

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



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

51 Int. Cl.:

C07K 14/705 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

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

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

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

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

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

30 Prioridad:

17.04.2015 US 201562149437 P
14.09.2015 US 201562218534 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente:
28.10.2021

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

SWANSON, RYAN y
KORNACKER, MICHAEL

74 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

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

Antecedentes

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 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 tiempo. Por tanto, existe la necesidad de moléculas mejoradas para la modulación de las respuestas inmunes. Se proporcionan realizaciones que satisfacen tales necesidades.

Resumen

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 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.

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 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.

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 unirse específicamente a las dos células de mamífero que forman la SI.

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 citoplásmico. 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 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.

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 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 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 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 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 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 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.

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 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 carcinoembrionarios (CEACAM), familia de lectinas similares a Ig de unión a ácido siálico (SIGLEC), familia de butirófilinas, 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). 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 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.

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.

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.

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.

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.

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
15 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.

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.

40 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.

45 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.

50 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 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 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 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 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 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 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.

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.

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.

En algunas realizaciones, la proteína inmunomoduladora está unida covalentemente, directa o indirectamente, a un fragmento de anticuerpo cristalizante (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.

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

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 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, HAVCR2, CEACAM1, TIGIT, PVR, PVRL2, CD226, CD2, CD160, CD200, NKp30 o CD200R1.

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 algunas realizaciones, la proteína inmunomoduladora está unida covalentemente, directa o indirectamente, a un fragmento de anticuerpo cristalizante (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.

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.

15 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.

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.

30 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

35 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 inhibitoras o activadoras. 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 inhibitoras 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.

45 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 inhibitoras (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.

50 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

55

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 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 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 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 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 de las células T inducida por los tumores. Los inmunoterapéuticos de última generación bloquean PD-1 o CTLA4, moléculas inhibitoras 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 disrumpir 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 inhibitoria. Según la invención reivindicada, las proteínas inmunomoduladoras proporcionadas se refieren a componentes de la superfamilia 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 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 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

A menos que se defina de otro modo, todos los términos de la técnica, notaciones y otros términos o terminología técnicos 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 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. 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 poliglútamico (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
10 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.

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
20 la técnica puede identificar los residuos correspondientes, por ejemplo, utilizando residuos de aminoácidos conservados e idénticos como guías.

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
25 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.

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
35 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
40 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 interactuar 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
45 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 ejemplificación 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
50 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
55 aminoácidos (uno, dos, tres o cuatro).

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
60 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, previene la progresión de la enfermedad o trastorno, o mejora el funcionamiento físico del paciente. En algunas realizaciones, el paciente es un paciente humano.

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 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.

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.

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).

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.

Una región o dominio Fc (fragmento cristizable) 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 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 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.

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

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 Igl. 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 quimioquinas 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, dimericas 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 humoral 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 linfoides 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, delección o secuestro de células inmunes; inducción o generación de células inmunes que pueden modular la capacidad funcional de otras células tales como linfocitos autorreactivos, 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 postraducciona 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

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.

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. 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.

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.

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.

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.

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, eluato 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).

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 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.

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 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, 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).

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.

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.

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 aidez 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 aidez 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 afin), 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 de animal diferente (es decir, ortólogo) o a una molécula no diana que tiene un epítipo sustancialmente similar al de la molécula diana (p. ej., parólogo) 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 aidez 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 (Kd) 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^{-7} M, 1×10^{-8} M, 1×10^{-9} M, 1×10^{-10} M o 1×10^{-11} M.

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 afin 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 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 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 lipídica de los liposomas que encapsulan un polipéptido inmunomodulador de la presente invención.

- 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
 20 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), o un aumento estadísticamente significativo en la supervivencia libre de progresión (PFS) o supervivencia global (OS).
 30 "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 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 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
 55 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.

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.

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 (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), o familia de receptores semejantes a inmunoglobulina de células asesinas (KIR).

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.

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.

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)	075144.2	19-129 IgV, 141-227S: IgC2	1-18, E: 19-256, 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: IgC2, 243-357 IgV, 367-453 IgC	1-28, E: 29-466, T: 467-487, C: 488-534		SEQ ID NO: 6 (29-534)	SEQ ID NO: 33
VTCN1 (B7-H4)	Q7Z7D3.1	35-146 IgV, 153-241S: IgV	1-24, E: 25-259, 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	SEC 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: IgC2, 204-317 IgC2, 317-389 IgC2	1-25, E: 26-396, T: 397-418, C: 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: IgC2, 265-343 IgC2, 349-419 IgC2	1-28, E: 29-450, T: 451-471, C: 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: IgC2, 237-317 IgC2, 323-413 IgC	1-34, E: 35-428, T: 429-452, C: 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: IgC2, 244-328 IgC2	1-20, E: 21-343, 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: IgC2, 261-345 IgC2	1-31, E: 32-360, 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 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 IgCS: 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 una 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.

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. 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.

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 del a 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.

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.

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 % 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.

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.

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.

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.

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.

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 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 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 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 de afinidad modificada y además contiene al menos un dominio de IgSF sin afinidad modificada (p. ej., dominio de IgSF no modificado 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.

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.

Según la invención reivindicada, 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 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.

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 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.

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).

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 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.

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.

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.

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.

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.

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.

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 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, y 4 y 2.
- 20 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.
- 25 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.
- 30 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 múltiplos 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/I10A	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/K89N/A91T/F92P/K93V/R94L/I118T/N149S	92	182
R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/E81V/L85R/K89N/A91T/F92P/K93V/R94L/N144S/N149S	93	
R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M42T/M43R/M47T/E81V/L85R/K89N/A91T/F92P/K93V/R94L/LI48S/N149S	94	183
E24G/R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/F59L/E81V/L85R/K89N/A91T/F92P/K93V/R94L/H96R/N149S/C182S	95	184
R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/E81V/L85R/K89N/A91T/F92P/K93V/R94L/N149S	96	
R29V/M43Q/E81R/L85I/K89R/D90L/A91E/F92N/K93Q/R94G	97	185
T41I/A91G	98	186
K89R/D90K/A91G/F92Y/K93R/N122S/N177S	99	187
K89R/D90K/A91G/F92Y/K93R	100	
K36G/K37Q/M38I/F59L/E81V/L85R/K89N/A91T/F92P/K93V/R94L/E99G/T130A/N149S	101	188
E88D/K89R/D90K/A91G/F92Y/K93R	102	189
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/I29P/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

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

B. Tipos de proteína inmunomoduladora con afinidad modificada

1. Dominio con afinidad modificada de unión dual

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

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.

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.

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.

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.

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.

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.

2. Proteínas inmunomoduladoras apiladas o multidominio

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).

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 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). 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 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 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 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 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 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 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 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 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 múltiplos 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 múltiplo 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 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 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 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 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 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 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

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 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.

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, deleciones, 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.

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 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 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 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 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. Sci. USA 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 radiactivo ACTITM para citometría de flujo (CellTechnology, Inc. Mountain View, Calif.; y ensayo de citotoxicidad no radiactivo CytoTox 96TM (Promega, Madison, Wis.)). Las células efectoras útiles para dichos ensayos incluyen células mononucleares de sangre periférica (PBMC) y células asesinas naturales (NK). 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)).

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).

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 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).

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 semividas 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. 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 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 postraducciona. No obstante, se considera que dichas cadenas sustancialmente idénticas 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.

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

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.

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 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).

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.

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 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.

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.

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 %.

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).

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 hidrofóbica y cromatografía de afinidad. Las etapas de plegamiento 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 secuenciadores 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, delecciones 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 casetes 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 deleciones 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 deleción 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, 10^2 , 10^3 , 10^4 , 2×10^4 , 3×10^4 , 4×10^4 , 5×10^4 , 6×10^4 , 7×10^4 , 8×10^4 , 9×10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 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 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 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.

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 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.

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 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 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 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.

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.

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 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).

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.

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 supositorio, por vía subcutánea, intradérmica, transcutánea, por nebulización, por vía intrapleurales, intraventricular, intraarticular, intraocular o intraespinal.

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 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, 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).

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, 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).

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 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.

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-colágeno y/o respuesta(s) de anticuerpos dependientes de células T.

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 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 biolística de la composición terapéutica de la invención en, o a través de la piel del sujeto o en el músculo expuesto del sujeto mamífero.

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 peptidos basados en la incorporación de 3H-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 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 micromatrices de proteínas, análisis de inmunoprecipitación); medición de marcadores bioquímicos de activación de células inmunes o 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, ensayos TUNEL, electroforesis en gel para medir la formación de escaleras de ADN, histología; ensayos de caspasa 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, micromatrices de ADN, micromatrices de proteínas, electroforesis en gel bidimensional, análisis de transferencia Western, ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzimas, citometría de flujo); y medición de síntomas o 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.

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.

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 presente memoria.

VI. Aplicaciones terapéuticas

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 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 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.

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, epidermolisis 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 (EII), 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, linfocitosis linfocítica, enfermedad de Ménière, síndrome de Miller Fish/encefalomielorradiculopatía diseminada aguda, enfermedad mixta del tejido conectivo, esclerosis múltiple (EM), reumatismo muscular, encefalomiелitis 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 Sjörgen, 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, vitiligo, 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 (GVHD), 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., aloinjertos 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).

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 útero, carcinoma gástrico o sarcoma de Ewing.

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.
- 5 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.
- 10 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.
- 15 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.
- 20 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.
- 25 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.
- 30 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 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).
- 35 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.
- 40 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.
- 45 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.
- 50

- 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.
- 50

- 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
- 15 inmunomoduladora está unida a un dominio Fc o una variante del mismo con función efectora reducida.
- 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
- 20 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
- 30 inmunomoduladora está unida a una membrana liposomal.
- Realización 49. En la presente memoria también se describe una proteína inmunomoduladora, que comprende al menos dos dominios de la superfamilia 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
- 35 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
- 40 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.
- 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
- 45 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 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).
- 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.

- 15 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.

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.

10 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 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.

- 15 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 psoriasis.

- 20 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 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 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.

- 35 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, 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.

- 40 Realización 124. En algunas realizaciones adicionales de la realización 123, el primer y segundo dominio de IgSF con afinidad modificada que no es de inmunoglobulina se unen cada uno específicamente al menos a un compañero de unión afín diferente.

- 45 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 una de las especies moleculares se expresa en al menos una de las 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 cristalizante (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.

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.

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, 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.

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.

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.

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 cristizable (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.
- Realización 186. En algunas realizaciones, se proporciona un ácido nucleico recombinante que codifica una cualquiera de las proteínas inmunomoduladoras de las realizaciones 125-185.
- 50 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/.

40 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. 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 ligandos 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).

50 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 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 µg 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.

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

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

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.

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).

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 µM.

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.

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 $0,22 \mu\text{m}$. 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
20 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
30 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.

- 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
35 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.

- 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.
40

- 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
45 clones seleccionado de F2, y se predice que los clones individuales de ese grupo tendrán una MFI/afinidad mucho más mejorada cuando se ensayen individualmente.

- 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
50 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).

- 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).
55

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.).

20 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.

30 Después 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 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.

45 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.

50 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. Después de 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 humedad y al 8 % de CO₂. Después 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 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.

Ejemplo 6

Evaluación de la unión y actividad de moléculas que contienen dominios de IgSF maduras 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.

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 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.

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 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.).

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.

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 maduras y 100.000 células T CD4⁺ alogénicas 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 µl 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 clon BC3 de células T humanas (Astarte Biologics, EE. UU.) a cada pocillo en un volumen final de 200 µl 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.

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.

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.

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 avidéz 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)	IFN-gamma pg/ml (relación parental)	Niveles de IFN-gamma pg/ml (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)	IFN-gamma pg/ml (relación parental)	Niveles de IFN-gamma pg/ml (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	119	5	200	740
		(1,05)	(0,57)	(0,08)	(2,41)	(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/I10A	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)	IFN-gamma pg/ml (relación parental)	Niveles de IFN-gamma pg/ml (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)	IFN-gamma pg/ml (relación parental)	Niveles de IFN-gamma pg/ml (relación parental)
G/M38I/T41A/M43R/M47T/E81V/L85R/K89N/A91T/F92P/K93V/R94L/I118T/N149S		(0,08)	(0,02)	(2,09)	(0,76)	(0,26)
R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/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/K36G/M38I/T41A/M42T/M43R/M47T/E81V/L85R/K89N/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/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/F59L/E81V/L85R/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/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/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/L85I/K89R/D90L/A91E/F92N/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/F92Y/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/F92Y/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/A91T/F92P/K93V/R94L/E99G/T130A/N149S	101	1.298	1.271	3.126	507	3.095
		(0,10)	(0,03)	(0,18)	(1,00)	(0,16)
AE88D/K89R/D90K/A91G/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/L40M	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)	IFN-gamma pg/ml (relación parental)	Niveles de IFN-gamma pg/ml (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	291	1.509	137
		(2,22)	(16,17)	(2,18)	(0,20)
N52S/Y152H	133	0,85	68	2.158	221
		(0,99)	(3,78)	(3,12)	(0,32)
N52D/V151A	134	0,90	19	341*	450
		(1,05)	(1,06)	(0,99*)	(0,66)
N52H/I143T	135	1,83	350	2.216	112
		(2,13)	(19,44)	(3,20)	(0,16)
N52S/L80P	136	0,09	22	192*	340
		(0,10)	(1,22)	(0,55*)	(0,49)
F120S/Y152H/N201S	137	0,63	16	351*	712
		(0,73)	(0,89)	(1,01*)	(1,04)
N52S/R75Q/L203P	138	1,71	12	1.996	136
		(1,99)	(0,67)	(2,88)	(0,20)
N52S/D158G	139	1,33	39	325*	277
		(1,55)	(2,17)	(0,94*)	(0,40)
N52D/Q133H	140	1,53	104	365*	178
		(1,78)	(5,78)	(1,05*)	(0,26)
ICOSL WT	32	0,86	18	692/346*	687
		(1,00)	(1,00)	(1,00)	(1,00)

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

Ejemplo 7

Ensayo de competición de unión de ligandos

- 5 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.

- 10 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.

- 15 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 ligandos 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 µl de sustrato TMB (Pierce, EE. UU.) a los pocillos tras el lavado y se incubó durante 7 minutos, antes de añadir 50 µl 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 epítomos 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 µL. 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 µl para un volumen total de 50 µl. 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 epítomos 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 ligandos 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

5 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			LR1	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 L30V/A60V/S64P/S86G ICOSL N52S/N57Y/H94D/L96F/L98F/Q100R	+	-	SEQ ID NO: 215	SEQ ID NO: 235	+	-	SEQ ID NO: 212	SEQ ID NO: 233	+	+
NKp30 L30V/A60V/S64P/S86G ICOSL N52D	+	-	SEQ ID NO: 215	SEQ ID NO: 235	+	-	SEQ ID NO: 199	SEQ ID NO: 233	+	+
NKp30 L30V/A60V/S64P/S86G ICOSL N52H/N57Y/Q100P	+	-	SEQ ID NO: 215	SEQ ID NO: 235	+	-	SEQ ID NO: 201	SEQ ID NO: 233	+	+
ICOSL WT NKp30 WT	+	-	SEQ ID NO: 196	SEQ ID NO: 233	+	-	SEQ ID NO: 214	SEQ ID NO: 235	+	+
ICOSL N52D NKp30 L30V/A60V/S64P/S86G	+	-	SEQ ID NO: 199	SEQ ID NO: 233	+	-	SEQ ID NO: 215	SEQ ID NO: 235	+	+
ICOSL N52H/N57Y/Q100P NKp30 L30V/A60V/S64P/S86G	+	-	SEQ ID NO: 201	SEQ ID NO: 233	+	-	SEQ ID NO: 215	SEQ ID NO: 235	+	+
Dominio 1: NKp30 WT Dominio 2: CD80 WT	+	-	SEQ ID NO: 214	SEQ ID NO: 235	+	-	SEQ ID NO: 152	SEQ ID NO: 231	+	+
Dominio 1: NKp30 WT Dominio 2: CD86 WT	+	-	SEQ ID NO: 214	SEQ ID NO: 235	+	SEQ ID NO: 236	SEQ ID NO: 220	SEQ ID NO: 237	+	+
Dominio 1: NKp30 L30V/A60V/S64P/S86G Dominio 2: CD80 R29H/Y31H/T41G/Y87N/E88G/K89E/D90N/A91G/P109S	+	-	SEQ ID NO: 215	SEQ ID NO: 235	+	-	SEQ ID NO: 192	SEQ ID NO: 231	+	+
Dominio 1: NKp30 L30V/A60V/S64P/S86G 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 Dominio 2: CD86 Q35H/H90L/Q102 H	+	-	SEQ ID NO: 215	SEQ ID NO: 235	+	SEQ ID NO: 236	SEQ ID NO: 221	SEQ ID NO: 237	+	+
Dominio 1: CD80 WT Dominio 2: NKp30 WT	+	-	SEQ ID NO: 152	SEQ ID NO: 231	+	-	SEQ ID NO: 214	SEQ ID NO: 235	+	+
Dominio 1: CD86 WT Dominio 2: NKp30 WT	+	SEQ ID NO: 236	SEQ ID NO: 220	SEQ ID NO: 237	+	-	SEQ ID NO: 214	SEQ ID NO: 235	+	+
Dominio 1: CD80 R29H/Y31H/T41G/Y87N/E88G/K89E/D90N/A91G/P109S Dominio 2: NKp30 L30V/A60V/S64P/S86G	+	-	SEQ ID NO: 192	SEQ ID NO: 231	+	-	SEQ ID NO: 215	SEQ ID NO: 235	+	+
Dominio 1: CD80 I67T/L70Q/A91G/T120S	+	-	SEQ ID NO: 175	SEQ ID NO: 235	+	-	SEQ ID NO: 236	SEQ ID NO: 237	+	+

Tabla 9: Secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO) de componentes de construcciones apiladas ejemplares											
		SP	Primer dominio			LR1	Segundo dominio			LR2	Fc
			LS1	IgV1	TS1		LS2	IgV2	TS2		
Dominio 2: NKp30 L30V/A60V/S64P/S86G								215	235		
Dominio 1: CD86 Q35H/H90L/Q102H		+	SEQ ID NO: 236	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: CD86 WT											
Dominio 1: CD80 WT		+	-	SEQ ID NO: 152	SEQ ID NO: 231	+	-	SEQ ID NO: 152	SEQ ID NO: 231	+	+
Dominio 2: CD80 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 I67T/L70Q/A91G/T120S											
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 apliadas ejemplares									
SP	Primer dominio			LR1	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: 236	SEQ ID NO: 220	SEQ ID NO: 237	+	-	SEQ ID NO: 152	SEQ ID NO: 231	+
Dominio 1: CD86 WT	+	-	SEQ ID NO: 192	SEQ ID NO: 231	+	-	SEQ ID NO: 189	SEQ ID NO: 231	+
Dominio 2: CD80 WT		-	SEQ ID NO: 192	SEQ ID NO: 231	+	-	SEQ ID NO: 193	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: 231	+
Dominio 2: CD80 E88D/K89R/D90K/A91G/F92Y/K93R		-	SEQ ID NO: 175	SEQ ID NO: 231	+	-	SEQ ID NO: 193	SEQ ID NO: 231	+
Dominio 1: CD80 R29H/Y31H/T41G/Y87N/E88G/K89E/D90N/A91G/P 109 S	+	SEQ ID NO: 236	SEQ ID NO: 221	SEQ ID NO: 237	+	-	SEQ ID NO: 189	SEQ ID NO: 231	+
Dominio 2: CD80 A12T/H18L/N43V/F59L/E77K/P109S/I118T		SEQ ID NO: 236	SEQ ID NO: 221	SEQ ID NO: 237	+	-	SEQ ID NO: 193	SEQ ID NO: 231	+
Dominio 1: CD86 Q35H/H90L/Q102H	+	-	SEQ ID NO: 213	SEQ ID NO: 233	+	-	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: 189	SEQ ID NO: 231	+
Dominio 1: ICOSL N52D	+	-	SEQ ID NO: 199	SEQ ID NO: 233	+	-	SEQ ID NO: 193	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: 189	SEQ ID NO: 231	+
Dominio 1: ICOSL N52H/N57Y/Q100P	+	-	SEQ ID NO: 201	SEQ ID NO: 233	+	-	SEQ ID NO: 193	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: 231	+
Dominio 1: ICOSL N52H/N57Y/Q100P	+	-	SEQ ID NO: 195	SEQ ID NO: 231	+	-	SEQ ID NO: 189	SEQ ID NO: 231	+
Dominio 2: CD80 A12T/H18L/N43V/F59L/E77K/P109S/I118T		-	SEQ ID NO: 195	SEQ ID NO: 231	+	-	SEQ ID NO: 189	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: 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: 231	+

Tabla 9: Secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO) de componentes de construcciones apiladas ejemplares										
SP	Primer dominio			LR1	Segundo dominio			LR2	Fc	
	LS1	IgV1	TS1		LS2	IgV2	TS2			
Dominio 1: CD80 R29V/Y31F/K36G/M38L/N43Q/E81R/V83I/L85I/K89R/D90L/A91E/F92N/K93Q/R94G Dominio 2: CD80 E88D/K89R/D90K/A91G/F92Y/K93R	-	SEQ ID NO: 194	SEQ ID NO: 231	+	-	SEQ ID NO: 189	SEQ ID NO: 231	+	+	
	-	SEQ ID NO: 195	SEQ ID NO: 231	+	-	SEQ ID NO: 193	SEQ ID NO: 231	+	+	
Dominio 1: CD80 R29V/Y31F/K36G/M38L/N43Q/E81R/V83I/L85I/K89R/D90L/A91E/F92N/K93Q/R94G Dominio 2: CD80 A12T/H18L/N43V/F59L/E77K/P109S/I118T	-	SEQ ID NO: 194	SEQ ID NO: 231	+	-	SEQ ID NO: 193	SEQ ID NO: 231	+	+	
	-	SEQ ID NO: 189	SEQ ID NO: 231	+	-	SEQ ID NO: 195	SEQ ID NO: 231	+	+	
Dominio 1: CD80 E88D/K89R/D90K/A91G/F92Y/K93R Dominio 2: CD80 V68M/L70P/L72P/K86E	-	SEQ ID NO: 189	SEQ ID NO: 231	+	-	SEQ ID NO: 194	SEQ ID NO: 231	+	+	
	-	SEQ ID NO: 193	SEQ ID NO: 231	+	-	SEQ ID NO: 195	SEQ ID NO: 231	+	+	
Dominio 1: CD80 A12T/H18L/N43V/F59L/E77K/P109S/I118T Dominio 2: CD80 R29V/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	+	+	
	-	SEQ ID NO: 193	SEQ ID NO: 231	+	-	SEQ ID NO: 195	SEQ ID NO: 231	+	+	
Dominio 1: CD86 WT Dominio 2: ICOSL WT	SEQ ID NO: 236	SEQ ID NO: 220	SEQ ID NO: 237	+	-	SEQ ID NO: 196	SEQ ID NO: 233	+	+	
	-	SEQ ID NO: 192	SEQ ID NO: 231	+	-	SEQ ID NO: 213	SEQ ID NO: 233	+	+	
Dominio 1: CD80 I67T/L70Q/A91G/T120S Dominio 2: ICOSL N52S/N57Y/H94D/L96F/L98F/Q100R/G103E/F120S	-	SEQ ID NO: 175	SEQ ID NO: 231	+	-	SEQ ID NO: 213	SEQ ID NO: 233	+	+	
	-	SEQ ID NO: 192	SEQ ID NO: 231	+	-	SEQ ID NO: 199	SEQ ID NO: 233	+	+	
Dominio 1: CD80 I67T/L70Q/A91G/T120S Dominio 2: ICOSL N52D	-	SEQ ID NO: 175	SEQ ID NO: 231	+	-	SEQ ID NO: 199	SEQ ID NO: 233	+	+	
	-	SEQ ID NO: 192	SEQ ID NO: 231	+	-	SEQ ID NO: 201	SEQ ID NO: 233	+	+	
Dominio 1: CD80 I67T/L70Q/A91G/T120S Dominio 2: ICOSL N52H/N57Y/Q100 P	-	SEQ ID NO: 175	SEQ ID NO: 231	+	-	SEQ ID NO: 201	SEQ ID NO: 233	+	+	
	-	SEQ ID NO: 192	SEQ ID NO: 231	+	-	SEQ ID NO: 201	SEQ ID NO: 233	+	+	

Tabla 9: Secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO) de componentes de construcciones apiladas ejemplares										
SP	Primer dominio			LR1	Segundo dominio			LR2	Fc	
	LS1	IgV1	TS1		LS2	IgV2	TS2			
Dominio 1: CD86 Q35H/H90L/Q102H Dominio 2: ICOSL N52S/N57Y/H94D/L96F/L98F/Q100R/G103E/F120S	+	SEQ ID NO: 236	SEQ ID NO: 221 237	+	-	SEQ ID NO: 213 233	+	+		
	+	SEQ ID NO: 236	SEQ ID NO: 221 237	+	-	SEQ ID NO: 199 233	+	+		
Dominio 1: CD86 Q35H/H90L/Q102H Dominio 2: ICOSL N52D	+	SEQ ID NO: 236	SEQ ID NO: 221 237	+	-	SEQ ID NO: 201 233	+	+		
	+	SEQ ID NO: 236	SEQ ID NO: 221 237	+	-	SEQ ID NO: 236 237	+	+		
Dominio 1: ICOSL WT Dominio 2: CD86 WT	+	-	SEQ ID NO: 196 233	+	SEQ ID NO: 236	SEQ ID NO: 237	+	+		
	+	-	SEQ ID NO: 213 233	+	-	SEQ ID NO: 192 231	+	+		
Dominio 1: ICOSL N52S/N57Y/H94D/L96F/L98F/Q100R/G103E/F120S Dominio 2: CD80 I67T/L70Q/A91G/T120S	+	-	SEQ ID NO: 213 233	+	-	SEQ ID NO: 175 231	+	+		
	+	-	SEQ ID NO: 199 233	+	-	SEQ ID NO: 192 231	+	+		
Dominio 1: ICOSL N52D Dominio 2: CD80 R29H/Y31H/T41G/Y87N/E88G/K89E/D90N/A91G/P109S	+	-	SEQ ID NO: 199 233	+	-	SEQ ID NO: 175 231	+	+		
	+	-	SEQ ID NO: 201 233	+	-	SEQ ID NO: 221 237	+	+		
Dominio 1: ICOSL N52H/N57Y/Q100P Dominio 2: CD80 R29H/Y31H/T41G/Y87N/E88G/K89E/D90N/A91G/P109S	+	-	SEQ ID NO: 213 233	+	SEQ ID NO: 236	SEQ ID NO: 237	+	+		
	+	-	SEQ ID NO: 199 233	+	SEQ ID NO: 236	SEQ ID NO: 237	+	+		
Dominio 1: ICOSL N52S/N57Y/H94D/L96F/L98F/Q100R/G103E/F120S Dominio 2: CD86 Q35H/H90L/Q102H	+	-	SEQ ID NO: 213 233	+	SEQ ID NO: 236	SEQ ID NO: 237	+	+		
	+	-	SEQ ID NO: 199 233	+	SEQ ID NO: 236	SEQ ID NO: 237	+	+		
Dominio 1: ICOSL N52D Dominio 2: CD86 Q35H/H90L/Q102H	+	-	SEQ ID NO: 199 233	+	SEQ ID NO: 236	SEQ ID NO: 237	+	+		
	+	-	SEQ ID NO: 201 233	+	SEQ ID NO: 236	SEQ ID NO: 237	+	+		
Dominio 1: ICOSL N52H/N57Y/Q100P Dominio 2: CD86 Q35H/H90L/Q102H	+	-	SEQ ID NO: 213 233	+	SEQ ID NO: 236	SEQ ID NO: 237	+	+		
	+	-	SEQ ID NO: 199 233	+	SEQ ID NO: 236	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 µl 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 µl para un volumen total de 200 µl. 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.
- 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.
- 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 de la columna 1.
- 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.
- 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)

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 coimmobilización 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)	
Dominio 1: Nkp30 WT	214	-	88.823 (1,00)	7.022 (1,00)	68 (1,00)
Dominio 2: CD80 WT	152	-			
Dominio 1: Nkp30 WT	214	-	14.052 (1,00)	1.690 (1,00)	92 (1,00)
Dominio 2: CD86 WT	220	-			
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/E88G/K89E/D90N/A91G/P109S	192	CD28			
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/P109S	192	CD28			
Dominio 2: Nkp30 (L30V A60V S64P S86G)	215	B7-H6	55.727 (0,50)	4.342 (0,32)	100 (0,35)
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			

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 coimmobilización 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					
Dominio 1: CD80 WT	152		60.278	2.085		59

TABLA 12: Proteínas de fusión Fc IgV variantes aplajadas 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 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	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	193	PD-L1	7.613 (4,66)	2.030 (0,32)		137 (1,40)
Dominio 2: CD80 R29H/Y31H/T41G/Y87N/E88G/K89E/D90N/A91G/P109S	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 167T/L70Q/A91G/T120S	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: CD86 Q35H/H90L/Q102H	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: CD86 Q35H/H90L/Q102H	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/L98F/Q100R/G103E/F120S	213	ICOS/CD28				
Dominio 1: CD80 A12T/H18L/N43V/F59L/E77K/P109S/I118T	193	PD-L1	2.230 (1,81)	2.148 (0,81)		112 (1,62)
Dominio 2: ICOSL N52S/N57Y/H94D/L96F/L98F/Q100R/G103E/F120S	213	ICOS/CD28				
Dominio 1: CD80 A12T/H18L/N43V/F59L/E77K/P109S/I118T	193	PD-L1 ICOS/CD28	5.665 (4,61)	6.446 (2,43)		126 (1,83)
Dominio 2: ICOSL N52H/N57Y/Q100P	199					
Dominio 1: CD80 E88D/K89R/D90K/A91G/F92Y/K93R	189	PD-L1	6.260 (5,09)	4.543 (1,71)		269 (3,90)
Dominio 2: ICOSL N52H/N57Y/Q100P	201	ICOS/CD28				
Dominio 1: CD80 A12T/H18L/N43V/F59L/E77K/P109S/I118T	193	PD-L1	3.359 (2,73)	3.874 (1,46)		97 (1,41)
Dominio 2: ICOSL N52H/N57Y/Q100P	201	ICOS/CD28				
Dominio 1: ICOSL WT	196		3.000 (1,00)	2.966 (1,00)		101 (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 apliadas 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 coimmunización 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)	
8G/K89E/D90N/A91G/P109S						
Dominio 2: CD80 E88D/K89R/D90K/A91G/F9 2Y/K93R	189	PD-L1	(1,73)	(0,58)		(1,16)
Dominio 1: CD80 R29H/Y31H/T41G/Y87N/E8	192	CD28	4.542 (2,78)	2.878 (0,45)		142 (1,45)
8G/K89E/D90N/A91G/P109S						
Dominio 2: CD80 A12T/H18L/N43V/F59L/E7 7K/P109S/I118T	193	PD-L1	938	995		102
Dominio 1: CD80 167T/L70Q/A91G/T120S	175	CD28	(0,57)	(0,16)		(1,04)
Dominio 2: CD80 E88D/K89R/D90K/A91G/F9 2Y/K93R	189	PD-L1	4.153 (2,54)	2.827 (0,45)		108 (1,10)
Dominio 1: CD80 167T/L70Q/A91G/T120S	175	CD28	14.608 (2,95)	2.535 (1,67)		257 (2,06)
Dominio 2: CD80 A12T/H18L/N43V/F59L/E7 7K/P109S/I118T	193	PD-L1	2.088 (0,42)	2.110 (1,39)		101 (0,81)
Dominio 1: CD86 Q35H/H90L/Q102H	221	CD28	3.634 (1,21)	4.893 (1,65)	6.403 (0,45)	123 (1,22)
Dominio 2: CD80 E88D/K89R/D 90K/A91G/F9 2Y/K93R	189	PD-L1				
Dominio 1: CD86 Q35H/H90L/Q102H	221	CD28				
Dominio 2: CD80 A12T/H18L/N43V/F59L/E7 7K/P109S/I118T	193	PD-L1				
Dominio 1: ICOSL N52S/N57Y/H94D/L96F/L9	213	ICOS/CD28				
8F/Q100R/G103E/F120S						
Dominio 2: CD80 E88D/K89R/D90K/A91G/F92Y/K93R	189	PD-L1				
Dominio 1: ICOSL N52S/N57Y/H94D/L96F/L96F/F120S	213	ICOS/CD28	1.095 (0,37)	5.929 (2,0)	7.923 (0,55)	127 (1,26)
Dominio 2: CD80 A12T/H18L/N43V/F59L/E77K/P109S/I118T	193	PD-L1	2.023 (0,67)	5.093 (1,72)	16.987 (1,18)	125 (1,24)
Dominio 1: ICOSL N52D	199	ICOS/CD28				
Dominio 2: CD80 E88D/K89R/D90K/A91G/F92Y/K93R	189	PD-L1	3.441 (1,15)	3.414 (1,15)	20.889 (1,45)	165 (1,63)
Dominio 1: ICOSL N52D	199	ICOS/CD28				
Dominio 2: CD80 A12T/H18L/N43V/F59L/E77K/P109S/I118T	193	PD-L1	7.835 (2,61)	6.634 (2,24)	20.779 (1,45)	95 (0,94)
Dominio 1: ICOSL N52H/N57Y/Q100P	201	ICOS/CD28				
Dominio 2: CD80 E88D/K89R/D 90K/A91G/F92Y/K93R	189	PD-L1	8.472 (2,82)	3.789 (1,28)	13.974 (0,97)	106 (1,05)
Dominio 1: ICOSL N52H/N57Y/Q100P	201	ICOS/CD28				
Dominio 2: CD80 A12T/H18L/N43V/F59L/E77K/P109S/I118T	193	PD-L1				

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

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		Actividad funcional MLR de IFN-gamma pg/ml
			MFI PD-L1 (relación de parental WT)	MFI CTLA-4 (relación de MFI parental WT)	
Dominio 1: CD80 WT Dominio 2: CD80 WT	152		6.297 (1,00)	4.698 (1,00)	35.166 (1,00)
	152				
Dominio 1: CD80 V68M/L70P/L72P/K86E Dominio 2: CD80 E88D/K89R/D 90K/A91G/F92Y/K93R	195	CTLA-4	2.464 (0,39)	4.955 (1,05)	5.705 (0,16)
	189	PD-L1			
Dominio 1: CD80 R29V/Y31F/K36G/M38L/N43Q/E81R/V83I/L85I/K89R/D90L/A91E/F92N/K93Q/R94G	194	CTLA-4	1.928 (0,31)	1.992 (0,42)	1.560 (0,04)
	189	PD-L1			
Dominio 1: CD80 V68M/L70P/L72P/K86E Dominio 2: CD80 A12T/H18L/N43V/F59L/E77K/P109S/I118T	195	CTLA-4	1.215 (0,19)	1.382 (0,29)	2.171 (0,06)
	193	PD-L1			
Dominio 1: CD80 R29V/Y31F/K36G/M38L/N43Q/E81R/V83I/L85I/K89R/D90L/A91E/F92N/K93Q/R94G	194	CTLA-4	1.592 (0,25)	1.962 (0,42)	1.512 (0,04)
	193	PD-L1			
Dominio 1: CD80 E88D/K89R/D90K/A91G/F92Y/K93R Dominio 2: CD80 V68M/L70P/L72P/K86E	189	PD-L1	1.747 (0,28)	2.057 (0,44)	9.739 (0,28)
	195	CTLA-4			
Dominio 1: CD80 E88D/K89R/D90K/A91G/F92Y/K93R Dominio 2: CD80 R29V/Y31F/K36G/M38L/N43Q/E81R/V83I/L85I/K89R/D90L/A91E/F92N/K93Q/R94G	189	PD-L1	1.752 (0,28)	1.772 (0,38)	5.412 (0,15)
	194	CTLA-4			
Dominio 1: CD80 A12T/H18L/N43V/F59L/E77K/P109S/I118T Dominio 2: CD80 V68M/L70P/L72P/K86E	193	PD-L1	1.636 (0,26)	1.887 (0,40)	7.608 (0,22)
	195	CTLA-4			
Dominio 1: CD80 A12T/H18L/N43V/F59L/E77K/P109S/I118T Dominio 2: CD80 R29V/Y31F/K36G/M38L/N43Q/E81R/V83I/L85I/K89R/D90L/A91E/F92N/K93Q/R94G	193	PD-L1	2.037 (0,32)	4.822 (1,03)	11.158 (0,32)
	194	CTLA-4			

TABLA 14: Proteínas de fusión Fc IgV variantes aplajadas 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		Actividad funcional MLR de IFN- gamma pg/ml	
			MFI PD-L1 (relación de MFI parental WT)	MFI CTLA-4 (relación de MFI parental WT)		
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 R29H/Y31H/T41G/Y87N/E88G/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 R29H/Y31H/T41G/Y87N/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/CD 28				
Dominio 1: CD80 R29H/Y31H/T41G/Y87N/E88G/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/CD 28				
Dominio 1: CD86 Q35H/H90L/Q102H	221	CD28	11.662 (0,40)	21.165 (0,38)	880 (0,14)	
Dominio 2: ICOSL N52S/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 aplajadas 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		Actividad funcional MLR de IFN- γ pg/ml	
			MFI PD-L1 (relación de MFI parental WT)	MFI CTLA-4 (relación de MFI parental WT)		
Dominio 2: CD80 WT	152		(1,00)	(1,00)	(1,00)	
Dominio 1: ICOSL WT	196		18.005	53.602	18.393	
Dominio 2: CD86 WT	220		(1,00)	(1,00)	(1,00)	
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	ICOS/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	ICOS/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	199	ICOS/CD 28	2.522 (0,84)	13.569 (0,94)	5.447 (1,32)	
Dominio 2: CD80 167T/L70Q/A91G/T120S	175	CD28				
Dominio 1: ICOSL N52H/N57Y/Q100P	201	ICOS/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	ICOS/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	ICOS/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	ICOS/CD28	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.

Listado de secuencias

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

<120> PROTEÍNAS INMUNOMODULADORAS CON AFINIDADES AJUSTABLES

<130> 761612000140

<140> Aún no asignado

<141> Simultáneamente con la presente

<150> 62/149.437

<151> 17-04-2015

<150> 62/218.534

<151> 14-09-2015

<160> 240

<170> FastSEQ para Windows Versión 4.0

<210> 1

<211> 288

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> CD80 (B7-1)

<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

ES 2 870 991 T3

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			

 $\langle 210 \rangle$ 2

<211> 329

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

$\langle 220 \rangle$

<223> CD86 (B7-2)

10 <400> 2

[illegible]

$\langle 210 \rangle$ 3

<211> 290

15 <212> PRT

<213> Homo sapiens

$\langle 220 \rangle$

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

20

 $\langle 400 \rangle$ 3

ES 2 870 991 T3

```

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 Glu Asp Leu Lys Val Gln His Ser Ser
 65      70      75      80
Tyr Arg Gln Arg Ala Arg Leu Leu Lys Asp Gln Leu Ser Leu Gly Asn
 85      90      95
Ala Ala Leu Gln Ile Thr Asp Val Lys Leu Gln Asp Ala Gly Val Tyr
100      105      110
Arg Cys Met Ile Ser Tyr Gly Gly Ala Asp Tyr Lys Arg Ile Thr Val
115      120      125
Lys Val Asn Ala Pro Tyr Asn Lys Ile Asn Gln Arg Ile Leu Val Val
130      135      140
Asp Pro Val Thr Ser Glu His Glu Leu Thr Cys Gln Ala Glu Gly Tyr
145      150      155      160
Pro Lys Ala Glu Val Ile Trp Thr Ser Ser Asp His Gln Val Leu Ser
165      170      175
Gly Lys Thr Thr Thr Thr Asn Ser Lys Arg Glu Glu Lys Leu Phe Asn
180      185      190
Val Thr Ser Thr Leu Arg Ile Asn Thr Thr Thr Asn Glu Ile Phe Tyr
195      200      205
Cys Thr Phe Arg Arg Leu Asp Pro Glu Glu Asn His Thr Ala Glu Leu
210      215      220
Val Ile Pro 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>
 10 <223> PDCD1LG2 (PD-L2, CD273)

```

<400> 4
Met Ile Phe Leu 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

```


ES 2 870 991 T3

```

      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 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 Lys 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
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

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

```

<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 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

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> CD276 (B7-H3)

<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              320
Gly Asn Ala Ser Leu Arg Leu Gln Arg Val Arg Val Ala Asp Glu Gly
      325              330              335
Ser Phe Thr Cys Phe Val Ser Ile Arg Asp Phe Gly Ser Ala Ala Val
      340              345              350
Ser Leu Gln Val Ala Ala Pro Tyr Ser Lys Pro Ser Met Thr Leu Glu
      355              360              365
Pro Asn Lys Asp Leu Arg Pro Gly Asp Thr Val Thr Ile Thr Cys Ser
      370              375              380
Ser Tyr Arg Gly Tyr Pro Glu Ala Glu Val Phe Trp Gln Asp Gly Gln
385              390              395              400
Gly Val Pro Leu Thr Gly Asn Val Thr Thr Ser Gln Met Ala Asn Glu
      405              410              415
Gln Gly Leu Phe Asp Val His Ser Val Leu Arg Val Val Leu Gly Ala
      420              425              430
Asn Gly Thr Tyr Ser Cys Leu Val Arg Asn Pro Val Leu Gln Gln Asp
      435              440              445
Ala His Gly Ser Val Thr Ile Thr Gly Gln Pro Met Thr Phe Pro Pro
      450              455              460
Glu Ala Leu Trp Val Thr Val Gly Leu Ser Val Cys Leu Ile Ala Leu
465              470              475              480
Leu Val Ala Leu Ala Phe Val Cys Trp Arg Lys Ile Lys Gln Ser Cys
      485              490              495
Glu Glu Glu Asn Ala Gly Ala Glu Asp Gln Asp Gly Glu Gly Glu Gly
      500              505              510
Ser Lys Thr Ala Leu Gln Pro Leu Lys His Ser Asp Ser Lys Glu Asp
      515              520              525
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      80
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 Gly 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      160
Ala Ser Ser Glu Thr Leu Arg Cys Glu Ala Pro Arg Trp Phe Pro Gln

```

ES 2 870 991 T3

```

                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
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <223> CD28

```

<400> 8
Met Leu Arg Leu Leu Leu Ala Leu Asn Leu Phe Pro Ser Ile Gln Val
1      5      10      15
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
 <211> 223
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <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
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <223> PDCD1 (PD-1)

<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
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <223> ICOS

<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 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 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
 <211> 289
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <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
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
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
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          285
Ser

```

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

```

ES 2 870 991 T3

```

      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 Ser Val Gln Cys Arg Ser Pro Arg Gly
145      150      155      160
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 Val Leu Ala Phe Gln Lys Ala Ser
  195      200      205
Ser Ile Val Tyr Lys Lys Glu Gly Glu 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      240
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      320
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      400
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 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
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <223> CD8A (CD8-alfa)

```

<400> 14
Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu 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
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

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

```

<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 Arg Ala Arg Leu Arg Phe Met Lys Gln Phe
      195          200          205
Tyr Lys
210

```

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

<220>
 <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	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	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 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

ES 2 870 991 T3

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	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 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

ES 2 870 991 T3

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	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	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	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

<220>
<223> CD226

5

<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 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 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

ES 2 870 991 T3

```

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 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 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
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <223> CD200

<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 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

<210> 26
 <211> 325
 <212> PRT
 5 <213> Homo sapiens

<220>
 <223> CD200R1 (CD200R)

10 <400> 26
 Met Leu Cys Pro Trp Arg Thr Ala Asn Leu Gly Leu Leu Leu Ile Leu
 1 5 10 15
 Thr Ile Phe Leu Val Ala Ala 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 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 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

<210> 27
 <211> 201
 15 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<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 Cys Gly Ser Ser Ala
 180      185      190
His Leu Leu Pro Pro Val Pro Gly Gly
 195      200

```

<210> 28
 <211> 208
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <223> ECD de CD80 (B7-1)

```

<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

```

<210> 29
 <211> 224
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<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	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				

15

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

10

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

15

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

20

<400> 32

ES 2 870 991 T3

```

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      160
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 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      240
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      320
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      400
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
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <223> ECD de VTCN1 (B7-H4)

```

<400> 34
Leu Ile Ile Gly Phe Gly Ile Ser Gly Arg 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

```


ES 2 870 991 T3

```

      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
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <223> ECD de CD28

```

<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      75      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 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
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <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

15 <210> 38
 <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	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 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>
10 <223> ECD de CD8A (CD8-alfa)

<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 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              160
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
      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              240
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 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 Gln Leu Asn Ala Thr Val Thr Leu
305              310              315              320
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              400
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
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <223> ECD de HAVCR2 (TIM-3)

```

<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      90      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
 145 150 155 160
 Glu Leu Arg Asp Ser Arg Leu Ala Asn Asp Leu Arg Asp Ser Gly Ala
 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 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 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

ES 2 870 991 T3

```

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
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <223> ECD de PVRL2 (CD112)

```

<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
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <223> ECD de CD226

<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
 <211> 185
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <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 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

<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 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 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
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <223> ECD de CD200R1 (CD200R)

<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 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

<210> 54
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<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

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> ECD de CD80 v1

<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

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> ECD de CD80 v3

<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			

<210> 58

<211> 208

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<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

<210> 59

<211> 208

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> ECD de CD80 v5

<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

20

<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

<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
195 200 205

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

<220>
<223> ECD de CD80 v9

<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

<210> 64
 <211> 208
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia artificial

<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
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
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
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> ECD de CD80 v12

```

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
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <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			

<210> 68

<211> 208

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> ECD de CD80 v14

<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

<213> Secuencia artificial

<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
 5 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

10 <211> 208

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <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

<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

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

<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

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

5

<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 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

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

15

<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

ES 2 870 991 T3

```

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>
 10 <223> ECD de CD80 v21

```

<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 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> 76
 <211> 208
 15 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 20 <223> ECD de CD80 v22


```
<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>
10 <223> ECD de CD80 v23
```

```
<400> 77
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
```

```
<210> 78
<211> 208
15 <212> PRT
    <213> Secuencia artificial
20
```

<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				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	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		

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				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	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> 80

<211> 208

<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<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

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

<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
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

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

5

<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

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

15

<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
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> ECD de CD80 v30

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	Asn	Ile	Arg	Arg	Ile	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> 85
 <211> 208
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<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				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	Ala	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> 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				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	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> 87

<211> 208

<212> PRT

20

<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	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
 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

<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
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> ECD de CD80 v37

```

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

```

<210> 92
 <211> 208
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<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				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	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	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		

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				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	Ser
	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		

15

<210> 94

<211> 208

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20

<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
		195					200						205		

20

<210> 96

<211> 208

<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<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

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

<220>
<223> ECD de CD80 v43

<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

<210> 98
 <211> 208
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia artificial

 <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
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> ECD de CD80 v46

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

<220>
 <223> ECD de CD80 v47

<400> 101

```

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 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 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

```

5

<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      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 Asp 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> 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 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
 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 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

<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 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 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> 105

<211> 208

<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> ECD de CD80 v51

5

```
<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

<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

20

				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> 109
<211> 238
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> ECD de ICOSL v1

<400> 109															
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	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> 110
<211> 238
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> ECD de ICOSL v2

 $\langle 400 \rangle$ 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

15

<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

15

<220>
 <223> ECD de ICOSL v8

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

20

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
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> ECD de ICOSL v9

<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

<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

20

```

      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 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

```

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>
10 <223> ECD de ICOSL v15

<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	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	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	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
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> ECD de ICOSL v18

<div><div><div><400> 126</div><div>Asp Thr Gln Glu Lys Glu Val Arg Ala Met Val Gly Ser Asp Val Glu</div><div>1 5 10 15</div></div></div>	<div><div><div>Leu Ser Cys Ala Cys Pro Glu Gly Ser Arg Phe Asp Leu Asn Asp Val</div><div>20 25 30</div></div></div>	<div><div><div>Tyr Val Tyr Trp Gln Thr Ser Glu Ser Lys Thr Val Val Thr Tyr His</div><div>35 40 45</div></div></div>	<div><div><div>Ile Pro Gln Tyr Ser Ser Leu Glu Tyr Val Asp Ser Arg Tyr Arg Asn</div><div>50 55 60</div></div></div>	<div><div><div>Arg Ala Leu Met Ser Pro Ala Gly Met Leu Arg Gly Asp Phe Ser Leu</div><div>65 70 75 80</div></div></div>	<div><div><div>Arg Leu Phe Asn Val Thr Pro Gln Asp Glu Gln Lys Phe His Cys Leu</div><div>85 90 95</div></div></div>	<div><div><div>Val Leu Ser Gln Ser Leu Gly Phe Gln Glu Val Leu Ser Val Glu Val</div><div>100 105 110</div></div></div>	<div><div><div>Thr Leu His Val Ala Ala Asn Phe Ser Val Pro Val Val Ser Ala Pro</div><div>115 120 125</div></div></div>	<div><div><div>His Ser Pro Ser Gln Asp Glu Leu Thr Phe Thr Cys Thr Ser Ile Asn</div><div>130 135 140</div></div></div>	<div><div><div>Gly Tyr Pro Arg Pro Asn Val Cys Trp Ile Asn Lys Thr Asp Asn Ser</div><div>145 150 155 160</div></div></div>	<div><div><div>Leu Leu Asp Gln Ala Leu Gln Asn Asp Thr Val Phe Leu Asn Met Arg</div><div>165 170 175</div></div></div>	<div><div><div>Gly Leu Tyr Asp Val Val Ser Val Leu Arg Ile Ala Arg Thr Pro Ser</div><div>180 185 190</div></div></div>	<div><div><div>Val Asn Ile Gly Cys Cys Ile Glu Asn Val Leu Leu Gln Asn Leu</div><div>195 200 205</div></div></div>	<div><div><div>Thr Val Gly Ser Gln Thr Gly Asn Asp Ile Gly Glu Arg Asp Lys Ile</div><div>210 215 220</div></div></div>	<div><div><div>Thr Glu Asn Pro Val Ser Thr Gly Glu Lys Asn Ala Ala Thr</div><div>225 230 235</div></div></div>
--	---	---	---	--	---	--	--	--	--	--	--	--	--	--

<210> 127
<211> 238
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> ECD de ICOSL v19

<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

```

<210> 129
 <211> 238
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> ECD de ICOSL v21

10 <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

<210> 130
 <211> 238
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<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 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 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> 132

<211> 238

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<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

```

<210> 133

<211> 238

15 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> ECD de ICOSL v25

20

<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 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

```

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

5

<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

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

15

<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

ES 2 870 991 T3

```

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

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> ECD de ICOSL v29

<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

```

<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

```

20

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>
10 <223> ECD de ICOSL v32

<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      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 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      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> 143
 <211> 117
 5 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> ECD de NKp30 v1

```

      10      15
<400> 143
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 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

```

      10      15
<400> 144
Leu Trp Val Ser Gln Pro Pro Glu Ile Arg Thr Leu Glu Gly Ser Ser
1      5      10      15

```

[illegible]

<210> 145
<211> 117
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> ECD de NKp30 v3

<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
<211> 117
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<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

<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

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

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

<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

<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

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

<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

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

<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

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												

<210> 155
 <211> 101
 15 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> IgV de CD80 v6

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											
			100												

<210> 156
 <211> 101
 25 <212> PRT
 <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

<211> 101

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> IgV de CD80 v9

<400> 157

```

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
          100

```

15

<210> 158

<211> 101

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20

<220>

<223> IgV de CD80 v10

<400> 158

```

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
          100

```

25

<210> 159

<211> 101

<212> PRT

30

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> IgV de CD80 v11

5

<400> 159

```
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
          100
```

10

<210> 160

<211> 101

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15

<220>

<223> IgV de CD80 v12

<400> 160

```
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
          100
```

20

<210> 161

<211> 101

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

25

<220>

<223> IgV de CD80 v13

30

<400> 161

```
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
          100
```


<210> 162
 <211> 101
 <212> PRT
 5 <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
 15 <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 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

 <210> 164
 25 <211> 101
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 30 <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
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
      100

```

<210> 165
 <211> 101
 5 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> IgV de CD80 v17

```

      1      5      10      15
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
      100

```

<210> 166
 15 <211> 101
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 20 <223> IgV de CD80 v19

```

      1      5      10      15
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 Glu Asp Ala Phe Lys Arg Glu His
      85      90      95
Leu Ala Glu Val Thr
      100

```

<210> 167
 25 <211> 101
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 30 <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
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> IgV de CD80 v22

```

<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
 <211> 101
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <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
 <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
5           100
```

<210> 171

<211> 101

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> IgV de CD80 v25

<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
15           100
```

<210> 172

<211> 101

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> IgV de CD80 v26

<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
25           100
```

<210> 173

<211> 101

<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
5 <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

25 <210> 175
<211> 101
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> IgV de CD80 v30

30 <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

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

 <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

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

 <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

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

 <220>
 30 <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
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> IgV de CD80 v35

<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

<210> 180
 <211> 101
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<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

<210> 181
 <211> 101
 <212> PRT
 <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											
5				100											

<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

<220>

5 <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
100
```

10

<210> 185

<211> 101

<212> PRT

15 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> IgV de CD80 v43

<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
```

20

<210> 186

<211> 101

<212> PRT

25 <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 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
      100

```

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

<220>
 <223> IgV de CD80 v45

```

<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

```

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

<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

```

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

<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

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> IgV de CD80 v49

<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

<211> 101

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> IgV de CD80 v50

<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

<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

```

<210> 193

10 <211> 101

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <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

```

<210> 194

20 <211> 101

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

25 <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
          85           90           95
Leu Ala Glu Val Thr
          100

```

30

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

 <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

ES 2 870 991 T3

```

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
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> IgV de ICOSL v2

```

<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
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <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
 100      105      110

```

<210> 200
 <211> 111
 <212> PRT
 <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

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> IgV de ICOSL v5

<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

```

15

<210> 202

<211> 111

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20

<220>

<223> IgV de ICOSL v10

<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

```

25

<210> 203

<211> 111

30

<212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>

5 <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
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> IgV de ICOSL v14

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
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> IgV de ICOSL v22

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		

<210> 208
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <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

<213> Homo sapiens

20

<220>

<223> IgV de ICOSL v28

<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

```

25

<210> 211

<211> 111

<212> PRT

30

<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

```

<210> 212

10 <211> 111

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <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

25 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> IgV de ICOSL v34

30

<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

```

<210> 214
 <211> 108
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia artificial

 <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

 <210> 215
 <211> 108
 15 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

 <220>
 <223> Similar a IgC de NKp30 v1
 20 <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

 <210> 216
 <211> 108
 25 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

 <220>
 <223> Similar a IgC de NKp30 v2
 30 <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
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <223> Similar a IgC de NKp30 v3

<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

<210> 218
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <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

<210> 219
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>

<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
Glu Leu Ser

```

15

<210> 221

<211> 99

<212> PRT

<213> Homo sapiens

20

<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> PRT

<213> Homo sapiens

30

<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
          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

```

<210> 223

<211> 99

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<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

```

<210> 224

<211> 99

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<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

```

<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 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
 <211> 235
 20 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <223> Fc de IgG2

25 <400> 227

ES 2 870 991 T3

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 Gly Ser Gly 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 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 Gly Ser Ala Ala Ala
 1 5 10

35 <210> 231

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Enlazador 1 de CD80 WT

5 <400> 231
Lys Ala Asp Phe Pro Thr Pro Ser Ile Ser Asp Phe Glu Ile Pro
1 5 10 15

<210> 232
10 <211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
15 <223> Enlazador 2 de CD80 WT

<400> 232
Thr Thr Lys Gln Glu His Phe Pro Asp Asn
1 5 10

20 <210> 233
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

25 <220>
<223> Enlazador 1 de ICOSL WT

<400> 233
Val Thr Leu His Val Ala Ala Asn Phe Ser Val
1 5 10

30 <210> 234
<211> 29
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

35 <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

40 <210> 235
<211> 9
<212> PRT

45 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Enlazador 1 de NKp30 WT

50 <400> 235
Val Glu Lys Glu His Pro Gln Leu Gly
1 5

<210> 236
<211> 9
55 <212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
60 <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

ES 2 870 991 T3

```

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 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> 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 Gln 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 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.
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.
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.
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.
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.
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.
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.
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.
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.
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.
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.

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

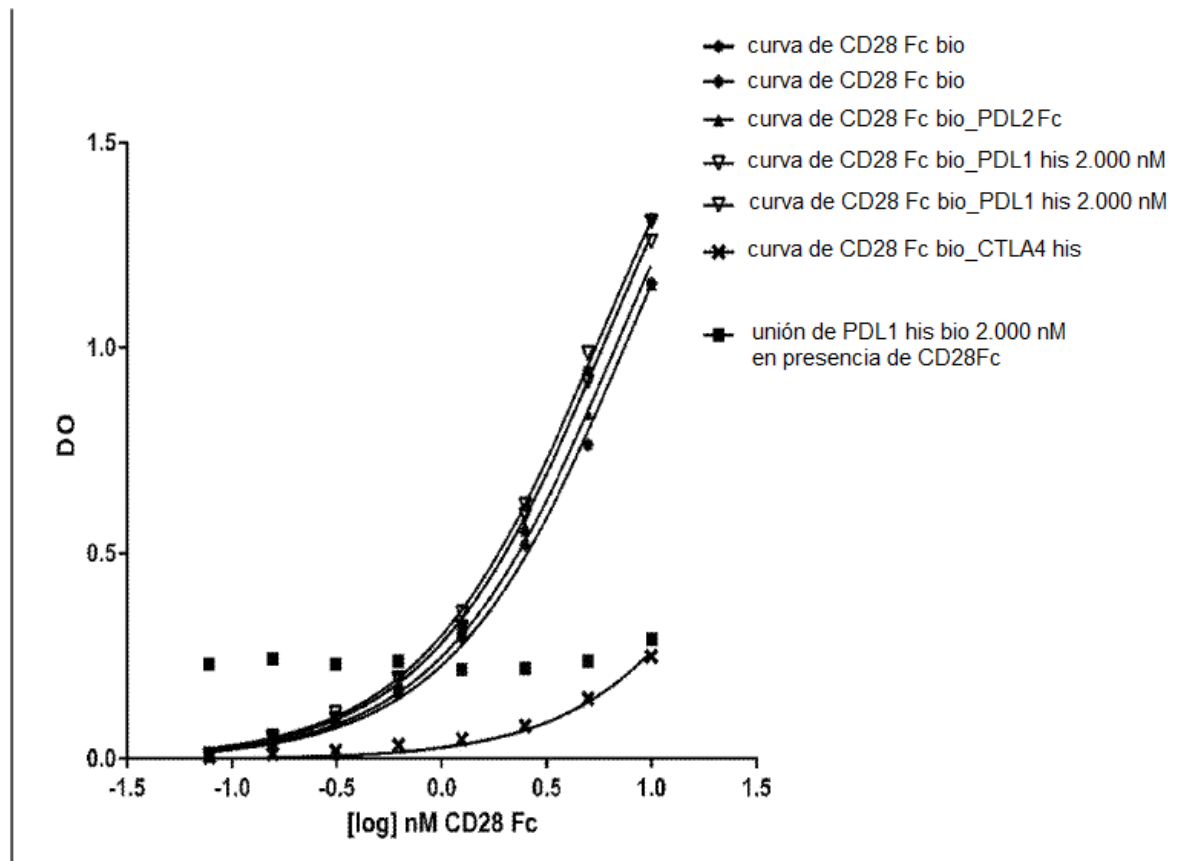


FIG. 1B

