Glu
 1 5 10 15
 Leu Ser Cys Ala Cys Pro Glu Gly Ser Arg Phe Asp Leu Asn Asp Val
 20 25 30
 Tyr Val Tyr Trp Gln Thr Ser Glu Ser Lys Thr Val Val Thr Tyr His
 35 40 45
 Ile Pro Gln Ser Ser Ser Leu Glu Asn Val Asp Ser Arg Tyr Arg Asn
 50 55 60
 Arg Ala Leu Met Ser Pro Ala Gly Met Leu Gln Gly Asp Phe Ser Leu
 65 70 75 80
 Arg Leu Phe Asn Val Thr Pro Gln Asp Glu Gln Lys Phe His Cys Leu
 85 90 95
 Val Leu Ser Gln Ser Leu Gly Phe Gln Glu Val Leu Ser Val Glu
 100 105 110

10 <210> 212
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15 <220>

<223> IgV de ICOSL v33

<400> 212
 Asp Thr Gln Glu Lys Glu Val Arg Ala Met Val Gly Ser Asp Val Glu
 1 5 10 15
 Leu Ser Cys Ala Cys Pro Glu Gly Ser Arg Phe Asp Leu Asn Asp Val
 20 25 30
 Tyr Val Tyr Trp Gln Thr Ser Glu Ser Lys Thr Val Val Thr Tyr His
 35 40 45
 Ile Pro Gln Ser Ser Ser Leu Glu Tyr Val Asp Ser Arg Tyr Arg Asn
 50 55 60
 Arg Ala Leu Met Ser Pro Ala Gly Met Leu Arg Gly Asp Phe Ser Leu
 65 70 75 80
 Arg Leu Phe Asn Val Thr Pro Gln Asp Glu Gln Lys Phe Asp Cys Phe
 85 90 95
 Val Phe Ser Arg Ser Leu Gly Phe Gln Glu Val Leu Ser Val Glu
 100 105 110

20 <210> 213
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> IgV de ICOSL v34

25 <400> 213
 Asp Thr Gln Glu Lys Glu Val Arg Ala Met Val Gly Ser Asp Val Glu
 1 5 10 15
 Leu Ser Cys Ala Cys Pro Glu Gly Ser Arg Phe Asp Leu Asn Asp Val
 20 25 30
 Tyr Val Tyr Trp Gln Thr Ser Glu Ser Lys Thr Val Val Thr Tyr His
 35 40 45
 Ile Pro Gln Ser Ser Ser Leu Glu Tyr Val Asp Ser Arg Tyr Arg Asn
 50 55 60
 Arg Ala Leu Met Ser Pro Ala Gly Met Leu Arg Gly Asp Phe Ser Leu
 65 70 75 80
 Arg Leu Phe Asn Val Thr Pro Gln Asp Glu Gln Lys Phe Asp Cys Phe
 85 90 95
 Val Phe Ser Arg Ser Leu Glu Phe Gln Glu Val Leu Ser Val Glu
 100 105 110

5 <210> 214
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 10 <220>
 <223> Similar a IgC de NKp30 WT

 10 <400> 214
 Leu Trp Val Ser Gln Pro Pro Glu Ile Arg Thr Leu Glu Gly Ser Ser
 1 5 10 15
 Ala Phe Leu Pro Cys Ser Phe Asn Ala Ser Gln Gly Arg Leu Ala Ile
 20 25 30
 Gly Ser Val Thr Trp Phe Arg Asp Glu Val Val Pro Gly Lys Glu Val
 35 40 45
 Arg Asn Gly Thr Pro Glu Phe Arg Gly Arg Leu Ala Pro Leu Ala Ser
 50 55 60
 Ser Arg Phe Leu His Asp His Gln Ala Glu Leu His Ile Arg Asp Val
 65 70 75 80
 Arg Gly His Asp Ala Ser Ile Tyr Val Cys Arg Val Glu Val Leu Gly
 85 90 95
 Leu Gly Val Gly Thr Gly Asn Gly Thr Arg Leu Val
 100 105

15 <210> 215
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

 20 <220>
 <223> Similar a IgC de NKp30 v1
 <400> 215
 Leu Trp Val Ser Gln Pro Pro Glu Ile Arg Thr Leu Glu Gly Ser Ser
 1 5 10 15
 Ala Phe Leu Pro Cys Ser Phe Asn Ala Ser Gln Gly Arg Val Ala Ile
 20 25 30
 Gly Ser Val Thr Trp Phe Arg Asp Glu Val Val Pro Gly Lys Glu Val
 35 40 45
 Arg Asn Gly Thr Pro Glu Phe Arg Gly Arg Leu Val Pro Leu Ala Pro
 50 55 60
 Ser Arg Phe Leu His Asp His Gln Ala Glu Leu His Ile Arg Asp Val
 65 70 75 80
 Arg Gly His Asp Ala Gly Ile Tyr Val Cys Arg Val Glu Val Leu Gly
 85 90 95
 Leu Gly Val Gly Thr Gly Asn Gly Thr Arg Leu Val
 100 105

25 <210> 216
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

 30 <220>
 <223> Similar a IgC de NKp30 v2
 <400> 216

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

<210> 217

<211> 108

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Similar a IgC de NKp30 v3

10

<400> 217

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

15

<210> 218

<211> 108

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20

<220>

<223> Similar a IgC de NKp30 v4

<400> 218

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

25

<210> 219

<211> 108

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

30

<220>

ES 2 870 991 T3

<223> Similar a IgC de NKp30 v5

<400> 219
 Leu Trp Val Ser Gln Pro Pro Glu Ile Arg Thr Leu Glu Gly Ser Ser
 1 5 10 15
 Ala Phe Leu Pro Cys Ser Phe Asn Ala Ser Gln Gly Arg Leu Ala Ile
 20 25 30
 Gly Ser Val Thr Trp Phe Arg Asp Glu Val Val Pro Gly Lys Glu Val
 35 40 45
 Arg Asn Gly Thr Pro Glu Phe Arg Gly Arg Leu Ala Pro Leu Ala Ser
 50 55 60
 Ser Arg Phe Leu His Asp His Gln Ala Glu Leu His Ile Arg Asp Val
 65 70 75 80
 Arg Gly His Asp Ala Gly Ile Tyr Val Cys Arg Val Glu Val Leu Gly
 85 90 95
 Leu Gly Val Gly Thr Gly Asn Gly Thr Arg Leu Val
 100 105

5

<210> 220

<211> 99

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> IgV de CD86 WT

<400> 220

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

15 Glu Leu Ser

<210> 221

<211> 99

<212> PRT

20 <213> *Homo sapiens*

<220>

<223> IgV de CD86 v1

25 <400> 221

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

Glu Leu Ser

<210> 222

<211> 99
<212> BB

30 <212> PRI
<213> Hom

<213> *Homo sapiens*

<220>
<223> IgV de CD86 v2

<400> 222
 Asn Glu Thr Ala Asp Leu Pro Cys Gln Phe Ala Asn Ser Gln Asn Gln
 1 5 10 15
 Ser Leu Ser Glu Leu Val Val Phe Trp His Asp Gln Glu Asn Leu Val
 5 20 25 30
 Leu Asn Glu Val Tyr Leu Gly Lys Glu Lys Phe Asp Ser Val His Ser
 35 40 45
 Lys Tyr Met Gly Arg Thr Ser Phe Asp Ser Asp Ser Trp Thr Leu Arg
 50 55 60
 Leu His Asn Leu Gln Ile Lys Asp Lys Gly Leu Tyr Gln Cys Ile Ile
 65 70 75 80
 His His Lys Lys Pro Thr Gly Met Ile Arg Ile His Gln Met Asn Ser
 85 90 95
 Glu Leu Ser

10 <210> 223
 <211> 99
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

15 <220>
 <223> IgV de CD86 v3

<400> 223
 Asn Glu Thr Ala Asp Leu Pro Cys Gln Phe Ala Asn Ser Gln Asn Gln
 1 5 10 15
 Ser Leu Ser Glu Leu Val Val Phe Trp Gln Asp Gln Glu Asn Leu Val
 20 25 30
 Leu Asn Glu Val Tyr Leu Gly Lys Glu Lys Phe Asp Ser Val His Ser
 35 40 45
 Lys Tyr Met Gly Arg Thr Ser Phe Asp Ser Asp Ser Trp Thr Leu Arg
 50 55 60
 Leu His Asn Leu Gln Ile Lys Asp Lys Gly Leu Tyr Gln Cys Ile Ile
 65 70 75 80
 Leu His Lys Lys Pro Thr Gly Met Ile Arg Ile His Gln Met Asn Ser
 85 90 95
 Glu Leu Ser

20 <210> 224
 <211> 99
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

25 <220>
 <223> IgV de CD86 v4

<400> 224
 Asn Glu Thr Ala Asp Leu Pro Cys Gln Phe Ala Asn Ser Gln Asn Gln
 1 5 10 15
 Ser Leu Ser Glu Leu Val Val Phe Trp Gln Asp Gln Glu Asn Leu Val
 20 25 30
 Leu Asn Glu Val Tyr Leu Gly Lys Glu Lys Phe Asp Ser Val His Ser
 35 40 45
 Lys Tyr Met Gly Arg Thr Ser Phe Asp Ser Asp Ser Trp Thr Leu Arg
 50 55 60
 Leu His Asn Leu Gln Ile Lys Asp Lys Gly Leu Tyr Gln Cys Ile Ile
 65 70 75 80
 His His Lys Lys Pro Thr Gly Met Ile Arg Ile His His Met Asn Ser
 85 90 95
 Glu Leu Ser

30 <210> 225
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
<223> péptido señal de VH

5 <400> 225
Met Gly Ser Thr Ala Ile Leu Ala Leu Leu Ala Val Leu Gln Gly
1 5 10 15
Val Ser Ala

<210> 226

<211> 232

10 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Fc de IgG1

15

<400> 226
Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
1 5 10 15
Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
20 25 30
Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
35 40 45
Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
50 55 60
Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
65 70 75 80
Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
85 90 95
Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
100 105 110
Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
115 120 125
Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr
130 135 140
Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
145 150 155 160
Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
165 170 175
Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
180 185 190
Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
195 200 205
Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
210 215 220
Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
225 230

<210> 227

20 <211> 235

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

25 <223> Fc de IgG2

<400> 227

Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro
 1 5 10 15
 Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro
 20 25 30
 Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr
 35 40 45
 Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn
 50 55 60
 Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg
 65 70 75 80
 Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val
 85 90 95
 Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser
 100 105 110
 Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys
 115 120 125
 Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu
 130 135 140
 Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe
 145 150 155 160
 Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
 165 170 175
 Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
 180 185 190
 Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
 195 200 205
 Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
 210 215 220
 Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 225 230 235
 <210> 228
 <211> 15
 <212> PRT
 5 <213> Homo sapiens
 <220>
 <223> enlazador IgV-IgV
 10 <400> 228
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser
 1 5 10 15
 <210> 229
 <211> 10
 15 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Enlazador 1 de IgV-Fc
 20 <400> 229
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser
 1 5 10
 <210> 230
 25 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 30 <223> Enlazador 2 de IgV-Fc
 <400> 230
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Ala Ala Ala
 1 5 10
 35 <210> 231
 <211> 15
 <212> PRT

5 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Enlazador 1 de CD80 WT
 10 <400> 231
 Lys Ala Asp Phe Pro Thr Pro Ser Ile Ser Asp Phe Glu Ile Pro
 1 5 10 15
 15 <210> 232
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 20 <220>
 <223> Enlazador 2 de CD80 WT
 <400> 232
 Thr Thr Lys Gln Glu His Phe Pro Asp Asn
 1 5 10
 25 <210> 233
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 30 <220>
 <223> Enlazador 1 de ICOSL WT
 <400> 233
 Val Thr Leu His Val Ala Ala Asn Phe Ser Val
 1 5 10
 35 <210> 234
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 40 <220>
 <223> Enlazador 2 de ICOSL WT
 <400> 234
 Val Gly Ser Gln Thr Gly Asn Asp Ile Gly Glu Arg Asp Lys Ile Thr
 1 5 10 15
 Glu Asn Pro Val Ser Thr Gly Glu Lys Asn Ala Ala Thr
 20 25
 45 <210> 235
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Enlazador 1 de NKp30 WT
 50 <400> 235
 Val Glu Lys Glu His Pro Gln Leu Gly
 1 5
 55 <210> 236
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 60 <220>
 <223> Enlazador 1 de CD86 WT

<400> 236
Ala Pro Leu Lys Ile Gln Ala Tyr Phe
1 5

5 <210> 237
<211> 18
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Enlazador 2 de CD86 WT

<400> 237
Val Leu Ala Asn Phe Ser Gln Pro Glu Ile Val Pro Ile Ser Asn Ile
1 5 10 15
Thr Glu

15 <210> 238
<211> 22
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> Enlazador 3 de CD86 WT

<400> 238
Arg Leu Leu Ser Ser Pro Phe Ser Ile Glu Leu Glu Asp Pro Gln Pro
1 5 10 15
Pro Pro Asp His Ile Pro
20

25 <210> 239
<211> 238
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

30 <220>
<223> ECD de ICOSL v35

<400> 239

Asp Thr Gln Glu Lys Glu Val Arg Ala Met Val Gly Ser Asp Val Glu
 1 5 10 15
 Leu Ser Cys Ala Cys Pro Glu Gly Ser Arg Phe Asp Leu Asn Asp Val
 20 25 30
 Tyr Val Tyr Trp Gln Thr Ser Glu Ser Lys Thr Val Val Thr Tyr His
 35 40 45
 Ile Pro Gln Ser Ser Ser Leu Glu Asn Val Asp Ser Arg Tyr Arg Asn
 50 55 60
 Arg Ala Leu Met Ser Pro Ala Gly Met Leu Arg Gly Asp Phe Ser Leu
 65 70 75 80
 Arg Leu Phe Asn Val Thr Pro Gln Asp Glu Gln Lys Phe His Cys Leu
 85 90 95
 Val Leu Ser Gln Ser Leu Glu Phe Glu Val Leu Ser Val Glu Val
 100 105 110
 Thr Leu His Val Ala Ala Asn Phe Ser Val Pro Val Val Ser Ala Pro
 115 120 125
 His Ser Pro Ser Gln Asp Glu Leu Thr Phe Thr Cys Thr Ser Ile Asn
 130 135 140
 Gly Tyr Pro Arg Pro Asn Val Tyr Trp Ile Asn Lys Thr Asp Asn Ser
 145 150 155 160
 Leu Leu Asp Gln Ala Leu Gln Asn Asp Thr Val Phe Leu Asn Met Arg
 165 170 175
 Gly Leu Tyr Asp Val Val Ser Val Leu Arg Ile Ala Arg Thr Pro Ser
 180 185 190
 Val Asn Ile Gly Cys Cys Ile Glu Asn Val Leu Leu Gln Gln Asn Leu
 195 200 205
 Thr Val Gly Ser Gln Thr Gly Asn Asp Ile Gly Glu Arg Asp Lys Ile
 210 215 220
 Thr Glu Asn Pro Val Ser Thr Gly Glu Lys Asn Ala Ala Thr
 225 230 235

<210> 240

<211> 111

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> IgV de ICOSL v35

10

<400> 240

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

REIVINDICACIONES

1. Una proteína inmunomoduladora, que comprende al menos un dominio de la superfamilia de inmunoglobulinas (IgSF) CD80 con afinidad modificada que comprende una o más sustituciones de aminoácidos en un dominio de IgSF CD80 de tipo salvaje, en donde el al menos un dominio de IgSF CD80 con afinidad modificada tiene una unión aumentada al menos a dos compañeros de unión afines en comparación con el dominio de IgSF CD80 de tipo salvaje, en donde el dominio de IgSF CD80 con afinidad modificada se une específicamente de manera no competitiva a los al menos dos compañeros de unión afines y los al menos dos compañeros de unión afines son CD28 y PD-L1, y en donde el dominio de IgSF CD80 con afinidad modificada comprende al menos un 85 % de identidad de secuencia con un dominio de IgSF CD80 de tipo salvaje o un fragmento de unión específico del mismo contenido en la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 1.
- 5 2. La proteína inmunomoduladora de la reivindicación 1, en donde el dominio de IgSF CD80 de tipo salvaje es un dominio IgV de tipo salvaje y/o el dominio de IgSF CD80 con afinidad modificada es un dominio IgV con afinidad modificada.
- 10 3. La proteína inmunomoduladora de cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en donde el al menos un dominio de IgSF CD80 con afinidad modificada comprende al menos una y no más de veinte sustituciones de aminoácidos en el dominio de IgSF CD80 de tipo salvaje.
- 15 4. La proteína inmunomoduladora de cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde el al menos un dominio de IgSF CD80 con afinidad modificada comprende al menos una y no más de diez sustituciones de aminoácidos en el dominio de IgSF CD80 de tipo salvaje.
- 20 5. La proteína inmunomoduladora de cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde el al menos un dominio de IgSF CD80 con afinidad modificada comprende al menos una y no más de cinco sustituciones de aminoácidos en el dominio de IgSF CD80 de tipo salvaje.
- 25 6. La proteína inmunomoduladora de cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en donde el dominio de IgSF CD80 con afinidad modificada tiene al menos un 120 % de la afinidad de unión como el dominio de IgSF CD80 de tipo salvaje a cada uno de los al menos dos compañeros de unión afines.
7. La proteína inmunomoduladora de cualquiera de las reivindicaciones 1-6, que comprende además un dominio de IgSF sin afinidad modificada.
- 30 8. La proteína inmunomoduladora de cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en donde la proteína inmunomoduladora es soluble, opcionalmente en donde la proteína inmunomoduladora está unida a un dominio de multimerización.
9. La proteína inmunomoduladora de cualquiera de las reivindicaciones 1-8 que está unida a un dominio Fc o una variante del mismo con función efectora reducida.
- 35 10. La proteína inmunomoduladora de la reivindicación 9, en donde el dominio Fc es un dominio de IgG1, un dominio de IgG2 o es una variante del mismo con función efectora reducida.
11. La proteína inmunomoduladora de la reivindicación 9 o la reivindicación 10, en donde el dominio Fc o variante del mismo comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 226 o SEQ ID NO: 227 o una secuencia de aminoácidos que exhibe al menos un 85 %, al menos un 90 %, o al menos un 95 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 226 o SEQ ID NO: 227.
- 35 12. La proteína inmunomoduladora de cualquiera de las reivindicaciones 8-11, en donde la proteína inmunomoduladora es un dímero.
13. Una molécula de ácido nucleico, que codifica la proteína inmunomoduladora de cualquiera de las reivindicaciones 1-11.
- 40 14. Un vector, que comprende la molécula de ácido nucleico de la reivindicación 13.
15. Una célula, que comprende el vector de la reivindicación 14.
16. Un método para producir una proteína inmunomoduladora, que comprende introducir la molécula de ácido nucleico de la reivindicación 13 o el vector de la reivindicación 14 en una célula huésped en condiciones para expresar la proteína inmunomoduladora en la célula huésped.
- 45 17. Una composición farmacéutica, que comprende la proteína inmunomoduladora de cualquiera de las reivindicaciones 1-12, que comprende opcionalmente un excipiente farmacéuticamente aceptable.
18. Una composición farmacéutica que comprende la proteína inmunomoduladora de cualquiera de las reivindicaciones 1-12 para su uso en un método de modular una respuesta inmune en un sujeto, opcionalmente en donde se aumenta la respuesta inmune.
- 50

19. La composición farmacéutica para su uso de la reivindicación 18, en donde la modulación de la respuesta inmune trata una enfermedad o afección en el sujeto, opcionalmente en donde la enfermedad o afección es un tumor o cáncer.

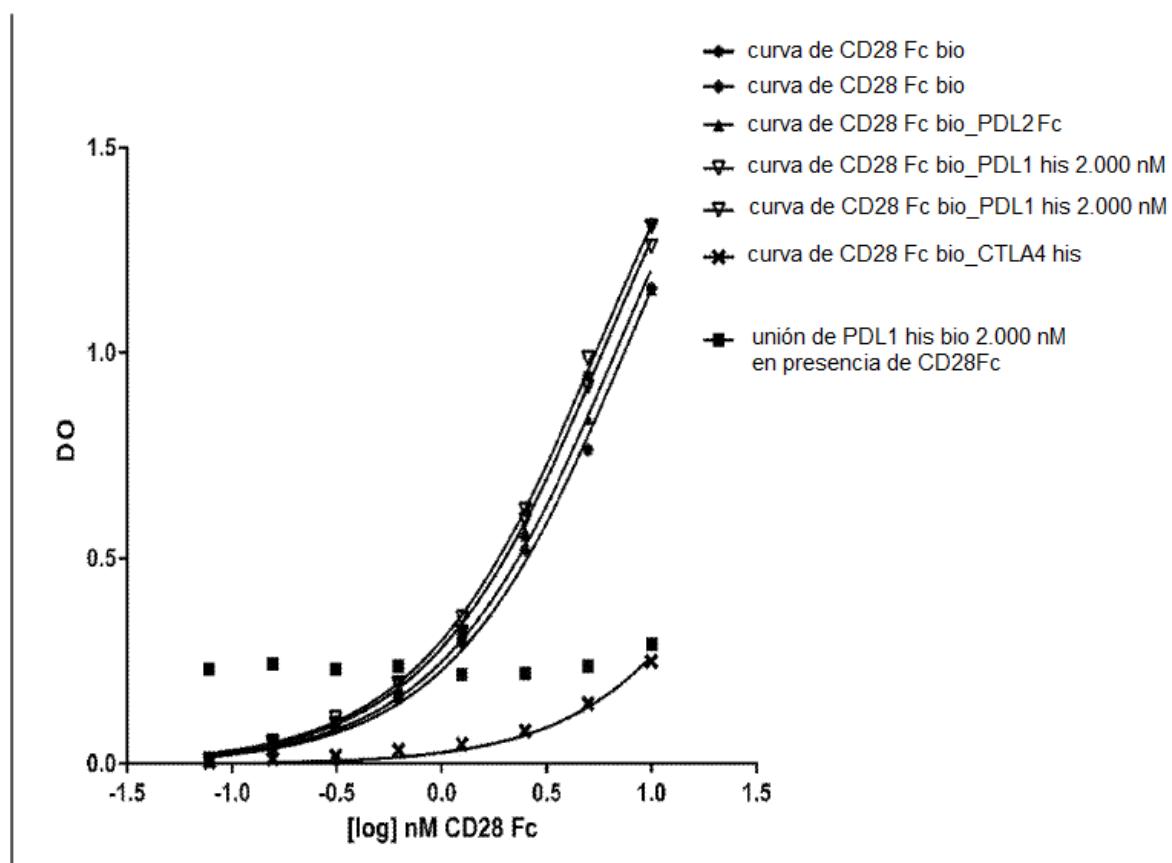
FIG. 1A

FIG. 1B

