

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **044356**(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.08.18

(21) Номер заявки
201892336

(22) Дата подачи заявки
2017.04.14

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

(54) ВАРИАНТНЫЕ ИММУНОМОДУЛИРУЮЩИЕ БЕЛКИ ЛИГАНДА ICOS И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

(31) 62/323,608; 62/394,745; 62/410,842;
62/472,568; 62/475,162

(32) 2016.04.15; 2016.09.14; 2016.10.20;
2017.03.16; 2017.03.22

(33) US

(43) 2019.06.28

(86) PCT/US2017/027811

(87) WO 2017/181148 2017.10.19

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ЭЛПАЙН ИМЬЮН САЙНС, ИНК.
(US)

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

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

(56) CHATTOPADHYAY KAUSIK ET AL.: "Structural basis of inducible costimulator ligand costimulatory function: Determination of the cell surface oligomeric state and functional mapping of the receptor binding site of the protein", THE JOURNAL OF IMMUNOLOGY, vol. 177, no. 6, 15 September 2006 (2006-09-15), pages 3920-3929, XP002774505, THE AMERICAN ASSOCIATION OF IMMUNOLOGISTS, US ISSN: 0022-1767, DOI: 10.4049/jimmunol.177.6.3920 page 3924, right-hand column, paragraph 3 - page 3926, right-hand column, paragraph 1; table 1 figure 5

DATABASE UniSave [Online] 17 February 2016 (2016-02-17), XP002774506, retrieved from EBI Database accession no. L8Y5K4 abstract

ZIMIN ALEKSEY V ET AL.: "A new rhesus macaque assembly and annotation for next-generation sequencing analyses", BIOLOGY DIRECT, vol. 9, no. 1, 20, 14 October 2014 (2014-10-14), pages 1-15, XP002774507, BIOMED CENTRAL LTD, LO ISSN: 1745-6150, DOI: 10.1186/1745-6150-9-20 page 5, right-hand column, paragraph 3 - page 6, left-hand column, paragraph 1 -& DATABASE UniSave [Online] 13 April 2016 (2016-04-13), XP002774508, retrieved from EBI Database accession no. H9Z6Y0 abstract

US-A1-2003158102

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

B1**044356****044356****B1**

Перекрестные ссылки на родственные заявки

Изобретение заявляет приоритет предварительной заявки США 62/323608, поданной 15 апреля 2016 г., озаглавленной "Вариантные иммуномодулирующие белки лиганда ICOS и их применение", предварительной заявки США № 62/394745, поданной 14 сентября 2016 г., "Вариантные иммуномодулирующие белки лиганда ICOS и их применение", предварительной заявки США № 62/410842, поданной 20 октября 2016 г., озаглавленной "Вариантные иммуномодулирующие белки лиганда ICOS и их применение", предварительной заявки США № 62/472568, поданной 16 марта 2017 г., озаглавленная "Вариантные иммуномодулирующие белки лиганда ICOS и их применение" и предварительной заявки США № 62/475,162, поданной 22 марта 2017 г., озаглавленная "Вариантные иммуномодулирующие белки лиганда ICOS и их применение", содержание каждой из которых включено ссылкой во всей полноте.

Включение перечня последовательностей ссылкой

Изобретение подается вместе с перечнем последовательностей в электронном формате. Список последовательностей представлен как файл под названием 761612000340SeqList.txt, созданный 13 апреля 2017 г., размер которого составляет 979474 байт. Информация списка последовательностей в электронном формате включена в виде ссылки в полном объеме.

Область техники, к которой относится изобретение

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

Предшествующий уровень техники

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

Сущность изобретения

В некоторых воплощениях, представленное в данном документе представляет собой полипептид варианта лиганда ICOS (ICOSL), содержащий домен IgV или его специфически связывающийся фрагмент, домен IgC или его специфически связывающийся фрагмент, или оба этих домена, где вариантный полипептид ICOSL включает одну или несколько аминокислотных замен в немодифицированном ICOSL или его специфическом связывающем фрагменте, соответствующем положению(ям), выбранному из 10, 11, 13, 16, 18, 20, 25, 27, 30, 33, 37, 38, 42, 43, 47, 52, 54, 57, 61, 62, 67, 71, 72, 74, 75, 77, 78, 80, 84, 89, 90, 92, 93, 94, 96, 97, 98, 99, 100, 102, 103, 107, 109, 110, 111, 113, 115, 116, 117, 119, 120, 121, 122, 126, 129, 130, 132, 133, 135, 138, 139, 140, 142, 143, 144, 146, 148, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 158, 161, 164, 166, 168, 172, 173, 175, 190, 192, 193, 194, 198, 201, 203, 207, 208, 210, 212, 217, 218, 220, 221, 224, 225 или 227 относительно SEQ ID NO: 32. В некоторых воплощениях немодифицированный ICOSL представляет собой ICOSL млекопитающего или его специфический связывающийся фрагмент. В некоторых воплощениях немодифицированный ICOSL представляет собой ICOSL человека или его специфический связывающийся фрагмент. В некоторых воплощениях немодифицированный ICOSL включает (i) аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 32, (ii) аминокислотную последовательность, которая имеет, по меньшей мере, 95% идентичности с последовательностью SEQ ID NO: 32; или (iii) ее часть, содержащую домен IgV или домен IgC или их специфические связывающие фрагменты или и то, и другое.

В некоторых воплощениях любого из вариантных полипептидов ICOSL, описанных выше, специфический связывающийся фрагмент домена IgV или домена IgC имеет длину, по меньшей мере, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110 или более аминокислот; или специфический связывающийся фрагмент домена IgV имеет длину, которая составляет, по меньшей мере, 80% длины домена IgV, представленного аминокислотами 19-129 в SEQ ID NO: 5 и/или специфический связывающийся фрагмент домена IgC имеет длину, составляющую, по меньшей мере, 80% длины домена IgC, представленного аминокислотами 141-227 в SEQ ID NO: 5. В некоторых воплощениях вариантный полипептид ICOSL включает до 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 аминокислотных модификаций, необязательно аминокислотных замен, вставок и/или делеций. В некоторых воплощениях вариантный ICOSL включает аминокислотную последовательность, которая имеет, по меньшей мере, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичности с последовательностью SEQ ID NO: 32 или ее специфическим связывающим фрагментом. В некоторых воплощениях любой из предложенных в данном документе вариантных поли-

пептидов ICOSL демонстрирует измененное связывание с эктодоменом ICOS, CD28 или CTLA-4 по сравнению с немодифицированным ICOSL. В некоторых воплощениях любой из вариантных полипептидов ICOSL обнаруживает измененное связывание с эктодоменом ICOS или CD28 по сравнению с немодифицированным ICOSL. В некоторых воплощениях измененное связывание изменяет аффинность связывания и/или изменяет селективность связывания.

В некоторых воплощениях любого из вариантных полипептидов ICOSL, описанных выше, одну или несколько аминокислотных замен выбирают из M10V, M10I, V11E, S13G, E16V, S18R, A20V, S25G, F27S, F27C, N30D, Y33del, Q37R, K42E, T43A, Y47H, N52H, N52D, N52S, N52Q, N52Y, N52K, S54A, S54P, N57Y, N57D, R61S, R61C, Y62F, L67P, A71T, G72R, L74Q, R75Q, D77G, F78L, L80P, N84Q, D89G, E90A, K92R, F93L, H94E, H94D, L96F, L96I, V97A, L98F, S99G, Q100R, Q100K, Q100P, L102R, G103E, V107A, V107I, S109G, S109N, V110D, V110N, V110A, E111del, T113E, H115R, H115Q, V116A, A117T, N119Q, F120I, F120S, S121G, V122A, V122M, S126T, S126R, H129P, S130G, S132F, Q133H, E135K, F138L, T139S, C140D, C140del, S142F, I143V, I143T, N144D, Y146C, V151A, Y152C, Y152H, W153R, I154F, N155H, N155Q, K156M, D158G, L161P, L161M, L166Q, N168Q, F172S, L173S, M175T, T190A, T190S, S192G, V193M, N194D, C198R, N201S, L203P, L203F, N207Q, L208P, V210A, S212G, D217V, I218T, I218N, E220G, R221G, R221I, I224V, T225A, N227K или их консервативных аминокислотных замен.

В некоторых воплощениях, одну или несколько модификаций выбирают из N52Y/N57Y/F138L/L203P, N52H/N57Y/Q100P, N52S/Y146C/Y152C, N52H/C198R, N52H/C140D/T225A, N52H/C198R/T225A, N52H/K92R, N52H/S99G, N57Y/Q100P, N52S/G103E, N52S/S130G/Y152C, N52S/Y152C, N52S/C198R, N52Y/N57Y/Y152C, N52Y/N57Y/H129P/C198R, N52H/L161P/C198R, N52S/T113E, N52D/S54P, N52K/L208P, N52S/Y152H, N52D/V151A, N52H/I143T, N52S/L80P, F120S/Y152H/N201S, N52S/R75Q/L203P, N52S/D158G, N52D/Q133H, N52S/N57Y/H94D/L96F/L98F/Q100R, N52S/N57Y/H94D/L96F/L98F/Q100R/G103E/F120S, N52H/F78L/Q100R, N52H/N57Y/Q100R/V110D, N52H/N57Y/R75Q/Q100R/V110D, N52H/N57Y/Q100R, N52H/N57Y/L74Q/Q100R/V110D, N52H/Q100R, N52H/S121G, A20V/N52H/N57Y/Q100R/S109G, N52H/N57Y/R61S/Q100R/V110D/L173S, N52H/N57Y/Q100R/V122A, N52H/N57Y/Q100R/F172S, N52H/N57Y, N52S/F120S, N52S/V97A, N52S/G72R, N52S/A71T/A117T, N52S/E220G, Y47H/N52S/V107A/F120S, N52H/N57Y/Q100R/V110D/S132F/M175T, E16V/N52H/N57Y/Q100R/V110D/H115R/Y152C/K156M/C198R, N52H/N57Y/Q100R/V110D/C198R, Q37R/N52H/N57Y/Q100R/V110N/S142F/C198R/D217V/R221G, F27S/N52H/N57Y/V110N, N52H/N57Y/Q100R/V110D/V116A/L161M/F172S/S192G/C198R, N52S/H94E/L96I/S109N/L166Q, S18R/N52S/F93L/I143V/R221G, A20T/N52D/Y146C/Q164L, V11E/N30D/N52H/N57Y/H94E/L96I/L98F/N194D/V210A/I218T, N52S/H94E/L96I/V122M, N52H/N57Y/H94E/L96I/F120I/S126T/W153R/I218N, M10V/S18R/N30D/N52S/S126R/T139S/L203F, S25G/N30D/N52S/F120S/N227K, N30D/N52S/L67P/Q100K/D217G/R221K/T225S, N52H/N57Y/Q100R/V110D/A117T/T190S/C198R, N52H/N57Y/Q100R/V110D/F172S/C198R, S25G/F27C/N52H/N57Y/Q100R/V110D/E135K/L173S/C198R, N52H/N57Y/V110A/C198R/R221I, M10I/S13G/N52H/N57Y/D77G/V110A/H129P/I143V/F172S/V193M/C198R, N52H/N57Y/R61C/Y62F/Q100R/V110N/F120S/C198R, N52H/N57Y/Q100R/V110D/H115R/C198R, N52H/N57Y/Q100R/V110D/N144D/F172S/C198R, N52S/H94E/L98F/Q100R, N52S/E90A, N30D/K42E/N52S, N52S/F120S/I143V/I224V, N52H/N57Y/Q100R/V110D/C198R/S212G, N52H/N57Y/Q100R/C198R, N52S/N194D, N52H/N57Y/Q100R/L102R/V110D/H115R/C198R, N52S/S54P, T38P/N52S/N57D, E111del, Y33del, N52H/C140del/T225A, N52H/F78L/Q100R/C198R, N52H/N57Y/R75Q/Q100P/V110D, N52H/N57Y/L74Q/V110D/S192G, N52H/S121G/C198R, N52S/F120S/N227K, N52S/A71T/A117T/T190A/C198R, T43A/N52H/N57Y/L74Q/D89G/V110D/F172S, N52H/N57Y/Q100R/V110D/S132F/M175T, N52H/N57Y/Q100R/V107I/V110D/I154F/C198R/R221G, N84Q, N119Q, N168Q, N207Q, N52Q, N52Q/N207Q, N168Q/N207Q, N52Q/N168Q, N84Q/N207Q, N155Q/N207Q, N119Q/N168Q, N119Q/N207Q, N119Q/N155Q, N52Q/N84Q, N52Q/N119Q, N84Q/N119Q, N52Q/N84Q/N168Q, N52Q/N84Q/N207Q, N84Q/N155Q/N168Q, N84Q/N168Q/N207Q, N84Q/N155H/N207Q, N155Q/N168Q/N207Q, N119Q N155Q/N168Q, N119Q/N168Q/N207Q, N84Q/N119Q/N207Q, N119Q/N155H/N207Q, N84Q/N119Q/N155Q, N52Q/N119Q/N155Q, N52H/N84Q/N119Q, N52H/N84Q, N52H/N84Q/N168Q, N52H/N84Q/N207Q, N52H/N84Q/N168Q/N207Q, N52Q/N84Q/N155Q, N52Q/N84Q/N168Q, N52Q/N84Q/N155Q/N168Q, N52Q/N84Q/N119Q/N168Q, N84Q/N119Q/N155Q/N168Q, N84Q/N155Q/N168Q/N207Q, N84Q/N119Q/N155Q/N207Q, N52Q/N84Q/N119Q/N207Q, N52Q/N84Q/N119Q/N155Q, N52Q/N84Q/N119Q/N155Q/N207Q, N84Q/N119Q/N155Q/N168Q/N207Q, Q100R, F138L/L203P, N52Y/F138L/L203P, N57Y/Q100R/C198R, N57Y/F138L/L203P, Q100R/F138L, L203P, N52H/N57Y/Q100R/H115R/C198R, N52H/N57Y/Q100R/F172S/C198R, N52H/N57Y/Q100R/H115R/F172S/C198R, N52H/N57Y/Q100R/L102R/H115R/F172S/C198R, N52H/V122A/F172S/C198R, N52H/N57Y/Q100R/H115R/F172S/N194D, N52H/N57Y/H115R/F172S/C198R, N52H/N57Y/Q100R/H115R/C198R, N52H/N57Y/H115R, N52H/N57Y/Q100R/H115R,

N52H/N57Y/Q100R/H115R/F172S/I224V, N52H/N57Y/Q100R/H115R/F172S, N52H/N57Y/Q100R/F172S, N52H/Q100R/H115R/I143T/F172S, N52H/N57Y/Q100P/H115R/F172S, N52Y/N57Y/Q100P/F172S, E16V/N52H/N57Y/Q100R/V110D/H115R/C198R, E16V/N52H/N57Y/Q100R/V110D/H115R/Y152C/K156M/F172S/C198R, N52S/E90A/H115R, N30D/K42E/N52S/H115R, N30D/K42E/N52S/H115R/C198R/R221I, N30D/K42E/N52S/H115R/C198R, N30D/K42E/N52S/H115R/F172S/N194D, N52S/H115R/F120S/I143V/C198R, N52S/H115R/F172S/C198R, N52H/N57Y/Q100P/C198R, N52H/N57Y/Q100P H115R/F172S/C198R, N52H/N57Y/Q100P/F172S/C198R, N52H/N57Y/Q100P/H115R, N52H/N57Y/Q100P/H115R/C198R, N52H/Q100R/C198R, N52H/Q100R/H115R/F172S, N52H/Q100R/F172S/C198R, N52H/Q100R/H115R/F172S/C198R или N52H/N57Y/Q100R/F172S/C198R.

В некоторых из любых таких воплощений одна или несколько аминокислотных модификаций находятся в положении(ях), соответствующих положению, выбранному из 52, 57, 100, 110 или 198. В некоторых из таких воплощений одна или несколько аминокислотных модификаций выбраны из N52H, N52D, N52S, N52K, N52Q, S54A, S54P, N57Y, Q100R, V110A, V110D, C198R или их консервативной аминокислотной замены. В некоторых воплощениях вариантный ICOSL дополнительно включает одну или несколько дополнительных модификаций, таких как любые, описанные в данном документе. В некоторых из таких воплощений вариантный полипептид ICOSL дополнительно включает одну или несколько аминокислотных модификаций, выбранных из V11E, E16V, N30D, K42E, N52H, N52S, N52Y, N57Y, E90A, H94E, L96I, L98F, Q100R, Q100P, L102R, V110A, V110D, H115R, F120S, V122A, F138L, I143V, V152C, K156M, K156R, F172S, N194D, C198R, L203P, V210A, S212G, I218T, R221I, I224V или их консервативных аминокислотных замен.

В некоторых из любых таких воплощений, одна или несколько аминокислотных модификаций представляют собой N52H/N57Y/Q100R/C198R, N52H/N57Y/Q100R/V122A, N52H/N57Y/Q100R/F172S, N52Y/N57Y/F138L/L203P, V11E/N30D/N52H/N57Y/H94E/L96I/L98F/N194D/V210A/I218T, N52H/N57Y/Q100R, N52H/Q100R, N52H/N57Y/Q100R/V110D/C198R/S212G, N52H/N57Y/Q100R/L102R/V110D/H115R/C198R, E16V/N52H/N57Y/Q100R/V110D/H115R/V152C/K156M/C198R, N30D/K42E/N52S, N52S/F120S/I143V/I224V, N52S/E90A, N52H/N57Y/V110A/C198R/R221I, N52H/N57Y/Q100P или N52S/N194D.

В некоторых воплощениях любого из вариантных полипептидов ICOSL, описанных выше, вариантный полипептид ICOSL включает домен IgV или его специфический фрагмент и домен IgC или его специфический фрагмент. В некоторых воплощениях любого из вариантных полипептидов ICOSL, описанных выше, вариантный полипептид ICOSL включает аминокислотную последовательность, указанную в любом из SEQ ID NO: 109-142, 239, 280-325, 364-381, 387-424, 427-433, 435-470 или его специфический связывающий фрагмент или аминокислотную последовательность, которая имеет, по меньшей мере, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичности последовательности к любому из SEQ ID NO: 109-142, 239, 280-325, 364-381, 387-424, 427-433, 435-470 или его специфический связывающий фрагмент и который включает одну или несколько аминокислотных замен.

В некоторых воплощениях любого из вариантных полипептидов ICOSL, описанных выше, вариантный полипептид ICOSL включает домен IgV или его специфический связывающий фрагмент. В некоторых воплощениях домен IgV или его специфический связывающий фрагмент является единственной частью ICOSL вариантного полипептида ICOSL. В некоторых воплощениях домен IgC или его специфический связывающий фрагмент является единственной частью ICOSL вариантного полипептида ICOSL.

В некоторых воплощениях любого из вариантных полипептидов ICOSL, описанных выше, вариантный полипептид ICOSL включает аминокислотную последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO: 197-199, 201-208, 210, 212, 240, 326-340, 382-386, 425-426 и 434 или его специфический связывающий фрагмент, аминокислотная последовательность, которая имеет, по меньшей мере, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичности к любой из SEQ ID NO: 197-199, 201-208, 210, 212, 240, 326-340, 382-386, 425-426 и 434 или его специфический связывающий фрагмент и который включает одну или несколько аминокислотных замен.

В некоторых воплощениях любого из вариантных полипептидов ICOSL, описанные выше, вариантный полипептид ICOSL специфически связывается с эктодоменом ICOS, CD28 или CTLA-4 с повышенной аффинностью по сравнению с немодифицированным ICOSL. В некоторых воплощениях вариантный полипептид ICOSL специфически связывается с эктодоменом ICOS или CD28 с повышенной аффинностью по сравнению с немодифицированным ICOSL. В некоторых воплощениях вариантный полипептид ICOSL специфически связывается с эктодоменом ICOS и эктодоменом CD28 в каждом случае с повышенной аффинностью по сравнению с немодифицированным ICOSL.

В некоторых из любых таких воплощений вариантный полипептид ICOSL специфически связывается с эктодоменом CD28 с повышенной аффинностью по сравнению с немодифицированным ICOSL. В некоторых из таких воплощений повышенная аффинность к эктодомену CD28 увеличивается более чем в 1,2, в 1,5, в 2, в 3, в 4, в 5, в 6, в 7, в 8, в 9, в 10, в 20, в 30, в 40, в 50 или в 60 раз по сравнению с немодифицированным ICOSL. В некоторых воплощениях вариантный полипептид ICOSL специфически связывается

вается с эктодоменом ICOS с повышенной аффинностью по сравнению с немодифицированным ICOSL. В некоторых из таких воплощений повышенная аффинность к эктодомену ICOS увеличивается более чем в 1,2, в 1,5, в 2, в 3, в 4, в 5, в 6, в 7, в 8, в 9, в 10, в 20, в 30, в 40, в 50, в 60 или в 70 раз по сравнению с немодифицированным ICOSL.

В некоторых воплощениях любого из вариантных полипептидов ICOSL, одна или более аминокислотных замен соответствуют положению(ям), выбранному из 52, 54 или 57. В некоторых воплощениях одна или несколько аминокислотных модификаций выбраны из N52H, N52D, N52Q, N52S, N52Y, N52K, S54A, S54P, N57D, N57Y или их консервативной аминокислотной замены. В некоторых из таких воплощений одна или несколько аминокислотных замен модификаций соответствуют положению(ям), выбранному из 52 или 57. В некоторых воплощениях одна или несколько аминокислотных замен выбраны из N52H, N52D, N52S, N52K или N57Y. В некоторых воплощениях любой из вариантных полипептидов ICOSL дополнительно включает еще одну дополнительную модификацию аминокислоты, такую как любая из описанных. В некоторых воплощениях любого из вариантных полипептидов ICOSL, описанных выше, вариантный полипептид ICOSL дополнительно включает одну или несколько аминокислотных модификаций, выбранных из N52H, N52D, N52S, N52Y, N52K, S54A, S54P, N57Y, R75Q, L80P, K92R, S99G, H94D, L96F, L98F, L96I, S99G, Q100R, Q100P, G103E, T113E, F120S, H129P, S130G, Q133H, F138L, C140D, C140del, I143T, Y146C, V151A, Y152C, Y152H, D158G, L161P, C198R, N201S, L203P, L208P или T225A, или их консервативной аминокислотной замены.

В некоторых из любых таких воплощений, модификации одной или нескольких аминокислот выбраны из N52Y/N57Y/F138L/L203P, N52H/N57Y/Q100P, N52S/Y146C/Y152C, N52H/C198R, N52H/C140del/T225A, N52H/C198R/T225A, N52H/K92R, N57Y/Q100P, N52S/C198R, N52Y/N57Y/Y152C, N52Y/N57Y/H129P/C198R, N52H/L161P/C198R, N52S/T113E, N52S/S54P, N52K/L208P, N52S/Y152H, N52H/I143T, N52S/R75Q/L203P, N52S/D158G, N52D/Q133H, N52H/N57Y/Q100R/V110D/C198R/S212G, N52H/N57Y/Q100R/C198R, N52S/N194D, N52H/N57Y/Q100R/L102R/V110D/H115R/C198R, N52S/S54P, T38P/N52S/N57D, N52H/C140del/T225A, N52H/F78L/Q100R/C198R, N52H/N57Y/R75Q/Q100P/V110D, N52H/N57Y/L74Q/V110D/S192G, N52H/S121G/C198R, N52S/F120S/N227K, N52S/A71T/A117T/T190A/C198R, T43A/N52H/N57Y/L74Q/D89G/V110D/F172S, N52H/N57Y/Q100R/V110D/S132F/M175T, N52H/N57Y/Q100R/V107I/V110D/I154F/C198R/R221G, N52Q/N207Q, N52Q/N168Q, N52Q/N84Q, N52Q/N119Q, N52Q/N84Q/N168Q, N52Q/N84Q/N207Q, N52Q/N119Q/N155Q, N52H/N84Q/N119Q, N52H/N84Q, N52H/N84Q/N168Q, N52H/N84Q/N207Q, N52H/N84Q/N168Q/N207Q, N52Q/N84Q/N155Q, N52Q/N84Q/N168Q, N52Q/N84Q/N155Q/N168Q, N52Q/N84Q/N119Q/N168Q, N52Q/N84Q/N119Q/N207Q, N52Q/N84Q/N119Q/N155Q/N207Q, N52Y/F138L/L203P, N57Y/Q100R/C198R, N57Y/F138L/L203P, N52H/N57Y/Q100R/H115R/C198R, N52H/N57Y/Q100R/F172S/C198R, N52H/N57Y/Q100R/H115R/F172S/C198R, N52H/N57Y/Q100R/H115R/F172S/C198R, N52H/N57Y/Q100R/L102R/H115R/F172S/C198R, N52H/V122A/F172S/C198R, N52H/N57Y/Q100R/H115R/F172S/C198R, N52H/N57Y/H115R/F172S/C198R, N52H/N57Y/Q100R/H115R, N52H/N57Y/Q100R/H115R, N52H/N57Y/Q100R/H115R/F172S/I224V, N52H/N57Y/Q100R/H115R/F172S, N52H/N57Y/Q100R/F172S, N52H/Q100R/H115R/I143T/F172S, N52H/N57Y/Q100P/H115R/F172S, N52Y/N57Y/Q100P/F172S, E16V/N52H/N57Y/Q100R/V110D/H115R/C198R, E16V/N52H/N57Y/Q100R/V110D/H115R/Y152C/K156M/F172S/C198R, N52S/E90A/H115R, N30D/K42E/N52S/H115R, N30D/K42E/N52S/H115R/C198R/R221I, N30D/K42E/N52S/H115R/C198R, N30D/K42E/N52S/H115R/F172S/N194D, N52S/H115R/F120S/I143V/C198R, N52S/H115R/F172S/C198R, N52H/N57Y/Q100P/C198R, N52H/N57Y/Q100P H115R/F172S/C198R, N52H/N57Y/Q100P/F172S/C198R, N52H/N57Y/Q100P/H115R, N52H/N57Y/Q100P/H115R/C198R, N52H/Q100R/C198R, N52H/Q100R/H115R/F172S, N52H/Q100R/F172S/C198R, N52H/Q100R/H115R/F172S/C198R или N52H/N57Y/Q100R/F172S/C198R.

В некоторых из любых таких воплощений одна или несколько аминокислотных модификаций выбраны из N52Y/N57Y/F138L/L203P, N52H/N57Y/Q100P, N52S/Y146C/Y152C, N52H/C198R, N52H/C140del/T225A, N52H/C198R/T225A, N52H/K92R, N57Y/Q100P, N52S/C198R, N52Y/N57Y/Y152C, N52Y/N57Y/H129P/C198R, N52H/L161P/C198R, N52S/T113E, N52S/S54P, N52K/L208P, N52S/Y152H, N52H/I143T, N52S/R75Q/L203P, N52S/D158G или N52D/Q133H. В некоторых из таких воплощений одна или несколько аминокислотных модификаций выбраны из N52H/N57Y/F138L/L203P, N52H/N57Y/Q100P, N52H/K92R, N52H/C140del/T225A, N52H/C198R/T225A, N52H/K92R, N57Y/Q100P, N52Y/N57Y/H129P/C198R, N52H/L161P/C198R, N52K/L208P или N52H/I143T.

В некоторых из любых таких воплощений вариантный полипептид ICOSL специфически связывается с эктодоменом CTLA-4 с повышенной аффинностью по сравнению с немодифицированным ICOSL. В некоторых аспектах повышенная аффинность к эктодомену CTLA-4 увеличивается более чем в 1,2, в 1,5, в 2, в 3, в 4, в 5, в 6, в 7, в 8, в 9, в 10, в 20, в 30, в 40, в 50, в 60 или в 70 раз по сравнению с немодифицированным ICOSL.

В некоторых из любых таких воплощений вариантный полипептид специфически связывается с эк-

тодомеом ICOS, CD28 или CTLA-4 с повышенной селективностью по сравнению с немодифицированным ICOSL. В некоторых воплощениях повышенная селективность включает более высокое соотношение связывания вариантного полипептида с одним когнатным партнером связывания, выбранным из ICOS, CD28 и CTLA4, по сравнению с другим когнатным партнером связывания, по сравнению с соотношением связывания немодифицированного полипептида ICOSL с одним когнатным партнером связывания по сравнению с другим когнатным партнером связывания. В некоторых случаях это соотношение больше, по меньшей мере, или, по меньшей мере, около в 1,5, в 2,0, в 3,0, в 4, в 5, в 10, в 15, в 20, в 30, в 40, в 50 раз или более.

В некоторых воплощениях любого из вариантных полипептидов ICOSL, вариантный полипептид ICOSL дополнительно включает одну или несколько аминокислот из M10V, M10I, V11E, S13G, E16V, S18R, A20V, S25G, F27S, F27C, N30D, Q37R, K42E, T43A, Y47H, N52H, N52D, N52S, N52Q, N52Y, N52K, S54A, S54P, N57D, N57Y, R61S, R61C, Y62F, L67P, A71T, G72R, L74Q, R75Q, D77G, F78L, L80P, N84Q, D89G, E90A, K92R, F93L, H94E, H94D, L96F, L96I, V97A, L98F, S99G, Q100R, Q100K, Q100P, L102R, G103E, V107A, V107I, S109G, S109N, V110D, V110N, V110A, T113E, H115R, H115Q, V116A, A117T, F120S, F120I, S121G, V122A, V122M, S126T, S126R, H129P, S130G, S132F, Q133H, E135K, F138L, T139S, C140D, C140del, S142F, I143V, I143T, N144D, Y146C, V151A, Y152C, Y152H, W153R, I154F, N155H, N155Q, K156M, D158G, L161P, L161M, L166Q, N168Q, F172S, L173S, M175T, T190A, T190S, S192G, V193M, N194D, C198R, N201S, L203P, L203F, N207Q, L208P, V210A, S212G, D217V, I218T, I218N, E220G, R221G, R221I, I224V, T225A, N227K или их консервативной аминокислотной замены. В некоторых воплощениях любого из вариантных полипептидов ICOSL, вариантный полипептид ICOSL дополнительно включает одну или несколько делеций аминокислот, соответствующих положению 140 в SEQ ID NO: 32.

В некоторых воплощениях любого из вариантных полипептидов ICOSL, одну или несколько аминокислотных замен выбирают из числа N52Y/N57Y/F138L/L203P, N52H/N57Y/Q100P, N52S/Y146C/Y152C, N52H/C198R, N52H/C140D/T225A, N52H/C198R/T225A, N52H/K92R, N57Y/Q100P, N52S/C198R, N52Y/N57Y/Y152C, N52Y/N57Y/H129P/C198R, N52H/L161P/C198R, N52S/T113E, N52D/S54P, N52K/L208P, N52S/Y152H, N52H/I143T, N52S/R75Q/L203P, N52S/D158G, N52D/Q133H, N52H/N57Y/Q100R/V110D/C198R/S212G, N52H/N57Y/Q100R/C198R, N52S/N194D, N52H/N57Y/Q100R/L102R/V110D/H115R/C198R, N52S/S54P, T38P/N52S/N57D, N52H/C140del/T225A, N52H/F78L/Q100R/C198R, N52H/N57Y/R75Q/Q100P/V110D, N52H/N57Y/L74Q/V110D/S192G, N52H/S121G/C198R, N52S/F120S/N227K, N52S/A71T/A117T/T190A/C198R, T43A/N52H/N57Y/L74Q/D89G/V110D/F172S, N52H/N57Y/Q100R/V110D/S132F/M175T или N52H/N57Y/Q100R/V107I/V110D/I154F/C198R/R221G.

В некоторых воплощениях любого из вариантных полипептидов ICOSL, одну или несколько аминокислотных замен выбирают из N52H/N57Y/F138L/L203P, N52H/N57Y/Q100P, N52H/K92R, N52H/C140del/T225A, N52H/C198R/T225A, N52H/K92R, N57Y/Q100P, N52Y/N57Y/H129P/C198R, N52H/L161P/C198R, N52K/L208P, N52H/I143T, A20V/N52H/N57Y/Q100R/S109G, N52H/N57Y/R61S/Q100R/V110D/L173S, N52H/N57Y/Q100R/V107I/V110D/S132F/I154F/C198R/R221G, Q37R/N52H/N57Y/Q100R/V110N/S142F/C198R/D217V/R221G, N52H/N57Y/Q100R/V110D/C198R, F27S/N52H/N57Y/V110N, S18R/N52S/F93L/I143V/R221G, A20T/N52D/Y146C/Q164L, N52H/N57Y/H94E/L96I/F120I/S126T/W153R/I218N, N52H/N57Y/Q100R/V110D/F172S/C198R, S25G/F27C/N52H/N57Y/Q100R/V110D/E135K/L173S/C198R или M10I/S13G/N52H/N57Y/D77G/V110A/H129P/I143V/F172S/V193M/C198R.

В некоторых воплощениях любого из вариантных полипептидов ICOSL, вариантный полипептид ICOSL специфически связывается с эктодомеом ICOS или CD28 с повышенной аффинностью и специфически связывается с эктодомеом другого из числа ICOS или CD28 с пониженной аффинностью по сравнению с немодифицированным ICOSL. В некоторых воплощениях вариантный полипептид ICOSL специфически связывается с эктодомеом ICOS с повышенной аффинностью и специфически связывается с эктодомеом CD28 с пониженной аффинностью по сравнению с немодифицированным ICOSL. В некоторых воплощениях одна или несколько аминокислотных замен выбраны из N57Y/Q100P, N52S/S130G/Y152C, N52S/Y152C, N52Y/N57Y/Y152C, N52H/L161P/C198R, N52H/L161P/C198R, N52S/L80P, A20V/N52H/N57Y/Q100R/S109G, N52H/N57Y/R61S/Q100R/V110D/L173S, N52H/N57Y/Q100R/V107I/V110D/S132F/I154F/C198R/R221G, Q37R/N52H/N57Y/Q100R/V110N/S142F/C198R/D217V/R221G, N52H/N57Y/Q100R/V110D/C198R, F27S/N52H/N57Y/V110N, S18R/N52S/F93L/I143V/R221G, A20T/N52D/Y146C/Q164L, N52H/N57Y/H94E/L96I/F120I/S126T/W153R/I218N, N52H/N57Y/Q100R/V110D/F172S/C198R, S25G/F27C/N52H/N57Y/Q100R/V110D/E135K/L173S/C198R или M10I/S13G/N52H/N57Y/D77G/V110A/H129P/I143V/F172S/V193M/C198R.

В некоторых воплощениях вариантный полипептид ICOSL специфически связывается с эктодомеом CD28 с повышенной аффинностью и специфически связывается с эктодомеом ICOS с пониженной аффинностью по сравнению с немодифицированным ICOSL. В некоторых воплощениях вариантный полипептид ICOSL включает аминокислотные замены N52S/R75Q/L203P или N30D/K42E/N52S.

В некоторых воплощениях любого из вариантных полипептидов ICOSL ICOS является ICOS человека. В некоторых воплощениях CD28 представляет собой CD28 человека.

В некоторых воплощениях любого из вариантных полипептидов ICOSL, связывание изменяется (увеличивается или уменьшается) более чем в 1,2, в 1,5, в 2, в 3, в 4, в 5, в 6, в 7, в 8, в 9, в 10, в 20, в 30, в 40, в 50 раз по сравнению с немодифицированным ICOSL.

В некоторых воплощениях любого из вариантных полипептидов ICOSL, вариантный полипептид ICOSL представляет собой растворимый белок.

В некоторых воплощениях любого из вариантных полипептидов ICOSL, вариантный полипептид ICOSL связан с доменом мультимеризации. В некоторых воплощениях вариантный полипептид ICOSL представляет собой мультимерный полипептид, необязательно димерный полипептид, содержащий первый вариантный полипептид ICOSL, связанный с доменом мультимеризации, и второй вариантный полипептид ICOSL, связанный с доменом мультимеризации. В некоторых воплощениях первый вариантный полипептид ICOSL и второй вариантный полипептид ICOSL являются одинаковыми или разными. В некоторых воплощениях домен мультимеризации является доменом Fc или его вариантом с пониженной эффекторной функцией. В некоторых воплощениях любого из вариантных полипептидов ICOSL вариантный полипептид ICOSL связан с фрагментом, который увеличивает биологический период полувыведения полипептида.

В некоторых воплощениях вариантный полипептид ICOSL связан с доменом Fc или его вариантом с пониженной эффекторной функцией. В некоторых воплощениях домен Fc принадлежит млекопитающему, необязательно человеку; или вариант домена Fc включает одну или несколько аминокислотных модификаций по сравнению с немодифицированным доменом Fc, который принадлежит млекопитающему, необязательно человеку. В некоторых воплощениях домен Fc или его вариант включает аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 226 или SEQ ID NO: 227, или аминокислотную последовательность, которая имеет, по меньшей мере, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичности с последовательностью SEQ ID NO: 226 или SEQ ID NO: 227.

В некоторых воплощениях домен Fc включает одну или несколько аминокислотных модификаций выбранных из E233P, L234A, L234V, L235A, L235E, G236del, G237A, S267K, R292C, N297G и V302C, каждая из которых в соответствии с нумерацией EU. В некоторых аспектах домен Fc включает аминокислотную модификацию C220S в соответствии с нумерацией EU. В некоторых воплощениях домен Fc включает аминокислотную последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO: 474, 476, 477, 478 или аминокислотную последовательность, которая имеет, по меньшей мере, 85% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 474, 476, 477, 478 и которая включает одну или несколько аминокислотных модификаций и/или проявляет сниженную эффекторную функцию.

В некоторых воплощениях вариантный полипептид ICOSL связан косвенно с доменом мультимеризации или Fc через линкер, необязательно линкер G4S.

В некоторых воплощениях любого из вариантных полипептидов ICOSL, вариантный полипептид ICOSL представляет собой иммуномодулирующий трансмембранный белок, который дополнительно включает трансмембранный домен, связанный с внеклеточным доменом (ECD) или его специфическим связывающим фрагментом вариантного полипептида ICOSL. В некоторых воплощениях трансмембранный домен включает аминокислотную последовательность, обозначенную как остатки 257-277 из SEQ ID NO: 5, или ее функциональный вариант, который проявляет, по меньшей мере, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичности с остатками 257-277 из SEQ ID NO: 5. В некоторых воплощениях вариантный полипептид ICOSL дополнительно включает цитоплазматический сигнальный домен, связанный с трансмембранным доменом. В некоторых воплощениях цитоплазматический сигнальный домен включает аминокислотную последовательность, обозначенную как остатки 278-302 из SEQ ID NO: 5, или их функциональный вариант, который имеет, по меньшей мере, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичности с остатками 278-302 из SEQ ID NO: 5.

В некоторых из любых таких воплощений вариантный полипептид ICOSL, включающий аминокислотную последовательность, указанный в любом из SEQ ID NO: 494-503 или аминокислотную последовательность, которая проявляет, по меньшей мере, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичности к любой из SEQ ID NO: 494-503 и которая включает одну или несколько описанных аминокислотных модификаций.

В некоторых воплощениях любого из вариантных полипептидов ICOSL, вариантный ICOSL увеличивает экспрессию IFN-гамма (интерферон-гамма) по сравнению с немодифицированным ICOSL в *in vitro* анализе первичных Т-клеток. В некоторых воплощениях любого из описанных выше вариантных полипептидов ICOSL, вариантный полипептид ICOSL уменьшает экспрессию IFN-гамма (интерферона-гамма) по отношению к немодифицированному ICOSL в *in vitro* анализе первичных Т-клеток. В некоторых воплощениях любого из вариантных полипептидов ICOSL, описанных выше, вариантный полипептид ICOSL является дегликозилированным.

В некоторых воплощениях, предлагаемое в данном документе, является иммуномодулирующим белком, содержащим вариантный полипептид ICOSL по любому из представленных воплощений, связанный со вторым полипептидом, содержащим домен суперсемейства иммуноглобулина (IgSF). В неко-

торых воплощениях домен IgSF имеет модифицированную аффинность и проявляет измененное связывание с одним или несколькими его когнатными партнерами по связыванию по сравнению с немодифицированным доменом IgSF или доменом IgSF дикого типа. В некоторых воплощениях домен IgSF проявляет повышенное связывание с одним или несколькими его когнатными партнерами по связыванию по сравнению с немодифицированным доменом IgSF или доменом IgSF дикого типа. В некоторых воплощениях вариантный полипептид ICOSL представляет собой первый вариантный полипептид ICOSL, а домен IgSF второго полипептида представляет собой домен IgSF из второго вариантного полипептида ICOSL в соответствии с любым из предлагаемых воплощений, где первый и второй варианты ICOSL представляют собой одинаковые или разные. В некоторых воплощениях вариантный полипептид ICOSL способен специфически связываться с CD28 или ICOS, а домен IgSF второго полипептида способен связываться с когнатным партнером связывания, отличным от специфически связанного с вариантным полипептидом ICOSL. В некоторых воплощениях домен IgSF относится к представителю семейства B7. В некоторых воплощениях домен IgSF представляет собой локализирующий в опухоли фрагмент, который связывается с лигандом, экспрессируемым на опухоли, или представляет собой локализирующий в воспалении фрагмент, который связывается с лигандом, экспрессируемым на клетке или ткани воспалительной среды. В некоторых воплощениях домен IgSF представляет собой локализирующий в опухоли фрагмент, который связывается с лигандом, экспрессируемым на опухоли. В некоторых воплощениях лиганд представляет собой B7H6. В некоторых воплощениях домен IgSF представляет собой NKp30. В некоторых воплощениях домен IgSF является или включает домен IgV. В некоторых воплощениях вариантный полипептид ICOSL является или включает домен IgV.

В некоторых воплощениях в соответствии с каким-либо одним из иммуномодулирующих белков, иммуномодулирующий белок включает домен мультимеризации, связанный с одним или обоими из вариантных полипептидов ICOSL или вторым полипептидом, включающим домен IgSF. В некоторых воплощениях домен мультимеризации является доменом Fc или его вариантом с пониженной эффекторной функцией. В некоторых воплощениях иммуномодулирующий белок является димерным.

В некоторых воплощениях иммуномодулирующий белок является гомодимерным. В некоторых случаях иммуномодулирующий белок является гетеродимерным.

В некоторых воплощениях предлагаемое в данном документе, представляет собой конъюгат, включающий вариантный полипептид ICOSL по любому из воплощений или иммуномодулирующий полипептид по любому из воплощений, связанный с функциональным фрагментом. В некоторых воплощениях функциональный фрагмент представляет собой нацеливающую функциональную составляющую, которая специфически связывается с молекулой на поверхности клетки. В некоторых воплощениях нацеливающий функциональный фрагмент специфически связывается с молекулой на поверхности иммунной клетки. В некоторых воплощениях иммунная клетка представляет собой антигенпредставляющую клетку или лимфоцит. В некоторых воплощениях нацеливающий функциональный фрагмент представляет собой локализирующий в опухоли фрагмент, который связывается с молекулой на поверхности опухоли. В некоторых воплощениях фрагмент представляет собой белок, пептид, нуклеиновую кислоту, небольшую молекулу или наночастицу. В некоторых воплощениях фрагмент представляет собой антигенсвязывающий фрагмент. В некоторых воплощениях конъюгат является двухвалентным, четырехвалентным, шестивалентным или октавалентным.

В некоторых воплощениях, предлагаемое в данном документе представляет собой нуклеотидную молекулу, кодирующую вариантный ICOSL по любому одному из предлагаемых воплощений, или иммуномодулирующий полипептид по любому из предлагаемых воплощений. В некоторых воплощениях нуклеотидная молекула представляет собой синтетическую нуклеиновую кислоту. В некоторых воплощениях нуклеиновая кислота представляет собой кДНК.

В некоторых воплощениях предлагаемое в данном документе представляет собой вектор, содержащий нуклеиновую кислоту по любому из представленных воплощений. В некоторых воплощениях вектор представляет собой экспрессирующий вектор. В некоторых воплощениях вектор представляет собой экспрессирующий вектор млекопитающих или вирусный вектор.

В некоторых воплощениях предлагаемое в данном документе представляет собой клетку, содержащую вектор по любому из предусмотренных воплощений. В некоторых воплощениях клетка представляет собой клетку млекопитающего. В некоторых воплощениях клетка представляет собой клетку человека.

В некоторых воплощениях предлагаемое в данном документе представляет собой способ получения полипептида или иммуномодулирующего белка, включающий введение молекулы нуклеиновой кислоты по любому из представленных воплощений или вектора по любому из представленных воплощений в клетку-хозяина в условиях для экспрессии белка в клетке. В некоторых воплощениях способ дополнительно включает выделение или очистку вариантного полипептида ICOSL или иммуномодулирующего белка из клетки.

В некоторых воплощениях предлагаемое в данном документе представляет собой способ конструирования клетки, экспрессирующей вариантный полипептид ICOSL, включающий введение молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей вариантный полипептид ICOSL или иммуномодулирующий поли-

пептид по любому из представленных воплощений в клетку-хозяина в условиях, в котором полипептид экспрессируется в клетке. В некоторых воплощениях предлагаемое в данном документе представляет собой сконструированную клетку, экспрессирующую вариантный полипептид ICOSL, иммуномодулирующий полипептид, нуклеотидную молекулу или вектор в соответствии с любым из предлагаемых воплощений.

В некоторых воплощениях вариантный полипептид ICOSL или иммуномодулирующий полипептид включает сигнальный пептид. В некоторых аспектах вариантный полипептид ICOSL или иммуномодулирующий полипептид не включает трансмембранного домена и/или не экспрессируется на поверхности клетки. В некоторых случаях вариантный полипептид ICOSL или иммуномодулирующий полипептид секретируется из сконструированной клетки. В некоторых аспектах сконструированная клетка включает вариантный полипептид ICOSL, который включает трансмембранный домен и/или представляет собой трансмембранный иммуномодулирующий белок в соответствии с любым из предлагаемых воплощений. В некоторых воплощениях вариантный полипептид ICOSL экспрессируется на поверхности клетки.

В некоторых воплощениях сконструированная клетка является иммунной клеткой. В некоторых воплощениях иммунная клетка представляет собой антигенпредставляющую клетку (APC) или лимфоцит. В некоторых воплощениях сконструированная клетка является первичной клеткой. В некоторых воплощениях сконструированная клетка представляет собой клетку млекопитающего. В некоторых воплощениях сконструированная клетка представляет собой человеческую клетку. В некоторых воплощениях лимфоцит представляет собой Т-клетку. В некоторых воплощениях APC является искусственным APC. В некоторых воплощениях сконструированная клетка дополнительно включает химерный антигенный рецептор (CAR) или сконструированный Т-клеточный рецептор (TCR).

Также предлагаемое представляет собой инфекционный агент, включающий нуклеотидную молекулу, кодирующую вариантный полипептид ICOSL или иммуномодулирующий полипептид по любому из представленных воплощений. В некоторых воплощениях кодируемый вариантный полипептид ICOSL или иммуномодулирующий полипептид не включает трансмембранный домен и/или не экспрессируется на поверхности клетки, в которой он экспрессируется. В некоторых случаях кодируемый вариантный полипептид ICOSL или иммуномодулирующий полипептид секретируется из клетки, в которой он экспрессируется. В некоторых случаях кодируемый вариантный полипептид ICOSL включает трансмембранный домен. В некоторых воплощениях кодированный вариантный полипептид ICOSL экспрессируется на поверхности клетки, в которой он экспрессируется.

В некоторых воплощениях инфекционный агент представляет собой бактерию или вирус. В некоторых примерах вирус является онколитическим вирусом. В некоторых аспектах онколитический вирус представляет собой аденовирусы, адено-ассоциированные вирусы, вирусы герпеса, вирус простого герпеса, вирус везикулярного стоматита, реовирус, вирус Ньюкаслской болезни, парвовирус, вирус кори, вирус везикулярного стоматита (VSV), вирус Коксаки или вирус коровьей оспы. В некоторых воплощениях вирус специфически нацелен на дендритные клетки (DC) и/или является тропным к дендритным клеткам. В некоторых воплощениях вирус представляет собой лентивирусный вектор, который псевдо-типизируется модифицированным продуктом оболочки вируса Синдбис.

В некоторых любых таких воплощениях, инфекционный агент дополнительно включает нуклеотидную молекулу, кодирующую дополнительный генный продукт, который приводит к гибели клетки-мишени, или который может усилить или активизировать иммунную реакцию. В некоторых воплощениях дополнительный генный продукт выбирают из противоопухолевого агента, антиметастатического агента, антиангиогенного агента, иммуномодулирующей молекулы, ингибитора иммунной контрольной точки, антитела, цитокина, фактора роста, антигена, продукта цитотоксического гена, продукта проапоптотического гена, продукта антиапоптотического гена, гена деградации клеточной матрицы, гена регенерации тканей или перепрограммирования соматических клеток человека в плюрипотентные.

В некоторых воплощениях предлагаемое в данном документе, представляет собой фармацевтическую композицию, содержащую вариантный полипептид ICOSL по любому из представленных воплощений, иммуномодулирующий белок по любому из представленных воплощений, конъюгат по любому из представленных воплощений, сконструированную клетку по любому из предлагаемых воплощений или инфекционный агент по любому из предлагаемых воплощений. В некоторых воплощениях фармацевтическая композиция дополнительно включает фармацевтически приемлемый эксципиент. В некоторых воплощениях фармацевтическая композиция является стерильной.

В некоторых воплощениях предлагаемое в данном документе представляет собой изделие, которое включает любую из фармацевтических композиций, в ампуле. В некоторых воплощениях флакон герметизирован. В некоторых воплощениях также представлен набор, включающий любые фармацевтические композиции и инструкции для применения. В некоторых аспектах представлен набор, включающий изделие и инструкции по применению.

В некоторых воплощениях предлагаемое в данном документе относится к способу модуляции иммунного ответа у объекта, включающему введение объекту фармацевтической композиции по любому из предлагаемых воплощений. В некоторых воплощениях способ включает введение сконструированных клеток, как предусмотрено в соответствии с любым из предлагаемых воплощений. В некоторых вопло-

щениях сконструированные клетки являются аутологичными для объекта. В некоторых воплощениях сконструированные клетки являются аллогенными для объекта. В некоторых воплощениях модуляция иммунного ответа лечит заболевание или состояние у объекта.

В некоторых воплощениях иммунный ответ увеличивается. В некоторых воплощениях объекту вводят иммуномодулирующий белок или конъюгат, включающий вариантный полипептид ICOSL, связанный с функциональным фрагментом, локализирующим в опухоли. В некоторых случаях функциональный фрагмент, локализирующий в опухоли, представляет собой или включает связывающую молекулу, которая распознает опухолевый антиген. В некоторых аспектах связывающая молекула включает анти-тело или его антигенсвязывающий фрагмент или включает домен IgSF дикого типа или его вариант.

В некоторых из любых таких воплощений фармацевтическую композицию, включающую иммуномодулирующий белок по любому из предусмотренных воплощений или конъюгат по любому из предусмотренных воплощений вводят объекту. В некоторых воплощениях сконструированная клетка, содержащая вариантный полипептид ICOSL, который представляет собой трансмембранный иммуномодулирующий белок, и/или сконструированная клетка в соответствии с любым из воплощений, описанных выше, вводится объекту.

В некоторых воплощениях инфекционный агент, кодирующий вариантный полипептид ICOSL, который представляет собой трансмембранный иммуномодулирующий белок, вводят объекту, при необходимости в условиях, в которых инфекционный агент заражает клетку опухоли или иммунную клетку и трансмембранный иммуномодулирующий белок экспрессируется на поверхность инфицированной клетки. В некоторых аспектах трансмембранный иммуномодулирующий белок является любым, предусмотренным в соответствии с любым из представленных воплощений.

В некоторых воплощениях заболевание или состояние представляет собой опухоль или злокачественное новообразование. В некоторых воплощениях заболевание или состояние выбраны из меланомы, рака легкого, рака мочевого пузыря, гематологической злокачественной опухоли, рака печени, рака мозга, рака почки, рака молочной железы, рака поджелудочной железы, колоректального рака, рака селезенки, рака предстательной железы, рака яичек, рака яичников, рака матки, рака желудка, мышечно-скелетного злокачественного новообразования, рака головы и шеи, рака желудочно-кишечного тракта, рака зародышевых клеток или эндокринного и нейроэндокринного рака.

В некоторых воплощениях иммунный ответ снижается с помощью предлагаемых способов модуляции иммунного ответа. В некоторых воплощениях вариантный полипептид ICOSL или иммуномодулирующий белок, который является растворимым, вводят объекту. В некоторых случаях растворимый полипептид или иммуномодулирующий белок представляет собой слитый с Fc белок. В некоторых воплощениях объекту вводят фармацевтическую композицию, содержащую вариантный полипептид ICOSL в соответствии с любым из предлагаемых воплощений или иммуномодулирующий белок в соответствии с любым из предлагаемых воплощений.

В некоторых из любых таких воплощений, сконструированная клетка, включающая секретируемый вариантный полипептид ICOSL, вводится объекту. В некоторых воплощениях объекту вводится сконструированная клетка по любому из предлагаемых воплощений. В некоторых воплощениях инфекционный агент, кодирующий вариантный полипептид ICOSL, который является секретируемым иммуномодулирующим белком, вводится объекту, необязательно в условиях, при которых инфекционный агент инфицирует опухолевую клетку или иммунную клетку, и секретируемый иммуномодулирующий белок секретируется из инфицированной клетки.

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

В некоторых из любых таких воплощений вариантного полипептида ICOSL аминокислотная модификация представляет собой замену, вставку или делецию аминокислоты.

Краткое описание чертежей

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

На фиг. 2A показано, что первичные Т-клетки эффективно трансдуцируются вирусами, кодирую-

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

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

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

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

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

На фиг. 7A-D изображены различные конечные точки в мышинной модели реакции трансплантат против хозяина (GVHD), где человеческие PBMC-клетки были адоптивно перенесены в иммунодефицитных хозяев, NSG-мышей. На фиг. 7A показаны кривые выживаемости обработанных животных. Аг-

рессивное течение болезни и последующую смертность наблюдали у животных с контрольным физрас-твором, при этом наблюдали одинаковую выживаемость у животных, получавших ICOSL-Fc дикого типа, а также вариантный ICOSL N52H/I143T. Вариант N52H/N57Y/Q100P имел улучшенные показатели выживаемости, сравнимые с клиническим эталоном белатацептом. На фиг. 7B показаны аналогичные тенденции в потере массы тела с вариантом ICOSL N52H/N57Y/Q100P, демонстрирующим аналогичное поддержание массы, как у животных, обработанных белатацептом, хотя все остальные группы испытывали быструю потерю массы. Фиг. 7C демонстрирует клинические баллы по стандартизованному индексу активности (DAI) заболевания GVHD, опять демонстрируя более низкие баллы у животных, получавших вариантный ICOSL N52H/N57Y/Q100P, что сопоставимо с клиническим эталоном белатацептом, в то время как другие группы животных получали более высокие баллы DAI. Фиг. 7D показано проточное цитометрическое измерение CD4 и CD8 в крови у экспериментальных животных, проведенное на 14-й день. Процент клеток CD8 между экспериментальными группами был в основном одинаковым, однако животные, обработанные вариантом ICOSL N52H/N57Y/Q100P и белатацептом, имели более низкий процент CD4-клеток по сравнению с другими экспериментальными группами.

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

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

На фиг. 10A-C показаны различные примерные конфигурации вариантного домена IgSF (vIgD), конъюгированного с антителом (V-Mab). На фиг. 10A показаны различные конфигурации, в которых vIgD непосредственно или косвенно связан с N- и/или C-концом легкой цепи антитела. На фиг. 10B показаны различные конфигурации, в которых vIgD непосредственно или косвенно связан с N- и/или C-концом тяжелой цепи антитела. На фиг. 10C показаны итоговые конфигурации V-Mab, когда легкая цепь по фиг. 10A и тяжелая цепь по фиг. 10B совместно экспрессировались в клетке.

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

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

На фиг. 13A-C показаны различные форматы предоставленных вариантов молекул домена IgSF. Фиг. 13A демонстрирует растворимые молекулы, включая: (1) вариантный домен IgSF (vIgD), слитый с цепью Fc; (2) стековая молекула, содержащая первый вариантный домен IgSF (первый vIgD) и второй

домен IgSF, такой, как второй вариантный домен IgSF (второй vIgD); (3) молекула IgSF, нацеленная на опухоль, содержащая первый вариантный домен IgSF (vIgD) и домен IgSF, который нацелен на опухолевый антиген, такой как домен IgSF Nkp30; и (4) вариантный домен IgSF (vIgD), связанный с антителом (V-Mab). Фиг. 13B продемонстрирован трансмембранный иммуномодулирующий белок (TIP), содержащий вариантный домен IgSF (vIgD), например вариантный ICOSL, экспрессируемый на поверхности клетки. В примерном воплощении когнатный партнер связывания трансмембранного связанного vIgD представляет собой костимулирующий рецептор, например CD28, а TIP, содержащий vIgD (например, ICOSL vIgD), выступает в качестве антагониста по отношению к костимулирующему рецептору, так что TIP индуцирует положительный сигнал в клетке, экспрессирующей костимулирующий рецептор. Фиг. 13C демонстрирует секретлируемый иммуномодулирующий белок (SIP), в котором вариантный домен IgSF (vIgD), например, вариантный ICOSL, секретруется из клетки, такой как первая Т-клетка (например, CAR Т-клетки). В примерном воплощении когнатный партнер связывания секретлируемого vIgD представляет собой активирующий рецептор, например CD28, который может быть экспрессирован в первой клетке (например, Т-клетке) и/или во второй клетке (например, Т-клетке, либо эндогенной, либо сконструированной, такой как CAR Т-клетка). При связывании SIP с его когнатным партнером связывания блокируется сигнализация через активирующий рецептор. Во всех случаях vIgD может быть только V-доменом (IgV), комбинацией V-домена (IgV) и C-домена (IgC), включая весь внеклеточный домен (ECD) или любую комбинацию Ig-доменов представителя суперсемейства IgSF.

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

На фиг. 15 показана примерная схема стековой молекулы для локализации вариантного домена IgSF (vIgD) в опухолевой клетке. В этом формате стековая молекула включает первый вариантный домен IgSF (первый vIgD) и второй домен IgSF (например, второй vIgD), в котором второй домен IgSF (например, второй vIgD) представляет собой домен IgSF, нацеленный на опухоль, который связывается с опухолевым антигеном. Примерный домен IgSF, нацеленный на опухоль, представляет собой домен IgSF Nkp30, который связывается с опухолевым антигеном B7-H6. На этом изображении vIgD является вариантом домена IgSF из ICOSL. Как показано, связывание домена IgSF, нацеленного на опухоль, на поверхности опухолевой клетки локализует первый vIgD на поверхности опухолевых клеток, где он может взаимодействовать с одним или несколькими его когнатными партнерами по связыванию (например, CD28 или ICOS), экспрессированными на поверхности соседней иммунной клетки (например, Т-клетки) для стимуляции костимулирующего рецептора.

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

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

Фиг. 18 изображает транскрипционную сигнатуру первичных Т-клеток человека при инкубации с 10 нМ анти-CD3 с 40 нМ контрольного белка Fc, ICOSL-Fc дикого типа, CD80-Fc дикого типа, с обоими этими белками или вариантами ICOSL-слитыми с Fc белками с указанными мутациями. Общую РНК из образцов получали из собранных клеток и переносили РНК на "Nanosttring", а чип "Cancer Immune" использовали для количественного определения транскриптов 750 генов в каждом образце. Измененные транскрипты включают те, уровень которых выше или ниже диагностированных, включая отмеченные транскрипты.

На фиг. 19 показаны уровни транскриптов примерных транскриптов при инкубации, как описано на

фиг. 18 в указанные моменты времени в присутствии различных иммуномодулирующих белков.

На фиг. 20А, В показана VmAb-опосредованная пролиферация Т-клеток при совместном культивировании с мишенями, экспрессирующими HER2. Меченые CFSE пан Т-клетки активировали с помощью искусственных клеток-мишеней, полученных из клеток K562, презентующих анти-CD3 одноцепочечные Fv (ОКТ3) и HER2 на поверхности клетки, в присутствии VmAb или контрольных белков. Пролиферацию измеряли с помощью проточного цитометрического анализа по разведению CFSE в окрашенных CD4⁺ (левая панель) или окрашенных CD8⁺ (правая панель) Т-клетках. На фиг. 20А клетки K562 титровали и покрывали с Т-клетками в соотношении эффектор:мишень (Е:Т) от 40 до 1280:1. VmAb, родительский домен IgSF или WT ICOSL добавляли при 1000 пМ. На фиг. 20В клетки K562 добавляли к Т-клеткам для соотношения Е:Т 160:1. VmAb или контрольные белки титровали и добавляли при температуре от 3000 до 37 пМ.

Подробное описание

Предлагаемое в данном документе является иммуномодулирующими белками, которые представляют собой или включают варианты или мутанты лиганда ICOS (ICOSL) или их специфические связывающие фрагменты, которые обладают активностью связываться, по меньшей мере, с одним когнатным партнером связывания целевого лиганда (также называемым контрструктурным белком). В некоторых воплощениях варианты полипептиды ICOSL содержат одну или несколько аминокислотных модификаций (например, аминокислотные замены, делеции или добавления) по сравнению с немодифицированным полипептидом ICOSL или полипептидом ICOSL дикого типа. В некоторых воплощениях одна или несколько аминокислотных модификаций (например, аминокислотные замены, делеции или добавления) находятся в домене IgSF (например, IgV) немодифицированного полипептида ICOSL или полипептида ICOSL дикого типа. В некоторых воплощениях вариантный полипептид ICOSL демонстрирует измененную, например, повышенную или пониженную, связывающую активность или аффинность, по меньшей мере, по отношению к одному когнатному связывающему партнеру, такому как, по меньшей мере, один из ICOS, CD28 или CTLA-4. В некоторых воплощениях иммуномодулирующие белки являются растворимыми. В некоторых воплощениях иммуномодулирующими белками являются трансмембранные иммуномодулирующие белки, способные экспрессироваться на поверхности клеток. В некоторых воплощениях в данном документе также представлены один или несколько других иммуномодулирующих белков, которые представляют собой конъюгаты или слитые белки, содержащие вариантный полипептид ICOSL, представленный в данном документе, и один или несколько других фрагментов или полипептидов.

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

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

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

В некоторых воплощениях, среди известных Т-клеточных костимулирующих рецепторов представлен CD28, который является Т-клеточным рецептором для костимулирующих лигандов B7-1 (CD80) и B7-2 (CD86), оба из которых присутствуют на APC. Эти же лиганды могут также связываться с ингибирующим Т-клеточным рецептором CTLA4 (цитотоксический Т-лимфоцитарный белок 4) с большей аффинностью, чем с CD28; связывание с CTLA-4 действует для понижающей модуляции иммунного ответа. ICOS (индуцируемый костимулятор) является еще одним Т-клеточным костимулирующим рецептором, который связывается с лигандом ICOS (ICOSL) на APC. В некоторых случаях также известно, что CD28 и CTLA-4 взаимодействуют с ICOSL в сайте связывания, который перекрывается со связыванием ICOSL с Т-клеточным костимулирующим рецептором ICOS (Yao et al. (2011) Immunity, 34:729-740). Хотя CD28 и ICOS относятся к активирующим рецепторам семейства CD28, которые имеют некоторые общие внутриклеточные сигнальные мотивы, костимулирующие эффекты между CD28 и ICOS различаются.

ся. Например, CD28 экспрессируется как на неактивированных, так и на активированных Т-клетках, и его сигнальный путь важен для продуцирования IL-2 и последующей эффекторной функции Т-клеток. ICOS обычно не экспрессируется на поверхности Т-клеток до момента активации Т-клеток, а передача сигналов через ICOS на активированных Т-клетках поддерживает специализированную дифференцировку подмножества Т-клеток. Таким образом, в некоторых случаях коstimуляция CD28 и ICOS дает перекрывающиеся и дополнительные эффекты.

В некоторых воплощениях Т-клеточные коstimулирующие рецепторы CD28 и ICOS имеют различные, но взаимодополняющие роли в модуляции иммунного ответа. Усиление или подавление активности этих рецепторов имеет клиническое значение для лечения воспалительных и аутоиммунных заболеваний, злокачественных новообразований и вирусных инфекций. Однако в некоторых случаях терапии для вмешательства и изменения коstimулирующих эффектов обоих рецепторов ограничена требованиями пространственной ориентации, а также ограничениями по размеру, налагаемыми границами иммунологического синапса. В некоторых аспектах существующие терапевтические лекарственные средства, в том числе антитела, могут быть не способны взаимодействовать одновременно с несколькими целевыми белками, участвующими в модулировании этих взаимодействий. Кроме того, в некоторых случаях существующие терапевтические лекарственные средства могут обладать способностью к антагонизму, но не к агонизму в отношении иммунного ответа. Кроме того, фармакокинетические различия между лекарственными средствами, которые независимо нацелены на один или другой из этих двух рецепторов, могут создавать трудности в правильном поддержании желаемой концентрации в крови таких комбинаций лекарств на протяжении всего курса лечения.

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

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

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

I. Определения.

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

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

Термин "с модифицированной аффинностью", используемый в контексте домена суперсемейства иммуноглобулинов, означает домен суперсемейства иммуноглобулинов млекопитающих (IgSF), имеющий измененную аминокислотную последовательность (относительно соответствующего родительского или немодифицированного домена IgSF дикого типа), благодаря которой он имеет повышенную или пониженную аффинность или avidность связывания, по меньшей мере, по отношению к одному из его когнатных партнеров связывания (в ином случае "контрструктур") по сравнению с родительским контрольным доменом IgSF дикого типа или немодифицированным (т.е. без модифицированной аффинности) контрольным доменом IgSF. В этом контексте включен аффинный модифицированный домен ICOSL

IgSF. В некоторых воплощениях домен IgSF с модифицированной аффинностью может содержать 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 или более аминокислот, таких как аминокислотные замены, в домене IgSF дикого типа или в немодифицированном домене IgSF. Увеличение или уменьшение аффинности или avidности связывания можно определить с использованием хорошо известных анализов связывания, таких как проточная цитометрия. Larsen et al., *American Journal of Transplantation*, Vol 5: 443-453 (2005). См. также, Linsley et al., *Immunity*, 1: 7930801 (1994). Увеличение аффинности или avidности связывания белка или с его когнатным партнером(ами) является значением, по меньшей мере, на 10% большим, чем в случае контрольного значения домена IgSF дикого типа, а в некоторых воплощениях, по меньшей мере, на 20, 30, 40, 50, 100, 200, 300, 500, 1000, 5000 или 10000% больше, чем контрольное значение домена IgSF дикого типа. Снижение аффинности или avidности связывания белка, по меньшей мере, с одним из его когнатных партнеров связывания представляет собой значение не больше чем 90% от контроля, но не менее 10% контрольного значения домена IgSF дикого типа и в некоторых воплощениях не более 80, 70, 60, 50, 40, 30 или 20%, но не менее 10% от контрольного значения домена IgSF дикого типа. Белок с модифицированной аффинностью изменен в первичной аминокислотной последовательности заменой, добавлением или делецией аминокислотных остатков. Термин "домен IgSF с модифицированной аффинностью" не следует истолковывать как наложение какого-либо условия для какой-либо конкретной исходной композиции или способа, с помощью которого был создан домен с модифицированной аффинностью IgSF. Таким образом, аффинность модифицированных доменов IgSF по настоящему изобретению не ограничено доменами IgF дикого типа, которые затем трансформируются в домен IgSF с модифицированной аффинностью любым конкретным процессом модификации аффинности. Полипептид домена IgSF с модифицированной аффинностью, может, например, быть получен на основании информации о последовательности домена IgSF млекопитающего дикого типа, затем смоделирован *in silico* для связывания с его когнатным партнером связывания и, наконец, рекомбинантно или химически синтезирован так, чтобы получить композицию домена IgSF с модифицированной аффинностью объекта изобретения. В одном альтернативном примере домен IgSF с модифицированной аффинностью может быть создан путем сайт-направленного мутагенеза домена IgSF дикого типа. Таким образом, домен IgSF с модифицированной аффинностью обозначает продукт и не обязательно продукт, полученный любым данным способом. Могут быть использованы различные методы, включая рекомбинантные способы, химический синтез или их комбинации.

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

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

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

Термин "биологический период полувыведения" относится к количеству времени, которое требуется для вещества, такого как иммуномодулирующий полипептид, содержащего вариант ICOSL по настоящему изобретению, потерять половину своей фармакологической или физиологической активно-

сти или концентрации. На биологический период полувыведения может влиять выделение, экскреция, деградация (например, ферментативная) вещества или поглощение и концентрирование в определенных органах или тканях организма. В некоторых воплощениях биологический период полувыведения можно оценить, определив время, необходимое для того, чтобы концентрация в плазме крови в крови достигла половины своего уровня стационарного состояния ("период полувыведения в плазме"). Конъюгаты, которые могут быть использованы для дериватизации и увеличения биологического периода полувыведения полипептидов по изобретению, известны в данной области и включают, без ограничения указанным, полиэтиленгликоль (PEG), гидроксипропилкрахмал (HES), XTEN (удлиненные рекомбинантные пептиды, WO 2013130683), альбумин сыворотки человека (HSA), альбумин бычьей сыворотки (BSA), липиды (ацилирование) и поли-Pro-Ala-Ser (PAS), полиглутаминовую кислоту (глутамилирование).

Используемый в данном документе термин "химерный антигенный рецептор" или "CAR" относится к искусственному (то есть изготовленному человеком) трансмембранному белку, экспрессируемому в клетке млекопитающего, который включает, по меньшей мере, эктодомен, трансмембранный домен и эндодомен. Необязательно, белок CAR включает "спейсер", который ковалентно связывает эктодомен с трансмембранным доменом. Спейсер часто представляет собой полипептид, связывающий эктодомен с трансмембранным доменом посредством пептидных связей. CAR обычно экспрессируется в лимфоците млекопитающих. В некоторых воплощениях CAR экспрессируется в клетке млекопитающего, такой как Т-клетка или инфильтрирующий опухоль лимфоцит (TIL). CAR, экспрессируемый в Т-клетке, упоминается в данном документе как CAR Т-клетка или "CAR-T". В некоторых воплощениях CAR-T представляет собой хелперную Т-клетку, цитотоксическую Т-клетку, Т-клетку естественного киллера, Т-клетку памяти, регуляторную Т-клетку или гамма-дельта-Т-клетку. При использовании в клинической практике, например, при адоптивном переносе клеток, CAR-T с антигенсвязывающей специфичностью к опухоли пациента обычно конструируется для экспрессии на нативной Т-клетке, полученной из пациента. Сконструированная Т-клетка, экспрессирующая CAR, затем вводится обратно пациенту. Таким образом, CAR-T часто является аутологичной CAR-T, хотя аллогенные CAR-T включены в объем изобретения. Эктодомен CAR включает антигенсвязывающую область, такую как антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (например, scFv), который специфически связывается в физиологических условиях с антигеном, таким как опухолеспецифический антиген. При специфическом связывании биохимическая цепь событий (т.е. сигнальная трансдукция) приводит к модуляции иммунологической активности CAR-T. Так, например, при специфическом связывании антигенсвязывающей области CAR-T с его антигеном может приводить к изменениям иммунологической активности Т-клеток, что отражается на изменениях цитотоксичности, пролиферации или продукции цитокинов. Передача сигнала при активации CAR достигается в некоторых воплощениях CD3-дзета цепью ("CD3-z"), которая участвует в трансдукции сигнала в нативных Т-клетках млекопитающего. CAR-T могут дополнительно содержать несколько доменов сигнализации, таких как CD28, 41BB или OX40, для дальнейшей модуляции иммуномодулирующего ответа Т-клетки. CD3-z включает консервативный мотив, известный как мотив активации на основе тирозина на основе иммунорецептора (ITAM), который участвует в трансдукции сигнала Т-клеточного рецептора.

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

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

При использовании в данном описании, термин "конъюгат", "конъюгация" или его грамматические варианты относятся к присоединению или соединению вместе двух или более соединений, что приводит к образованию другого соединения, с помощью любых соединений или связывающих способов, известных в данной области техники. Он также может относиться к соединению, которое образуется путем объединения или соединения двух или более соединений. Например, вариант полипептид ICOSL, прямо или косвенно связанный с одним или несколькими химическими группами или полипептидом,

является примерным конъюгатом. Такие конъюгаты включают слитые белки, продуцируемые химическими конъюгатами, и те, которые получены любыми другими способами.

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

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

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

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

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

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

идентификации доменов можно использовать соответствующее программное обеспечение.

Термин "эктодомен", используемый в данном документе, относится к области мембранного белка, такого как трансмембранный белок, которая лежит за пределами везикулярной мембраны. Эктодомены часто включают связывающие домены, которые специфически связываются с лигандами или клеточными рецепторами поверхности, например, через связывающий домен, который специфически связывается с лигандом или рецептором поверхности клетки. Эктодомен клеточного трансмембранного белка попеременно называют внеклеточным доменом.

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

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

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

Используемый в данном документе термин "сконструированная клетка" относится к клетке млекопитающего, которая была генетически модифицирована путем вмешательства человека, например, методами рекомбинантных ДНК или вирусной трансдукцией. В некоторых воплощениях клетка представляет собой иммунную клетку, такую как лимфоцит (например, Т-клетка, В-клетка, НК-клетка) или антиген-представляющая клетка (например, дендритная клетка). Клетка может быть первичной клеткой из пациента или может быть клеточной линией. В некоторых воплощениях сконструированная клетка по изобретению включает вариантный ICOSL изобретения, спроектированный для модуляции иммунологической активности Т-клетки, экспрессирующей CD28, ICOS или CTLA-4, с которыми специфически связывается вариантный ICOSL. В некоторых воплощениях вариантный ICOSL представляет собой трансмембранный иммуномодулирующий белок (далее называемый "TIP"), включающий внеклеточный домен или его часть, содержащий домен IgV, связанный с трансмембранным доменом (например, трансмембранным доменом ICOSL) и, необязательно, внутриклеточную сигнальную область. В некоторых случаях TIP отформатирован как слитый рецептор, содержащий гетерологичный цитоплазматический сигнальный домен или эндодомен. В некоторых воплощениях, сконструированная клетка способна экспрессировать и секретировать в иммуномодулирующий белок, как описано в данном документе. Среди предлагаемого сконструированные клетки также являются клетками, дополнительно содержащими сконструированный Т-клеточный рецептор (TCR) или химерный антигенный рецептор (CAR).

Используемый в данном документе термин "сконструированная Т-клетка" относится к Т-клетке, такой как хелперная Т-клетка, цитотоксическая Т-клетка (в качестве варианта цитотоксический Т-лимфоцит или CTL), Т-клетка натурального киллера, регуляторная Т-клетка, Т-клетка памяти или гамма-дельта-Т-клетка, которая была генетически модифицирована путем вмешательства человека, например, методами рекомбинантных ДНК. Сконструированная Т-клетка включает трансмембранный иммуномо-

дулирующий белок (TIP) варианта ICOSL по настоящему изобретению, который экспрессируется на Т-клетке и сконструирован для модуляции иммунологической активности самой сконструированной Т-клетки или клетки млекопитающего, к которой специфически связывается вариантный ICOSL, экспрессируемый на Т-клетке. Термин "сконструированный Т-клеточный рецептор" или "сконструированный TCR" относится к Т-клеточному рецептору (TCR), сконструированному для специфического связывания с искомой аффинностью к главному комплексу гистосовместимости (МНС)/пептидному целевому антигену, который выбран, клонирован, и/или впоследствии вводится в популяцию Т-клеток, часто используемых для адоптивной иммунотерапии. В отличие от сконструированных TCR, CAR сконструированы таким образом, чтобы связывать целевые антигены МНС-независимым образом.

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

Термин "функциональный фрагмент, увеличивающий период полувыведения" относится к остатку слитого полипептида или химического конъюгата, который увеличивает период полувыведения белка, циркулирующего в сыворотке крови млекопитающих по сравнению с периодом полувыведения белка, который не конъюгирован с функциональным фрагментом. В некоторых воплощениях период полувыведения увеличивается более чем в 1,2, в 1,5, в 2,0, в 3,0, в 4, в 5,0 или в 6,0 раз. В некоторых воплощениях период полувыведения продлевается более чем на 6, более 12, более 24, более 48, более 72, более 96 ч или более чем на 1 неделю после введения *in vivo* по сравнению с белком без функционального фрагмента, увеличивающего период полувыведения. Период полувыведения относится к количеству времени, которое требуется для того, чтобы белок потерял половину своей концентрации, количества или активности. Период полувыведения можно определить, например, с помощью анализа ELISA или анализа активности. Примерные функциональные фрагменты, удлиняющие период полувыведения, включают домен Fc, домен мультимеризации, полиэтиленгликоль (PEG), гидроксипропилкрахмал (HES), XTEN (удлиненные рекомбинантные пептиды, см. WO 2013130683), человеческий сывороточный альбумин (HSA), бычий сывороточный альбумин (BSA), липиды (ацилирование), поли-Pro-Ala-Ser (PAS) и полиглутаминовую кислоту (глутамилирование).

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

Fc (фрагментированная кристаллизуемая) область или домен молекулы иммуноглобулина (также называемый полипептидом Fc) в значительной степени соответствует константной области тяжелой цепи иммуноглобулина и отвечает за различные функции, включая эффекторную функцию(и) антитела. Область Fc включает часть или весь шарнирный домен молекулы иммуноглобулина плюс домен CH2 и CH3. Fc-домен может образовывать димер двух полипептидных цепей, соединенных одной или несколькими дисульфидными связями. В некоторых воплощениях Fc представляет собой вариант Fc, который проявляет пониженную (например, пониженную более чем на 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90% или более) активность для облегчения эффекторной функции. В некоторых воплощениях ссылка на аминокислотные замены в области Fc представляет собой систему нумерации EU, если не описывается со ссылкой на конкретный SEQ ID NO. Нумерация EU известна и соответствует последней обновленной научной карте IMGT (IMGT®, международная информационная система ImMunoGeneTics® http://www.imgt.org/IMGTScientificChart/Numbering/Hu_IGHGnber.html (создана: 17 мая 2001 г., последнее обновление: 10 января 2013 г.) и индексе EU, представленному в Kabat, EA et al. *Sequences of Proteins of Immunological interest*. 5th ed. US Department of Health and Human Services, NIH publication No. 91-3242 (1991).

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

Термин "клетка-хозяин" относится к клетке, которая может быть использована для экспрессии бел-

ка, кодируемого рекомбинантным экспрессирующим вектором. Клетка-хозяин может быть прокариотическим организмом, например, *E. coli*, или она может представлять собой эукариотический организм, например, одноклеточный эукариотический организм (например, дрожжи или другой грибок), растительную клетку (например, растительную клетку табака или томата), клетку животного (например, клетку человека, клетку обезьяны, клетку хомяка, клетку крысы, клетку мыши или клетку насекомого) или гибриду. Примеры клеток-хозяев включают клетки яичника китайского хомячка (CHO) или их производные, такие как VEGGIE CHO и родственные клеточные линии, которые растут в бессывороточной среде или линия CHO DX-B11, которая дефицитна по DHFR. В некоторых воплощениях клетка-хозяин представляет собой клетку млекопитающего (например, клетку человека, клетку обезьяны, клетку хомяка, клетку крысы, клетку мыши или клетку насекомого).

Термин "иммуноглобулин" (сокращенно "Ig"), используемый в данном документе, относится к иммуноглобулиновому белку млекопитающих, включая любой из пяти человеческих классов антител: IgA (который включает подклассы IGA1 и IGA2), IgD, IgE, IgG (который включает подклассы IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4) и IgM. Этот термин также включает иммуноглобулины, которые являются менее полными, полностью или частично синтетическими (например, полученные рекомбинантно или химическим синтезом) или естественно произведенными, такими как антигенсвязывающий фрагмент (Fab), вариабельный фрагмент (Fv), содержащий V_H и V_L, одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv), содержащий V_H и V_L, соединенные вместе в одной цепи, а также фрагменты V-областей других антител, такие как Fab', F(ab')₂, F(ab')₂, dsFv, полипептидные фрагменты Fc и Fd. Биспецифические антитела, гомоспецифические и гетеробиспецифические, включены в значение термина.

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

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

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

Термин "иммунологическая активность", используемый в данном описании в контексте лимфоци-

тов млекопитающих, таких как Т-клетки, относится к одному или более из числа выживаемости клеток, пролиферации клеток, продукции цитокинов (например, интерферона-гамма) или активности Т-клеточной цитотоксичности. В некоторых случаях иммунологическая активность может означать клеточную экспрессию цитокинов, таких как хемокины или интерлейкины. Анализы для определения усиления или подавления иммунологической активности включают реакции MLR (реакция смешанных лимфоцитов), измеряющие уровни интерферона-гамма-цитокинов в культуральных надосадочных жидкостях (Wang et al., *Cancer Immunol Res.* 2014 Sep; 2(9):846-56), SEB (staphylococcal enterotoxin B) T cell stimulation assay (Wang et al., *Cancer Immunol Res.* 2014 Sep; 2(9):846-56) и анализ стимуляции Т-клеток с помощью анти-CD3 (Li and Kurlander, *J Transl Med.* 2010; 8: 104). Поскольку активация Т-клеток связана с секрецией цитокина IFN-гамма, определение уровней IFN-гамма в культуральных надосадочных жидкостях из этих анализов Т-клеток человека *in vitro* может быть проанализировано с использованием коммерческих наборов ELISA (Wu et al., *Immunol Lett* 2008 Apr 15, 117 (1): 57-62). Индукция иммунного ответа приводит к увеличению иммунологической активности по сравнению с покоящимися лимфоцитами. Иммуномодулирующий белок, такой как вариантный полипептид ICOSL, содержащий домен IgSF с модифицированной аффинностью, как предусмотрено в данном документе, может в некоторых воплощениях увеличивать или в альтернативных вариантах уменьшать экспрессию IFN-гамма (интерферона-гамма) в первичном анализе Т-клеток относительно представителя IgSF дикого типа или контроля домена IgSF. Специалисты признают, что формат первичного анализа Т-клеток, используемый для определения увеличения экспрессии IFN-гамма, будет отличаться от формата, используемого для анализа уменьшения экспрессии IFN-гамма. При анализе способности иммуномодулирующего белка или домена IgSF с модифицированной аффинностью по изобретению уменьшать экспрессию IFN-гамма в первичном анализе Т-клеток может быть использован анализ реакции смешанных лимфоцитов (MLR), как описано в Примере 6.

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

Термин "иммуномодулирующий полипептид" представляет собой полипептид, который модулирует иммунологическую активность. Под "модуляцией" или "модулировать" иммунный ответ подразумевается, что иммунологическая активность либо увеличивается, либо уменьшается. Иммуномодулирующим белком может быть одиночная полипептидная цепь или мультимер (димеры или мультимеры более высокого порядка), по меньшей мере, две полипептидные цепи, ковалентно связанные между собой, например, дисульфидными связями между цепями. Таким образом, мономерные, димерные и мультимерные полипептиды более высокого порядка находятся в пределах указанного термина. Мультимерные полипептиды могут быть гомомультимерными (идентичных полипептидных цепей) или гетеромультимерными (из неидентичных полипептидных цепей). Иммуномодулирующий полипептид по изобретению включает вариантный ICOSL.

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

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

Используемый в данном документе термин "лимфоцит" означает любой из трех подтипов лейкоцитов в иммунной системе млекопитающих. К ним относятся натуральные клетки-киллеры (NK-клетки)

(которые функционируют в клеточно-опосредованном, цитотоксическом врожденном иммунитете), Т-клетки (для клеточно-опосредованного, цитотоксического адаптивного иммунитета) и В-клетки (для гуморального, адаптивного иммунитета, управляемого антителами). Т-клетки включают: хелперные Т-клетки, цитотоксические Т-клетки, Т-клетки натуральные киллеры, Т-клетки памяти, регуляторные Т-клетки или гамма-дельта Т-клетки. Врожденные лимфоидные клетки (ILC) также включены в определение лимфоцитов.

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

Используемый в данном документе термин "мембранный белок" означает белок, который в физиологических условиях непосредственно или косвенно прикрепляется к липидному бислою. Липидный бислой, который образует мембрану, может быть биологической мембраной, например, эукариотической клеточной мембраной (например, из млекопитающего) или искусственной мембраной (т.е. изготовленной человеком), например, такой, которая обнаруживается на липосоме. Присоединение мембранного белка к липидному бислою может быть осуществлено путем ковалентной фиксации или путем нековалентных взаимодействий, таких как гидрофобные или электростатические взаимодействия. Мембранный белок может быть интегральным мембранным белком или белком периферической мембраны. Мембранные белки, являющиеся белками периферических мембран, нековалентно присоединены к липидному бислою или нековалентно присоединены к интегральному мембранному белку. Белок периферической мембраны образует временное прикрепление к липидному бислою, так что в диапазоне физиологических условий у млекопитающего белок периферической мембраны может ассоциироваться и/или диссоциироваться от липидного бислоя. В отличие от белков периферической мембраны, интегральные мембранные белки образуют по существу постоянную связь с липидным бислоем мембраны, так что в диапазоне условий, которые являются физиологическими у млекопитающих, интегральные мембранные белки не диссоциируются от их прикрепления к липидному бислою. Мембранный белок может образовывать прикрепление к мембране посредством одного слоя липидного бислоя (монотопный) или прикрепляться через оба слоя мембраны (политопный). Интегральный мембранный белок, который взаимодействует только с одним липидным бислоем, представляет собой "интегральный монотопный белок". Интегральный мембранный белок, который взаимодействует с обоими липидными бислоями, представляет собой "интегральный политопный белок", альтернативно называемый в данном документе "трансмембранным белком".

Термины "модулирующий" или "модулировать", используемый в данном описании в контексте иммунного ответа, например, иммунного ответа млекопитающего, относятся к любому изменению, например, к увеличению или уменьшению, существующих или потенциальных иммунных реакций, которые происходят в результате введения иммуномодулирующего полипептида, включающего вариантный ICOSL по настоящему изобретению, или в результате введения сконструированных клеток, экспрессирующих иммуномодулирующий белок, такой как вариант трансмембранного иммуномодулирующего белка ICOSL по настоящему изобретению. Таким образом, он относится к изменению, такому как увеличение или уменьшение иммунного ответа по сравнению с иммунным ответом, который возникает или присутствует в отсутствие введения иммуномодулирующего белка, включающего вариантный ICOSL или клеток, экспрессирующих такой иммуномодулирующий полипептид. Такая модуляция включает любую индукцию, активацию, подавление или изменение степени или величины иммунологической активности иммунной клетки. Иммунные клетки включают В-клетки, Т-клетки, NK-клетки (натуральные киллеры), NK Т-клетки, профессиональные антигенпредставляющие клетки (APC) и непрофессиональные антигенпредставляющие клетки и воспалительные клетки (нейтрофилы, макрофаги, моноциты, эозинофилы и базофилы). Модуляция включает любые изменения, связанные с существующим иммунным ответом, развивающимся иммунным ответом, потенциальным иммунным ответом или способностью индуцировать, регулировать, влиять или реагировать на иммунный ответ. Модуляция включает любое изменение экспрессии и/или функции генов, белков и/или других молекул в иммунных клетках как части иммунного ответа. Модуляция иммунного ответа или модуляция иммунологической активности включает, например, следующее: элиминацию, делецию или секвестрование иммунных клеток; индукцию образования иммунных клеток, которые могут модулировать функциональную способность других клеток, таких как аутореактивные лимфоциты, антигенпредставляющие клетки или воспалительные клетки; индукцию нечувствительного состояния в иммунных клетках (т.е. анергию); усиление или подавление активности или функции иммунных клеток, включая, без ограничения указанным, изменение структуры белков, экспрессируемых этими клетками. Примеры включают измененную выработку и/или секрецию определенных классов молекул, таких как цитокины, хемокины, перфорины, гранзимы, факторы роста, факторы транскрипции, киназы, костимулирующие молекулы или другие клеточные поверхностные рецепторы или любую комбинацию этих модуляторных событий. Модуляция может быть оценена, например, путем изменения экспрессии IFN-гамма (интерферона гамма) по сравнению с контрольным ICOSL дикого типа в анализе первичных Т-клеток (см. Zhao and Ji, Exp Cell Res. 2016 Jan1; 340 (1) 132-138). Модуляция может быть оценена, например, путем изменения иммунологической активности сконструиро-

ванных клеток, таких как изменение цитотоксической активности сконструированных клеток или изменение секреции цитокинов сконструированных клеток по сравнению с клетками, сконструированными с трансмембранным белком ICOSL дикого типа.

Используемый в данном документе термин "молекулярные виды" означает совокупность белков с идентичной или по существу идентичной первичной аминокислотной последовательностью. Каждый представитель суперсемейства иммуноглобулинов млекопитающих (IgSF) определяет набор идентичных или по существу идентичных молекулярных видов. Так, например, ICOSL человека является членом IgSF, и каждая молекула ICOSL человека представляет собой молекулярный вид ICOS. Изменение между молекулами, которые принадлежат к одним и тем же молекулярным видам, может происходить из-за различий в посттрансляционной модификации, таких как гликозилирование, фосфорилирование, убиквитинирование, нитрозилирование, метилирование, ацетилирование и липидация. Кроме того, незначительные различия в последовательности в пределах одного молекулярного вида вследствие полиморфизма генов представляют собой другую форму вариации внутри одного молекулярного вида, как в случае усеченных форм дикого типа отдельного молекулярного вида вследствие, например, протеолитического расщепления. "Молекулярный вид клеточной поверхности" представляет собой молекулярный вид, экспрессируемый на поверхности клетки млекопитающего. Два или более различных видов белка, каждый из которых присутствует исключительно на одной или исключительно другой (но не на обеих) из двух клеток млекопитающих, образующих IS, упоминаются как находящиеся в "цис" или "цис-конфигурации" между собой. Два разных вида белка, первый из которых присутствует исключительно на одной из двух клеток млекопитающих, образующих IS, а второй из которых присутствует исключительно на второй из двух клеток млекопитающих, образующих IS, как говорят, находятся в "транс" или "транс-конфигурации". Два разных вида белка, каждый из которых присутствует на обеих клетках млекопитающих, образующих IS, находятся как в цис-, так и в транс-конфигурациях на этих клетках.

Термин "домен мультимеризации" относится к аминокислотной последовательности, которая способствует стабильному взаимодействию молекулы полипептида с одним или несколькими дополнительными полипептидными молекулами, каждая из которых включает дополнительный домен мультимеризации, который может быть одинаковым или отличающимся доменом мультимеризации для формирования стабильного мультимера с первым доменом. Как правило, полипептид присоединяется прямо или косвенно к домену мультимеризации. Типичные домены мультимеризации включают последовательности иммуноглобулина или их части, лейциновые молнии, гидрофобные области, гидрофильные области и домены белок-белкового взаимодействия. Например, домен мультимеризации может быть константной областью или доменом иммуноглобулина, таким как, например, домен Fc или его части из IgG, включая подтипы IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4, IgA, IgE, IgD и IgM и их модифицированные формы.

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

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

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

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

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

Используемый в данном документе термин "первичный анализ Т-клеток" относится к анализу *in vitro* для измерения экспрессии интерферона-гамма ("IFN-гамма"). В данной области известно множество таких анализов первичных Т-клеток, как описано в Примере 6. В предпочтительном воплощении используемый анализ представляет собой анализ коиммобилизации с анти-CD3. В этом анализе первичные Т-клетки стимулируются анти-CD3, иммобилизованными с помощью дополнительных рекомбинантных белков или без них. Культуральные надосадочные жидкости собирают по временным точкам, обычно через 24-72 ч. В другом воплощении используемым анализом является MLR. В этом анализе первичные Т-клетки стимулируются аллогенным APC. Культуральные надосадочные жидкости собирают по временным точкам, обычно 24-72 ч. Уровни человеческого IFN-гамма измеряют в культуральных надосадочных жидкостях стандартными методами ELISA. Коммерческие наборы доступны от поставщиков, и анализ проводится в соответствии с рекомендацией производителя.

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

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

ников эукариот, включая гены в клетках дрожжей, насекомых и млекопитающих и вирусах (аналогичные контрольные элементы, т.е. промоторы, также обнаружены у прокариот). Выбор конкретного промотора и энхансера зависит от того, какой тип клетки следует использовать для экспрессии интересующего белка. Термины "в функциональной комбинации", "функциональным образом" и "функционально связанные", используемые в данном документе, относятся к связыванию нуклеотидных последовательностей таким образом или в такой ориентации, что образуется нуклеотидная молекула, способная направлять транскрипцию данного гена и/или синтез молекулы искомого белка.

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

Термин "селективность" относится к предпочтению испытуемого белка или полипептида специфически связываться с одним субстратом, таким как один когнатный партнер связывания, по сравнению со специфическим связыванием с другим субстратом, таким как другой когнатный партнер связывания целевого белка. Селективность может быть отражена как отношение активности связывания (например, аффинности связывания) испытуемого белка и первого субстрата, такого как первый когнатный партнер связывания (например, K_{d1}) и активность связывания (например, аффинность связывания) того же испытуемого белка со вторым когнатным партнером связывания (например, K_{d2}).

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

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

Термин "виды", при использовании в данном документе в отношении полипептидов или нуклеиновых кислот означает ансамбль молекул с идентичными или по существу идентичными последовательностями. Изменение между молекулами, которые принадлежат к одному и тому же молекулярному виду, может происходить из-за различий в посттрансляционной модификации, такой как гликозилирование, фосфорилирование, убиквитинирование, нитрозилирование, метилирование, ацетилирование и липидация. Слегка усеченные последовательности, которые отличаются (или кодируют отличие) от полноразмерных видов на аминоконце или карбоксиконце не более чем на 1, 2 или 3 аминокислотных остатка, считаются одним видом. Такие микрогетерогенности являются общей чертой изготовленных белков.

Термин "специфический связывающий фрагмент", используемый в данном документе в отношении полноразмерного полипептида ICOSL дикого типа млекопитающих или его домена IgV или IgC, означает полипептид, имеющий подпоследовательность с доменом IgV и/или IgC, который специфически связывается *in vitro* и/или *in vivo* с ICOS млекопитающих и/или CD28 млекопитающих, таким как человеческий или мышиный ICOS или CD28. В некоторых воплощениях специфический связывающий фрагмент ICOSL IgV или ICOSL IgC составляет, по меньшей мере, 60, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 или 99% дли-

ны последовательности полноразмерной последовательности дикого типа. Специфический связывающий фрагмент может быть изменен в последовательности с образованием варианта ICOSL по изобретению.

Используемый в данном документе термин "специфически связывается" означает способность белка в условиях специфического связывания связываться с белком-мишенью, так что его аффинность или avidность, по меньшей мере, в 10 раз больше, но необязательно 50, 100, 250 или 500 или даже, по меньшей мере, в 1000 раз больше, чем средняя аффинность или avidность одного и того же белка, к набору случайных пептидов или полипептидов с достаточным статистическим размером. Конкретно связывающийся белок не обязательно должен связываться исключительно с одной молекулой-мишенью, но может специфически связываться с молекулой, не являющейся мишенью, из-за сходства структурной конформации между мишенью и не-мишенью (например, паралогами или ортологами). Специалисты поймут, что возможно специфическое связывание с молекулой, имеющей ту же функцию у разных видов животных (то есть ортологом), или с нецелевой молекулой, имеющей по существу подобный эпитоп, что и молекула-мишень (например, паралогом) и не это не понижает специфичность связывания, которая определяется относительно статистически достоверного набора уникальных не-мишеней (например, случайных полипептидов). Таким образом, полипептид по изобретению может специфически связываться с более чем одним отдельным видом молекулы-мишени из-за перекрестной реактивности. Для определения специфического связывания между двумя белками можно использовать твердофазные иммуноанализы ELISA или измерения Biacore. Как правило, взаимодействия между двумя связывающимися белками имеют константы диссоциации (K_d) менее 1×10^{-5} и часто до 1×10^{-12} М. В некоторых аспектах настоящего изобретения взаимодействия между двумя связывающимися белками имеют константы диссоциации 1×10^{-6} , 1×10^{-7} , 1×10^{-8} , 1×10^{-9} , 1×10^{-10} или 1×10^{-11} М.

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

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

Термин "целевой фрагмент", используемый в данном описании, относится к композиции, которая является ковалентно или нековалентно присоединенной к, или физически инкапсулирующей полипептид, содержащий вариант ICOSL по настоящему изобретению. Нацеливающая функциональная группа имеет специфическую аффинность связывания для требуемой контрструктуры, такой как рецептор клеточной поверхности (например, представитель PD-L1 семейства B7), или опухолевый антиген, такой как опухолеспецифический антиген (TSA) или опухоль-ассоциированный антиген (TAA), такой как B7-H6. Как правило, искомая контрструктура локализуется в определенной ткани или клеточном типе. Нацеливающие функциональные группы включают: антитела, антигенсвязывающий фрагмент (Fab), вариабельный фрагмент (Fv), содержащий V_H и V_L , одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv), содержащий V_H и V_L , соединенные вместе в одной цепи, а также другие фрагменты V-области антитела, такие как Fab', F(ab)₂, F(ab')₂, dsFv-диателло, нанотела, растворимые рецепторы, рецепторные лиганды, аффинные зрелые рецепторы или лиганды, а также низкомолекулярные композиции (<500 дальтон) (например, специфические связывающие рецепторные композиции). Нацеливающие функциональные группы также могут быть присоединены ковалентно или нековалентно к липидной мембране липосом, которые инкапсулируют полипептид по настоящему изобретению.

Используемый в данном документе термин "трансмембранный белок" означает мембранный белок, который по существу или полностью пронизывает липидный бислой, например, липидные бислои, обнаруженные в биологической мембране, например, в клетке млекопитающего, или в искусственной конструкции, такой как липосома. Трансмембранный белок включает трансмембранный домен ("трансмембранный домен"), посредством которого он интегрирован в липидный бислой и с помощью которого интеграция является термодинамически устойчивой в физиологических условиях. Трансмембранные домены обычно прогнозируются по их аминокислотной последовательности любым из коммерчески доступных программных приложений для биоинформатики из-за их повышенной гидрофобности по сравнению с областями белка, которые взаимодействуют с водными средами (например, цитозолем, внеклеточной жидкостью). Трансмембранный домен часто представляет собой гидрофобную альфа-спираль, которая заполняет мембрану. Трансмембранный белок может проходить через оба слоя липидного бислоя один или несколько раз. Трансмембранный белок включает предоставленные трансмембранные иммуномодулирующие белки, описанные в данном документе. В дополнение к трансмембранному домену трансмембранный иммуномодулирующий белок по изобретению дополнительно включает эктодомен и, в некоторых воплощениях, эндодомен.

Термины "лечить", "лечение" или "терапия" заболевания или расстройства, используемые в данном документе, означает замедление, прекращение или обращение прогрессирования заболевания или рас-

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

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

Термин "вариантный" (также "модифицированный" или мутант"), используемый по отношению к вариантному ICOSL, означает ICOSL, например, ICOSL млекопитающих (например, человека или мыши), созданный путем вмешательства человека. Вариантный ICOSL представляет собой полипептид, имеющий измененную аминокислотную последовательность, относительно немодифицированного ICOSL или ICOSL дикого типа. Вариантный ICOSL представляет собой полипептид, который отличается от последовательности изоформы ICOSL дикого типа одной или несколькими аминокислотными заменами, делециями, добавлениями или их комбинациями. Для целей настоящего изобретения вариантный ICOSL содержит, по меньшей мере, один домен с модифицированной аффинностью, в результате чего одно или несколько аминокислотных отличий встречаются в домене IgSF (например, домене IgV). Вариантный ICOSL может содержать 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 или более аминокислотных различий, таких как аминокислотные замены. Вариантный полипептид ICOSL обычно имеет, по меньшей мере, 50, 60, 70, 80, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% или более идентичности последовательности относительно соответствующего ICOSL дикого типа или немодифицированного ICOSL, такой как последовательность SEQ ID NO: 5, ее зрелой последовательности или ее части, содержащей внеклеточный домен или ее домен IgSF. В некоторых воплощениях вариантный полипептид ICOSL имеет, по меньшей мере, 50, 60, 70, 80, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% или более идентичности последовательности для соответствующего ICOSL дикого типа или немодифицированного ICOSL, содержащей последовательность, представленную в SEQ ID NO: 32 или SEQ ID NO: 196. Неприродные аминокислоты, а также природные аминокислоты включены в объем допустимых замен или добавлений. Вариантный ICOSL не ограничивается каким-либо конкретным способом получения и включает, например, химический синтез *de novo*, методы рекомбинантной ДНК *de novo* или их комбинации. Вариантный ICOSL по изобретению специфически связывается, по меньшей мере, с одним или несколькими из числа: CD28, ICOS или CTLA-4 млекопитающих. В некоторых воплощениях измененная аминокислотная последовательность приводит к изменению (то есть увеличению или уменьшению) аффинности или авидности связывания с ICOS и/или CD28 по сравнению с белком ICOSL дикого типа. Увеличение или уменьшение аффинности или авидности связывания можно определить с использованием хорошо известных анализов связывания, таких как проточная цитометрия. Larsen et al., *American Journal of Transplantation*, Vol 5: 443-453 (2005). См. также Linsley et al., *Immunity*, 1: 7930801 (1994). Увеличение аффинности или авидности связывания вариантного ICOSL с ICOS и/или CD28 имеет значение, по меньшей мере, на 5% больше, чем значение ICOSL дикого типа, и в некоторых воплощениях, по меньшей мере, на 10, 15, 20, 30, 40, 50, на 100% больше контрольного значения ICOSL дикого типа. Уменьшение аффинности или авидности связывания ICOSL

с ICOS и/или CD28 составляет значение не более 95% от контрольных значений для дикого типа, а в некоторых воплощениях не более 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20, 10, 5% или отсутствие обнаруживаемой аффинности или авидности связывания контрольных значений ICOS и/или CD28 дикого типа. Вариантный ICOSL изменяется в первичной аминокислотной последовательности путем замещения, добавления или делеции аминокислотных остатков. Термин "вариантный" в контексте вариантного ICOSL не может быть истолкован как наложение какого-либо условия для какой-либо конкретной исходной композиции или способа, с помощью которого создается вариантный ICOSL. Вариантный ICOSL может, например, быть получен, начиная с информации о последовательности ICOSL млекопитающего дикого типа, затем смоделирован *in silico* для связывания с ICOS и/или CD28 и, наконец, рекомбинантно или химически синтезирован так, чтобы получить вариантный ICOSL по настоящему изобретению. В одном альтернативном примере вариантный ICOSL может быть создан путем сайт-направленного мутагенеза ICOSL дикого типа. Таким образом, вариантный ICOSL обозначает композицию, а не продукт, полученный любым способом. Могут быть использованы различные способы, включая рекомбинантные способы, химический синтез или их комбинации.

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

II. Вариантные полипептиды ICOSL.

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

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

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

В некоторых воплощениях последовательность ICOSL дикого типа или немодифицированная последовательность ICOSL является последовательностью ICOSL млекопитающего. В некоторых воплощениях последовательность ICOSL дикого типа или немодифицированного ICOSL может представлять собой ICOSL млекопитающего, которым является, без ограничения указанным, человек, мышь, яваский макак или крыса. В некоторых воплощениях последовательность ICOSL дикого типа или немодифицированного ICOSL является человеческой.

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

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

В некоторых воплощениях полипептид ICOSL дикого типа или немодифицированный полипептид ICOSL включает домен IgV или домен IgC, или их специфический связывающий фрагмент. В некоторых воплощениях домен IgV полипептида ICOSL дикого типа или немодифицированного полипептида ICOSL включает аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 196 (соответствующая аминокислотным остаткам 19-129 из SEQ ID NO: 5), или его ортологе. Например, домен IgV немодифицированного полипептида ICOSL или полипептида ICOSL дикого типа может включать (i) аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 196, (ii) аминокислотную последовательность, которая имеет, по меньшей мере, около 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 196, или (iii) специфический связывающий фрагмент аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 196, или специфический связывающий фрагмент последовательности (i) или (ii). В некоторых воплощениях домен IgV дикого типа или немодифицированный домен IgV способен связывать один или несколько когнатных партнеров связывания ICOSL, таких как один или несколько из числа CD28, ICOS или CTLA-4.

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

В некоторых воплощениях полипептид ICOSL дикого типа или немодифицированный полипептид ICOSL включает специфический связывающий фрагмент из ICOSL, такой как специфический связывающий фрагмент домена IgV или домена IgC. В некоторых воплощениях изобретения специфический связывающий фрагмент может связывать CD28, ICOS и/или CTLA-4. В некоторых воплощениях специфический связывающий фрагмент может иметь аминокислотную длину, по меньшей мере, 50 аминокислот, например, по меньшей мере, 60, 70, 80, 90, 100 или 110 аминокислот. В некоторых воплощениях специфический связывающий фрагмент домена IgV включает аминокислотную последовательность, которая составляет, по меньшей мере, около 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% длины домена IgV, представленного как аминокислоты 19-129 в SEQ ID NO: 5. В некоторых воплощениях специфический связывающий фрагмент домена IgC включает аминокислотную последовательность, которая составляет, по меньшей мере, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% длины домена IgC, представленного как аминокислоты 141-227 в SEQ ID NO: 5.

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

В некоторых воплощениях вариантный полипептид ICOSL включает полноразмерный домен IgV. В некоторых воплощениях вариантный полипептид ICOSL включает полноразмерный домен IgC. В некоторых воплощениях вариантный полипептид ICOSL включает специфический связывающий фрагмент домена IgV. В некоторых воплощениях вариантный полипептид ICOSL включает специфический связывающий фрагмент домена IgC. В некоторых воплощениях вариантный полипептид ICOSL включает пол-

норазмерный домен IgV и полноразмерный домен IgC. В некоторых воплощениях вариантный полипептид ICOSL включает полноразмерный домен IgV и специфический связывающий фрагмент домена IgC. В некоторых воплощениях вариантный полипептид ICOSL включает специфический связывающий фрагмент домена IgV и полноразмерный домен IgC. В некоторых воплощениях вариантный полипептид ICOSL включает специфический связывающий фрагмент домена IgV и специфический связывающий фрагмент домена IgC.

В любом из таких воплощений, модификация одной или нескольких аминокислот (например, замены) вариантных полипептидов ICOSL может быть расположена в любом одном или нескольких из полипептидных доменов ICOSL. Например, в некоторых воплощениях одна или несколько аминокислотных замен находятся во внеклеточном домене вариантного полипептида ICOSL. В некоторых воплощениях одна или несколько аминокислотных замен расположены в домене IgV или специфическом связывающем фрагменте домена IgV. В некоторых воплощениях одна или несколько аминокислотных модификаций (например, замены) расположены в домене IgC или специфическом связывающем фрагменте домена IgC.

В целом, каждый из различных атрибутов полипептидов раскрыт отдельно ниже (например, растворимые, секретируемые и мембраносвязанные полипептиды, аффинность ICOSL к CD28, ICOS и CTLA-4, количество вариаций в полипептидной цепи, количество связанных полипептидных цепей, количество и характер изменений аминокислот на один вариантный ICOSL и т. д.). Однако, как будет ясно специалисту в данной области, любой конкретный полипептид может включать комбинацию этих независимых атрибутов. Понятно, что ссылка на аминокислоты, в том числе на конкретную последовательность, представленную как SEQ ID NO, используемую для описания доменной организации домена IgSF, предназначена для иллюстративных целей и не предназначена для ограничения объема предлагаемых воплощений. Понятно, что полипептиды и описание их доменов теоретически получены на основании анализа гомологии и выравнивания с аналогичными молекулами. Таким образом, точный локус может варьировать и не обязательно является одинаковым для каждого белка. Следовательно, специфический домен IgSF, такой как специфический домен IgV или домен IgC, может быть на несколько аминокислот (одну, две, три или четыре) длиннее или короче.

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

Примерные модификации.

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

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

В некоторых воплощениях вариантный полипептид ICOSL обладает повышенной аффинностью связывания с CD28, относительно полипептида ICOSL дикого типа или немодифицированного полипептида ICOSL. В некоторых воплощениях вариантный полипептид ICOSL имеет повышенную аффинность связывания с ICOS относительно полипептида ICOSL дикого типа или немодифицированного полипептида ICOSL. В некоторых воплощениях вариантный полипептид ICOSL имеет повышенную аффинность связывания с CTLA-4 относительно полипептида ICOSL дикого типа или немодифицированного полипептида ICOSL. В некоторых воплощениях вариантный полипептид ICOSL имеет уменьшенную аффин-

ляет более чем в 1,2, в 1,5, в 2, в 3, в 4, в 5, в 6, в 7, в 8, в 9, в 10, в 20, в 30, в 40 или 50 раз. В таких примерах полипептид ICOSL дикого типа или немодифицированный полипептид ICOSL имеет такую же последовательность, что и вариантный полипептид ICOSL, за исключением того, что он не включает одну или несколько аминокислотных модификаций (например, замен).

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

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

В некоторых воплощениях вариантный полипептид ICOSL имеет повышенную или большую аффинность связывания с CD28. В некоторых воплощениях вариантный полипептид ICOSL с повышенной или большей аффинностью связывания с CD28 будет иметь увеличение аффинности связывания относительно полипептида ICOSL дикого типа или немодифицированного полипептида ICOSL, по меньшей мере, на около 25%, например, по меньшей мере, на около 30, 40, 50 или 60% для CD28. В некоторых воплощениях вариантный полипептид ICOSL с повышенной или большей аффинностью связывания с CD28 имеет равновесную константу диссоциации (K_d) менее 200, 300, 400, 500 пМ или 600 мкМ для CD28. В некоторых воплощениях вариантный полипептид специфически связывается с эктодоменом одного из ICOS, CD28 или CTLA4 с повышенной селективностью по сравнению с немодифицированным ICOSL. В некоторых воплощениях повышенная селективность в отношении CD28. В некоторых воплощениях повышенная селективность включает большее соотношение связывания вариантного полипептида ICOSL с одним когнатным партнером связывания, выбранным из ICOS, CD28 и CTLA4, относительно другого когнатного партнера связывания по сравнению с соотношением связывания немодифицированного полипептида ICOSL с одним когнатным партнером связывания относительно другого когнатного партнера связывания. В некоторых воплощениях соотношение больше, по меньшей мере, или, по меньшей мере, составляет около в 1,2, в 1,5, в 2, в 3, в 4, в 5, в 6, в 7, в 8, в 9, в 10, в 15, в 20, в 30, в 40, в 50 раз или более.

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

Если не указано иное, как указано по всему настоящему описанию, замена(ы) аминокислоты обозначена номером положения аминокислоты, соответствующей нумерации положений немодифицированной последовательности ECD, представленной в SEQ ID NO: 32 или, где применимо, немодифицированной последовательности IgV, представленной в SEQ ID NO: 196 (содержащей остатки 19-129 из SEQ ID NO: 32):

DTQEKEVRAMVGSDVELSCACPEGSRFDLNDVYVYWQTSESKTVVTVYHIPQN
 SSLENVDSRYRNRALMSPAGMLRGDFSLRLFNVTPODEQKFHCLVLSQSLGFQEVLS
 VEVTLHVAANFSPVVSAPHSPSQDELFTTCTTSINGYPRPNVYWINKTDNSLLDQALQ
 NDTVFLNMRGLYDVVSVLRIARTPSVNIGCCIEVLLQQNLTVGSQTGNDIGERDKIT
 ENPVSTGEKNAAT (SEQ ID NO:32)

DTQEKEVRAMVGSDVELSCACPEGSRFDLNDVYVYWQTSESKTVVTVYHIPQN
 SSLENVDSRYRNRALMSPAGMLRGDFSLRLFNVTPODEQKFHCLVLSQSLGFQEVLS
 VE (SEQ ID NO:196)

Способность определения соответствующего положения модификации находится в пределах компетенции специалиста в данной области, например, определения аминокислотной замены в полипептиде ICOSL, включая его часть, содержащую домен IgSF (например, IgV), например, путем выравнивания эталонной последовательности с SEQ ID NO: 32 или SEQ ID NO: 196. При перечислении модификаций во всем этом описании, аминокислотное положение указывается посередине с соответствующей немодифицированной (например, дикого типа) аминокислотой, указанной перед номером, и идентифицированной аминокислотной заменой, указанной после номера. Если модификация является делецией в данном положении, то указывается "del", а если модификация является вставкой в данном положении, то указывается "ins".

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

В некоторых воплощениях вариантный полипептид ICOSL имеет до 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 аминокислотных модификаций, например замен. Модификация, например, замена, может иметь место в домене IgV или в домене IgC. В некоторых воплощениях вариантный полипептид ICOSL имеет вплоть до 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, или 20 аминокислотных замен в домене IgV или его специфическом связывающем фрагменте. В некоторых воплощениях вариантный полипептид ICOSL имеет вплоть до 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, или 20 аминокислотных замен в домене IgC или его специфическом связывающем фрагменте. В некоторых воплощениях вариантный полипептид ICOSL идентичен, по меньшей мере, на 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% с последовательностью полипептида ICOSL дикого типа или полипептида немодифицированного ICOSL или его специфического связывающего фрагмента, таких как аминокислотная последовательность SEQ ID NO: 32 или 196.

В некоторых воплощениях вариантный полипептид ICOSL имеет одну или более аминокислотную модификацию, например, замену в немодифицированном ICOSL или специфическом связывающем фрагменте в соответствующем положении(ях) 10, 11, 13, 16, 18, 20, 25, 27, 30, 33, 37, 42, 43, 47, 52, 54, 57, 61, 62, 67, 71, 72, 74, 77, 78, 75, 80, 84, 89, 90, 92, 93, 94, 96, 97, 98, 99, 100, 102, 103, 107, 109, 110, 111, 113, 115, 116, 117, 119, 120, 121, 122, 126, 129, 130, 132, 133, 135, 138, 139, 140, 142, 143, 144, 146, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 158, 161, 166, 168, 172, 173, 175, 190, 192, 193, 194, 198, 201, 203, 207, 208, 210, 212, 217, 218, 220, 221, 224, 225 или 227 относительно нумерации SEQ ID NO: 32. В некоторых воплощениях такие варианты полипептиды ICOSL проявляют измененную аффинность связывания с одним или несколькими из числа CD28, ICOS и/или CTLA-4 относительно полипептида ICOSL дикого типа или немодифицированного полипептида ICOSL. Например, в некоторых воплощениях вариантный полипептид ICOSL проявляет повышенную аффинность связывания с CD28, ICOS и/или CTLA-4 относительно полипептида ICOSL дикого типа или немодифицированного полипептида ICOSL. В некоторых воплощениях вариантный полипептид ICOSL проявляет пониженную аффинность связывания с CD28, ICOS или CTLA-4 относительно полипептида ICOSL дикого типа или немодифицированного полипептида ICOSL.

В некоторых воплощениях вариантный полипептид ICOSL имеет еще одну или несколько аминокислотных модификаций, например, замен, выбранных из M10V, M10I, V11E, S13G, E16V, S18R, A20V, S25G, F27S, F27C, N30D, Y33del, Q37R, K42E, Y47H, T43A, N52H, N52D, N52Q, N52S, N52Y, N52K, S54A, S54P, N57D, N57Y, R61S, R61C, Y62F, L67P, A71T, G72R, L74Q, R75Q, D77G, F78L, L80P, N84Q, D89G, E90A, K92R, F93L, H94E, H94D, L96F, L96I, V97A, L98F, S99G, Q100R, Q100K, Q100P, L102R, G103E, V107A, V107I, S109G, S109N, V110D, V110N, V110A, E111del, T113E, H115R, H115Q, V116A, A117T, N119Q, F120I, F120S, S121G, V122A, V122M, S126T, S126R, H129P, S130G, S132F, Q133H,

E135K, F138L, T139S, C140D, C140del, S142F, I143V, I143T, N144D, Y146C, V151A, Y152C, Y152H, W153R, I154F, N155H, N155Q, K156M, D158G, L161P, L161M, L166Q, N168Q, F172S, L173S, M175T, T190S, T190A, S192G, V193M, N194D, C198R, N201S, L203P, L203F, N207Q, L208P, V210A, S212G, D217V, I218T, I218N, E220G, R221G, R221I, I224V, T225A, N227K или их консервативных аминокислотах модификаций, например, замен. Консервативная аминокислотная модификация, например замена, представляет собой любую аминокислоту, которая попадает в тот же класс аминокислот, что и замещенные аминокислоты, но отлична от аминокислоты дикого типа или немодифицированной аминокислоты. Классами аминокислот являются алифатические (глицин, аланин, валин, лейцин и изолейцин), гидроксильные или серосодержащие (серин, цистеин, треонин и метионин), циклические (пролин), ароматические (фенилаланин, тирозин, триптофан) основные (гистидин, лизин и аргинин) и кислые/амид (аспартат, глутамат, аспарагин и глутамин).

В некоторых воплощениях вариантный полипептид ICOSL имеет еще одну или несколько аминокислотных модификаций, например замен, выбранных из M10V, M10I, V11E, S13G, E16V, S18R, A20V, S25G, F27S, F27C, N30D, Y33del, Q37R, K42E, T43A, Y47H, N52H, N52D, N52Q, N52S, N52Y, N52K, S54A, S54P, N57D, N57Y, R61S, R61C, Y62F, L67P, A71T, G72R, L74Q, R75Q, D77G, F78L, L80P, N84Q, D89G, E90A, K92R, F93L, H94E, H94D, L96F, L96I, V97A, L98F, S99G, Q100R, Q100K, Q100P, G103E, L102R, V107A, V107I, S109G, S109N, V110D, V110N, V110A, E111del, T113E, H115R, H115Q, V116A, A117T, N119Q, F120I, F120S, S121G, V122A, V122M, S126T, S126R, H129P, S130G, S132F, Q133H, E135K, F138L, T139S, C140D, C140del, S142F, I143V, I143T, N144D, Y146C, V151A, Y152C, Y152H, W153R, I154F, N155H, N155Q, K156M, D158G, L161P, L161M, L166Q, N168Q, F172S, L173S, M175T, T190A, T190S, S192G, V193M, N194D, C198R, N201S, L203P, L203F, N207Q, L208P, V210A, S212G, D217V, I218T, I218N, E220G, R221G, R221I, I224V, T225A, N227K.

В некоторых воплощениях одна или несколько аминокислотных модификаций, например замен, выбрана из N52Y/N57Y/F138L/L203P, N52H/N57Y/Q100P, N52S/Y146C/Y152C, N52H/C198R, N52H/C140D/T225A, N52H/C198R/T225A, N52H/K92R, N52H/S99G, N57Y/Q100P, N52S/G103E, N52S/S130G/Y152C, N52S/Y152C, N52S/C198R, N52Y/N57Y/Y152C, N52Y/N57Y/H129P/C198R, N52H/L161P/C198R, N52S/T113E, N52D/S54P, N52K/L208P, N52S/Y152H, N52D/V151A, N52H/I143T, N52S/L80P, F120S/Y152H/N201S, N52S/R75Q/L203P, N52S/D158G, N52D/Q133H, N52S/N57Y/H94D/L96F/L98F/Q100R, N52S/N57Y/H94D/L96F/L98F/Q100R/G103E/F120S, N52H/F78L/Q100R, N52H/N57Y/Q100R/V110D, N52H/N57Y/R75Q/Q100R/V110D, N52H/N57Y/Q100R, N52H/N57Y/L74Q/Q100R/V110D, N52H/Q100R, N52H/S121G, A20V/N52H/N57Y/Q100R/S109G, N52H/N57Y/Q100P, N52H/N57Y/R61S/Q100R/V110D/L173S, N52H/N57Y/Q100R/V122A, N52H/N57Y/Q100R/F172S, N52H/N57Y, N52S/F120S, N52S/V97A, N52S/G72R, N52S/A71T/A117T, N52S/E220G, Y47H/N52S/V107A/F120S, N52H/N57Y/Q100R/V110D/S132F/M175T, E16V/N52H/N57Y/Q100R/V110D/H115R/Y152C/K156M/C198R, Q37R/N52H/N57Y/Q100R/V110N/S142F/C198R/D217V/R221G, N52H/N57Y/Q100R/V110D/C198R, N52H/N57Y/Q100R/V110D/V116A/L161M/F172S/S192G/C198R, F27S/N52H/N57Y/V110N, N52S/H94E/L96I/S109N/L166Q, S18R/N52S/F93L/I143V/R221G, A20T/N52D/Y146C/Q164L, V11E/N30D/N52H/N57Y/H94E/L96I/L98F/N194D/V210A/I218T, N52S/H94E/L96I/V122M, N52H/N57Y/H94E/L96I/F120I/S126T/W153R/I218N, M10V/S18R/N30D/N52S/S126R/T139S/L203F, S25G/N30D/N52S/F120S/N227K, N30D/N52S/L67P/Q100K/D217G/R221K/T225S, N52H/N57Y/Q100R/V110D/A117T/T190S/C198R, N52H/N57Y/Q100R/V110D/F172S/C198R, S25G/F27C/N52H/N57Y/Q100R/V110D/E135K/L173S/C198R, N52H/N57Y/V110A/C198R/R221I, M10I/S13G/N52H/N57Y/D77G/V110A/H129P/I143V/F172S/V193M, C198R, N52H/N57Y/R61C/Y62F/Q100R/V110N/F120S/C198R, N52H/N57Y/Q100R/V110D/H115R/C198R, N52H/N57Y/Q100R/V110D/N144D/F172S/C198R, N52S/H94E/L98F/Q100R, N52S/E90A, N30D/K42E/N52S, N52S/F120S/I143V/I224V, N52H/N57Y/Q100R/V110D/C198R/S212G, N52H/N57Y/Q100R/C198R, N52S/N194D, N52H/N57Y/Q100R/L102R/V110D/H115R/C198R, N52S/S54P, T38P/N52S/N57D, N52H/C140del/T225A, N52H/F78L/Q100R/C198R, N52H/N57Y/R75Q/Q100P/V110D, N52H/N57Y/L74Q/V110D/S192G, N52H/S121G/C198R, N52S/F120S/N227K, N52S/A71T/A117T/T190A/C198R, T43A/N52H/N57Y/L74Q/D89G/V110D/F172S, N52H/N57Y/Q100R/V110D/S132F/M175T, N52H/N57Y/Q100R/V107I/V110D/I154F/C198R/R221G, Q100R, F138L/L203P, N57Y/F138L/L203P, N57Y/Q100R/C198R, N57Y/F138L/L203P, Q100R/F138L, L203P, N52H/N57Y/Q100R/H115R/C198R, N52H/N57Y/Q100R/F172S/C198R, N52H/N57Y/Q100R/H115R/F172S/C198R, N52H/N57Y/Q100R/L102R/H115R/F172S/C198R, N52H/V122A/F172S/C198R, N52H/N57Y/Q100R/H115R/F172S/N194D, N52H/N57Y/H115R/F172S/C198R, N52H/N57Y/Q100R/H115R/C198R, N52H/N57Y/H115R, N52H/N57Y/Q100R/H115R, N52H/N57Y/Q100R/H115R/F172S/I224V, N52H/N57Y/Q100R/H115R/F172S, N52H/N57Y/Q100R/F172S, N52H/Q100R/H115R/I143T/F172S, N52H/N57Y/Q100P/H115R/F172S, N52Y/N57Y/Q100P/F172S, E16V/N52H/N57Y/Q100R/V110D/H115R/C198R, E16V/N52H/N57Y/Q100R/V110D/H115R/Y152C/K156M/F172S/C198R, N52S/E90A/H115R, N30D/K42E

N52S/H115R, N30D/K42E/N52S/H115R/C198R/R221I, N30D/K42E/N52S/H115R/C198R,
 N30D/K42E/N52S/H115R/F172S/N194D, N52S/H115R/F120S/I143V/C198R, N52S/H115R/F172S/C198R,
 N52H/N57Y/Q100P/C198R, N52H/N57Y/Q100P H115R/F172S/C198R, N52H/N57Y/Q100P/F172S/C198R,
 N52H/N57Y/Q100P/H115R, N52H/N57Y/Q100P/H115R/C198R, N52H/Q100R/C198R,
 N52H/Q100R/H115R/F172S, N52H/Q100R/F172S/C198R, N52H/Q100R/H115Q/F172S/C198R,
 N52H/N57Y/Q100R/F172S/C198R, N52Q/N207Q, N168Q/N207Q, N52Q/N168Q, N84Q/N207Q,
 N155Q/N207Q, N119Q/N168Q, N119Q/N207Q, N119Q/N155Q, N52Q/N84Q, N52Q/N119Q, N84Q/N119Q,
 N52Q/N84Q/N168Q, N52Q/N84Q/N207Q, N84Q/N155Q/N168Q, N84Q/N168Q/N207Q,
 N84Q/N155H/N207Q, N155Q/N168Q/N207Q, N119Q/N155Q/N168Q, N119Q/N168Q/N207Q,
 N84Q/N119Q/N207Q, N119Q/N155H/N207Q, N84Q/N119Q/N155Q, N52Q/N119Q/N155Q,
 N52H/N84Q/N119Q, N52H/N84Q, N52H/N84Q/N168Q, N52H/N84Q/N207Q, N52H/N84Q/N168Q/N207Q,
 N52Q/N84Q/N155Q, N52Q/N84Q/N168Q, N52Q/N84Q/N155Q/N168Q, N52Q/N84Q/N119Q/N168Q,
 N84Q/N119Q/N155Q/N168Q, N84Q/N155Q/N168Q/N207Q, N84Q/N119Q/N155Q/N207Q,
 N52Q/N84Q/N119Q/N207Q, N52Q/N84Q/N119Q/N155Q, N52Q/N84Q/N119Q/N155Q/N207Q или
 N84Q/N119Q/N155Q/N168Q/N207Q.

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

В некоторых воплощениях вариантный полипептид ICOSL включает любую из мутаций, перечисленных в табл. 1. В некоторых воплощениях вариантный полипептид ICOSL включает любую из последовательностей внеклеточного домена (ECD), перечисленных в табл. 1 (то есть любую из SEQ ID NO: 109-142, 239, 280-325, 364-381, 387-424, 427-433, 435-470). В некоторых воплощениях вариантный полипептид ICOSL включает полипептидную последовательность, которая имеет, по меньшей мере, 90, по меньшей мере, 91, по меньшей мере, 92, по меньшей мере, 93, по меньшей мере, 94, по меньшей мере, 95, такие как, по меньшей мере, 96, 97, 98 или 99% идентичности с любой из последовательностей внеклеточного домена (ECD), перечисленных в табл. 1 (то есть любой из SEQ ID NO: 109-142, 239, 280-325, 364-381, 387-424, 427-433, 435-470) и включает аминокислотную модификацию(ии), например, замену(ы), не присутствующую в ICOSL дикого типа или в немодифицированном ICOSL. В некоторых воплощениях вариантный полипептид ICOSL включает специфический связывающий фрагмент любой из последовательностей внеклеточного домена (ECD), перечисленных в табл. 1 (то есть любой из SEQ ID NO: 109-142, 239, 280-325, 364-381, 387-424, 427-433, 435-470) и включает аминокислотную модификацию(ии), например замену(ы), не присутствующую в ICOSL дикого типа или в немодифицированном ICOSL. В некоторых воплощениях вариантный полипептид ICOSL включает любую из последовательностей IgV, перечисленных в табл. 1 (то есть любую из SEQ ID NO: 197-199, 201-208, 210, 212, 240, 326-340, 382-386, 425-426 и 434). В некоторых воплощениях вариантный полипептид ICOSL включает полипептидную последовательность, которая имеет, по меньшей мере, 90, по меньшей мере, 91, по меньшей мере, 92, по меньшей мере, 93, по меньшей мере, 94, по меньшей мере, 95, такие как, по меньшей мере, 96, 97, 98 идентичности или 99% идентичности с любой из последовательностей IgV, перечисленных в табл. 1 (то есть с любой из SEQ ID NO: 197-199, 201-208, 210, 212, 240, 326-340, 382-386, 425-426 и 434) и включает аминокислотную модификацию(ии), например, замену(ы), не присутствующую в ICOSL дикого типа или в немодифицированном ICOSL. В некоторых воплощениях вариантный полипептид ICOSL включает специфический связывающий фрагмент любой из последовательностей IgV, перечисленных в табл. 1 (то есть в любой из SEQ ID NO: 197-199, 201-208, 210, 212, 240, 326-340, 382-386, 425-426 и 434) и включает аминокислотную замену(ы), не присутствующую в ICOSL дикого типа или в немодифицированном ICOSL. Мутации, обозначенные буквой "X", указывают на то, что обозначенное положение включает Q или остаток дикого типа, указанный в соответствующем положении SEQ ID NO: 32.

Таблица 1

Примерные варианты полипептиды ICOSL

Мутация(ии)	ECD SEQ ID NO	IgV SEQ ID NO
Дикий тип	32	196
N52S	109	197
N52H	110	198
N52D	111	199
N52Y/N57Y/F138L/L203P	112	
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/H129P/C198R	127	
N52H/L161P/C198R	128	
N52S/T113E	129	
S54A	130	207
N52D/S54P	131	208
N52K/L208P	132	
N52S/Y152H	133	
N52D/V151A	134	
N52H/I143T	135	
N52S/L80P	136	210
F120S/Y152H/N201S	137	
N52S/R75Q/L203P	138	
N52S/D158G	139	
N52D/Q133H	140	
N52S/N57Y/H94D/L96F/L98F/Q100R	141	212
N52S/N57Y/H94D/L96F/L98F/Q100R/G103E/F120S	142	
N52S/G103E	239	240
N52H/F78L/Q100R	280	326
N52H/N57Y/Q100R/V110D	281	327
N52H/N57Y/R75Q/Q100R/V110D	282	328
N52H/N57Y/Q100R	283	329
N52H/N57Y/L74Q/Q100R/V110D	284	330
N52H/Q100R	285	331
N52H/S121G	286	
A20V/N52H/N57Y/Q100R/S109G	287	332
N52H/N57Y/Q100P	288	333
N52H/N57Y/R61S/Q100R/V110D/L173S	289	
N52H/N57Y/Q100R/V122A	290	
N52H/N57Y/Q100R/F172S	291	
N52H/N57Y	292	334
N52S/F120S	293	
N52S/V97A	294	335
N52S/G72R	295	336
N52S/A71T/A117T	296	
N52S/E220G	297	
Y47H/N52S/V107A/F120S	298	
N52H/N57Y/Q100R/V110D/S132F/M175T	299	
E16V/N52H/N57Y/Q100R/V110D/H115R/Y152C/K156M/C198R	300	
Q37R/N52H/N57Y/Q100R/V110N/S142F/C198R/D217V/R221G	301	
N52H/N57Y/Q100R/V110D/C198R	302	
N52H/N57Y/Q100R/V110D/V116A/L161M/F172S/S192G/C198R	303	
F27S/N52H/N57Y/V110N	304	337
N52S/H94E/L96I/S109N/L166Q	305	

S18R/N52S/F93L/I143V/R221G	306	
A20T/N52D/Y146C/Q164L	307	
V11E/N30D/N52H/N57Y/H94E/L96I/L98F/N194D/V210A/I218T	308	
N52S/H94E/L96I/V122M	309	
N52H/N57Y/H94E/L96I/F120I/S126T/W153R/I218N	310	
M10V/S18R/N30D/N52S/S126R/T139S/L203F	311	
S25G/N30D/N52S/F120S/N227K	312	
N30D/N52S/L67P/Q100K/D217G/R221K/T225S	313	
N52H/N57Y/Q100R/V110D/A117T/T190S/C198R	314	
N52H/N57Y/Q100R/V110D/F172S/C198R	315	
S25G/F27C/N52H/N57Y/Q100R/V110D/E135K/L173S/C198R	316	
N52H/N57Y/V110A/C198R/R221I	317	
M10I/S13G/N52H/N57Y/D77G/V110A/H129P/I143V/F172S/V193M/C198R	318	
N52H/N57Y/R61C/Y62F/Q100R/V110N/F120S/C198R	319	
N52H/N57Y/Q100R/V110D/H115R/C198R	320	
N52H/N57Y/Q100R/V110D/N144D/F172S/C198R	321	
N52S/H94E/L98F/Q100R	322	338
N52S/E90A	323	339
N30D/K42E/N52S	324	340
N52S/F120S/I143V/I224V	325	
N52H/N57Y/Q100R/V110D/C198R/S212G	364	
N52H/N57Y/Q100R/C198R	365	
N52S/N194D	366	
N52H/N57Y/Q100R/L102R/V110D/H115R/C198R	367	
N52S/S54P	368	382
T38P/N52S/N57D	369	383
E111del	370	384
Y33del	371	385
N52H/C140del/T225A	372	
N52H/F78L/Q100R/C198R	373	
N52H/N57Y/R75Q/Q100P/V110D	374	386
N52H/N57Y/L74Q/V110D/S192G	375	
N52H/S121G/C198R	376	
N52S/F120S/N227K	377	
N52S/A71T/A117T/T190A/C198R	378	
T43A/N52H/N57Y/L74Q/D89G/V110D/F172S	379	
N52H/N57Y/Q100R/V110D/S132F/M175T	380	
N52H/N57Y/Q100R/V107I/V110D/I154F/C198R/R221G	381	
N84Q	387	425
N119Q	388	
N168Q	389	
N207Q	390	
N52Q/N207X	391	
N168X/N207X	392	
N52Q/N168Q	393	
N84Q/N207Q	394	

N155Q/N207Q	395	
N119Q/N168Q	396	
N119Q/N207Q	397	
N119Q/N155X	398	
N52Q/N84Q	399	426
N52Q/N119Q	400	
N84Q/N119Q	401	
N52Q/N84Q/N168Q	402	
N52Q/N84Q/N207Q	403	
N84Q/N155Q/N168Q	404	
N84Q/N168Q/N207Q	405	
N84Q/N155H/N207Q	406	
N155Q/N168Q/N207Q	407	
N119Q N155Q/N168Q	408	
N119Q/N168Q/N207Q	409	
N84Q/N119Q/N207Q	410	
N119Q/N155H/N207Q	411	
N84Q/N119Q/N155Q	412	
N52Q/N119Q/N155Q	413	
N52H/N84Q/N119Q	414	
N52H/N84Q/N168X/N207X	415	
N52Q/N84Q/N155X/N168X	416	
N52Q/N84Q/N119Q/N168Q	417	
N84Q/N119Q/N155Q/N168Q	418	
N84Q/N155Q/N168Q/N207Q	419	
N84Q/N119Q/N155Q/N207Q	420	
N52Q/N84Q/N119Q/N207Q	421	
N52Q/N84Q/N119Q/N155Q	422	
N52Q/N84Q/N119Q/N155Q/N207Q	423	
N84Q/N119Q/N155Q/N168Q/N207Q	424	
Q100R	427	434
F138L/L203P	428	
N52Y/F138L/L203P	429	
N57Y/Q100R/C198R	430	
N57Y/F138L/L203P	431	
Q100R/F138L	432	
L203P	433	
N52H/N57Y/Q100R/H115R/C198R	435	
N52H/N57Y/Q100R/F172S/C198R	436	
N52H/N57Y/Q100R/H115R/F172S/C198R	437	
N52H/N57Y/Q100R/H115R/I143V/F172S/C198R	438	
N52H/N57Y/Q100R/L102R/H115R/F172S/C198R	439	
N52H/V122A/F172S/C198R	440	
N52H/N57Y/Q100R/H115R/F172S/N194D	441	
N52H/N57Y/H115R/F172S/C198R	442	
N52H/N57Y/Q100R/H115R/C198R	443	

N52H/N57Y/H115R	444	
N52H/N57Y/Q100R/H115R	445	
N52H/N57Y/Q100R/H115R/F172S/I224V	446	
N52H/N57Y/Q100R/H115R/F172S	447	
N52H/N57Y/Q100R/F172S	448	
N52H/Q100R/H115R/I143T/F172S	449	
N52H/N57Y/Q100P/H115R/F172S	450	
N52Y/N57Y/Q100P/F172S	451	
E16V/N52H/N57Y/Q100R/V110D/H115R/C198R	452	
E16V/N52H/N57Y/Q100R/V110D/H115R/Y152C/K156M/F172S/C198R	453	
N52S/E90A/H115R	454	
N30D/K42E N52S/H115R	455	
N30D/K42E/N52S/H115R/C198R/R221I	456	
N30D/K42E/N52S/H115R/C198R	457	
N30D/K42E/N52S/H115R/F172S/N194D	458	
N52S/H115R/F120S/I143V/C198R	459	
N52S/H115R/F172S/C198R	460	
N52H/N57Y/Q100P/C198R	461	
N52H/N57Y/Q100P H115R/F172S/C198R	462	
N52H/N57Y/Q100P/F172S/C198R	463	
N52H/N57Y/Q100P/H115R	464	
N52H/N57Y/Q100P/H115R/C198R	465	
N52H/Q100R/C198R	466	
N52H/Q100R/H115R/F172S	467	
N52H/Q100R/H115X/F172S/C198R	468	
N52H/Q100R/H115R/F172S/C198R	469	
N52H/N57Y/Q100R/F172S/C198R	470	

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

В некоторых воплощениях вариантный полипептид ICOSL имеет одну или более аминокислотную модификацию, например, замену, соответствующую положению(ям) 52, 54 или 57. В некоторых воплощениях вариантный полипептид ICOSL имеет одну или несколько аминокислотных модификаций, например замену, выбранную из N52H, N52D, N52Q, N52S, N52Y, N52K, S54A, S54P или N57Y или консервативную аминокислотную модификацию, например, замену. В некоторых воплощениях вариантный полипептид ICOSL имеет одну или несколько аминокислотных модификаций, например замену, выбранную из N52H, N52D, N52S, N52K или N57Y или консервативную аминокислотную модификацию, например замену.

В некоторых воплощениях вариантный полипептид ICOSL может содержать одну или несколько дополнительных аминокислотных модификаций, например, замену в дополнение к аминокислотной модификации, например, замену в положении, соответствующем положению 52, 54 или 57. В некоторых воплощениях одна или несколько аминокислотных модификаций, например замена, находятся в положении, соответствующем 10, 11, 13, 16, 18, 20, 25, 27, 30, 37, 42, 43, 47, 52, 54, 57, 61, 62, 67, 71, 72, 74, 75, 77, 78, 80, 84, 89, 90, 92, 93, 94, 96, 97, 98, 99, 100, 102, 103, 107, 109, 110, 113, 115, 116, 117, 119, 120, 121, 122, 126, 129, 130, 132, 133, 135, 138, 139, 140, 142, 143, 144, 146, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 158, 161, 166, 168, 172, 173, 175, 190, 192, 193, 194, 198, 201, 203, 207, 208, 210, 212, 217, 221, 224, 225 или 227. В некоторых воплощениях вариантный ICOSL включает одну или несколько аминокислотных модификаций, например замену, выбранных из M10V, M10I, V11E, S13G, E16V, S18R, A20V, S25G, F27S, F27C, N30D, Y33del, Q37R, K42E, T43A, Y47H, N52H, N52D, N52S, N52Y, N52K, N52Q, S54A, S54P, N57D, N57Y, R61S, R61C, Y62F, L67P, A71T, G72R, L74Q, R75Q, D77G, F78L, L80P, N84Q, D89G, E90A, K92R, F93L, H94E, H94D, L96F, L96I, V97A, L98F, S99G, Q100R, Q100K, Q100P, L102R, G103E, V107A, V107I, S109G, S109N, V110D, V110N, V110A, E111del, T113E, H115R, H115Q, V116A, A117T, N119Q, F120I, F120S, S121G, V122A, V122M, S126T, S126R, H129P, S130G, S132F, Q133H, E135K, F138L, T139S, C140del, S142F, I143V, I143T, N144D, Y146C, V151A, Y152C, Y152H, W153R, I154F, K156M, D158G, L161P, L161M, L166Q, N168Q, F172S, L173S, M175T, T190A, T190S, S192G, V193M, N194D, C198R, N201S, L203P, L203F, N207Q, L208P, V210A, S212G, D217V, I218T, I218N, E220G, R221G, R221I, I224V, T225A, N227K или их консервативных аминокислотных замен.

В некоторых воплощениях любого из вариантных полипептидов ICOSL, описанных выше, вариантный полипептид ICOSL дополнительно включает одну или несколько аминокислотных делеций, соот-

ветствующих положению 140 из SEQ ID NO: 32.

В некоторых воплощениях вариантный полипептид ICOSL имеет еще одну или несколько аминокислотных модификаций, например, замен, выбранных из числа N52Y/N57Y/F138L/L203P, N52H/N57Y/Q100P, N52S/Y146C/Y152C, N52H/C198R, N52H/C140del/T225A, N52H/C198R/T225A, N52H/K92R, N57Y/Q100P, N52S/C198R, N52Y/N57Y/Y152C, N52Y/N57Y/H129P/C198R, N52H/L161P/C198R, N52S/T113E, N52S/S54P, N52K/L208P, N52S/Y152H, N52H/I143T, N52S/R75Q/L203P, N52S/D158G, N52D/Q133H, N52H/N57Y/Q100R/V110D/C198R/S212G, N52H/N57Y/Q100R/C198R, N52S/N194D, N52H/N57Y/Q100R/L102R/V110D/H115R/C198R, N52S/S54P, T38P/N52S/N57D, N52H/C140del/T225A, N52H/F78L/Q100R/C198R, N52H/N57Y/R75Q/Q100P/V110D, N52H/N57Y/L74Q/V110D/S192G, N52H/S121G/C198R, N52S/F120S/N227K, N52S/A71T/A117T/T190A/C198R, T43A/N52H/N57Y/L74Q/D89G/V110D/F172S, N52H/N57Y/Q100R/V110D/S132F/M175T, N52H/N57Y/Q100R/V107I/V110D/I154F/C198R/R221G, N52Q/N207Q, N52Q/N168Q, N52Q/N84Q, N52Q/N119Q, N52Q/N84Q/N168Q, N52Q/N84Q/N207Q, N52Q/N119Q/N155Q, N52H/N84Q/N119Q, N52H/N84Q/N168Q, N52H/N84Q/N207Q, N52H/N84Q/N168Q/N207Q, N52Q/N84Q/N155Q, N52Q/N84Q/N168Q, N52Q/N84Q/N155Q/N168Q, N52Q/N84Q/N119Q/N168Q, N52Q/N84Q/N119Q/N207Q, N52Q/N84Q/N119Q/N155Q, N52Q/N84Q/N119Q/N155Q/N207Q, N52Y/F138L/L203P, N57Y/Q100R/C198R, N57Y/F138L/L203P, N52H/N57Y/Q100R/H115R/C198R, N52H/N57Y/Q100R/F172S/C198R, N52H/N57Y/Q100R/H115R/F172S/C198R, N52H/N57Y/Q100R/H115R/F172S/C198R, N52H/V122A/F172S/C198R, N52H/N57Y/Q100R/H115R/F172S/N194D, N52H/N57Y/H115R/F172S/C198R, N52H/N57Y/Q100R/H115R/C198R, N52H/N57Y/H115R, N52H/N57Y/Q100R/H115R, N52H/N57Y/Q100R/H115R/F172S/I224V, N52H/N57Y/Q100R/H115R/F172S, N52H/N57Y/Q100R/F172S, N52H/Q100R/H115R/I143T/F172S, N52H/N57Y/Q100P/H115R/F172S, N52Y/N57Y/Q100P/F172S, E16V/N52H/N57Y/Q100R/V110D/H115R/C198R, E16V/N52H/N57Y/Q100R/V110D/H115R/Y152C/K156M/F172S/C198R, N52S/E90A/H115R, N30D/K42E/N52S/H115R, N30D/K42E/N52S/H115R/C198R/R221I, N30D/K42E/N52S/H115R/C198R, N30D/K42E/N52S/H115R/F172S/N194D, N52S/H115R/F120S/I143V/C198R, N52S/H115R/F172S/C198R, N52H/N57Y/Q100P/C198R, N52H/N57Y/Q100P H115R/F172S/C198R, N52H/N57Y/Q100P/F172S/C198R, N52H/N57Y/Q100P/H115R, N52H/N57Y/Q100P/H115R/C198R, N52H/Q100R/C198R, N52H/Q100R/H115R/F172S, N52H/Q100R/F172S/C198R, N52H/Q100R/H115R/F172S/C198R или N52H/N57Y/Q100R/F172S/C198R.

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

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

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

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

В некоторых воплощениях вариантный полипептид ICOSL проявляет повышенную аффинность связывания с ICOS и проявляет пониженную аффинность связывания с CD28. В некоторых воплощениях одна или несколько дополнительных аминокислотных замен находятся в положении, соответствующем 52, 57, 80 100, 130, 152, 161 или 198. В некоторых воплощениях вариантный ICOSL включает одну или несколько аминокислотных замен, выбранных из N52S, N52H, N52Y, N52H, N57Y, L80P, Q100P Q100R, Q100K, V110D, S130G, Y152C, L161P, L161M, C198R, R221G или их консервативных аминокислотных замен. В некоторых воплощениях вариантный полипептид ICOSL имеет одну или не-

сколько аминокислотных замен, выбранных из N57Y/Q100P, N52S/S130G/Y152C, N52S/Y152C, N52Y/N57Y/Y152C, N52H/L161P/C198R, N52H/L161P/C198R, N52S/L80P, A20V/N52H/N57Y/Q100R/S109G, N52H/N57Y/R61S/Q100R/V110D/L173S, N52H/N57Y/Q100R/V107I/V110D/S132F/I154F/C198R/R221G, Q37R/N52H/N57Y/Q100R/V110N/S142F/C198R/D217V/R221G, N52H/N57Y/Q100R/V110D/C198R, F27S/N52H/N57Y/V110N, S18R/N52S/F93L/I143V/R221G, A20T/N52D/Y146C/Q164L, N52H/N57Y/H94E/L96I/F120I/S126T/W153R/I218N, N52H/N57Y/Q100R/V110D/F172S/C198R, S25G/F27C/N52H/N57Y/Q100R/V110D/E135K/L173S/C198R, M10I/S13G/N52H/N57Y/D77G/V110A/H129P/I143V/F172S/V193M/C198R.

В некоторых воплощениях вариантный полипептид ICOSL проявляет повышенную аффинность связывания с CD28 и проявляет пониженную аффинность связывания с ICOS. В некоторых воплощениях одна или несколько аминокислотных замен находится в положении, соответствующем 52, 75 или 203. В некоторых воплощениях вариантный ICOSL включает одну или несколько аминокислотных замен, выбранных из N52S, R75Q, L203F или L203P. В некоторых воплощениях вариантный полипептид ICOSL имеет аминокислотные замены N52S/R75Q/L203P.

В некоторых воплощениях вариантный полипептид ICOSL имеет одну или несколько аминокислотных модификаций, например, замену в немодифицированном ICOSL или его специфическом связывающем фрагменте, соответствующего положению(ям) 16, 30, 42, 52, 57, 90, 100, 102, 110, 115, 120, 122, 138, 143, 152, 156, 172, 194, 198, 203, 221 или 224 относительно нумерации SEQ ID NO: 32. В некоторых воплощениях вариантный полипептид ICOSL имеет одну или несколько аминокислотных модификаций, например, замен, выбранных из E16V, N30D, K42E, N52H, N52Y, N52S, N57Y, E90A, Q100R, Q100P, L102R, V110D, H115R, F120S, V122A, F138L, I143V, I143T, H152C, K156M, F172S, N194D, C198R, L203P, R221I или I224V. В некоторых воплощениях вариантный полипептид ICOSL имеет одну или несколько аминокислотных модификаций, например, замен в немодифицированном ICOSL или его специфическом связывающем фрагменте, соответствующих положению(ям) 115, 172 или 198, относительно нумерации SEQ ID NO: 32. В некоторых воплощениях вариантный полипептид ICOSL имеет одну или несколько аминокислотных модификаций, например, замен, выбранных из H115R, F172S или C198R. В некоторых воплощениях одна или несколько аминокислотных модификаций, например замен, представляют собой N52H/N57Y/Q100R/H115R/C198R, N52H/N57Y/Q100R/F172S/C198R, N52H/N57Y/Q100R/H115R/F172S/C198R, N52H/N57Y/Q100R/H115R/I143V/F172S/C198R, N52H/N57Y/Q100R/L102R/H115R/F172S/C198R, N52H/V122A/F172S/C198R, N52H/N57Y/Q100R/H115R/F172S/N194D, N52H/N57Y/H115R/F172S/C198R, N52H/N57Y/Q100R/H115R/C198R, N52H/N57Y/H115R, N52H/N57Y/Q100R/H115R, N52H/N57Y/Q100R/H115R/F172S/I224V, N52H/N57Y/Q100R/H115R/F172S, N52H/N57Y/Q100R/F172S, N52H/Q100R/H115R/I143T/F172S, N52H/N57Y/Q100P/H115R/F172S, N52Y/N57Y/Q100P/F172S, E16V/N52H/N57Y/Q100R/V110D/H115R/C198R, E16V/N52H/N57Y/Q100R/V110D/H115R/Y152C/K156M/F172S/C198R, N52S/E90A/H115R, N30D/K42E N52S/H115R, N30D/K42E/N52S/H115R/C198R/R221I, N30D/K42E/N52S/H115R/C198R, N30D/K42E/N52S/H115R/F172S/N194D, N52S/H115R/F120S/I143V/C198R, N52S/H115R/F172S/C198R, N52H/N57Y/Q100P/C198R, N52H/N57Y/Q100P H115R/F172S/C198R, N52H/N57Y/Q100P/F172S/C198R, N52H/N57Y/Q100P/H115R, N52H/N57Y/Q100P/H115R/C198R, N52H/Q100R/C198R, N52H/Q100R/H115R/F172S, N52H/Q100R/F172S/C198R, N52H/Q100R/H115R/F172S/C198R или N52H/N57Y/Q100R/F172S/C198R. В некоторых воплощениях варианты полипептиды ICOSL демонстрируют потенциально повышенную растворимость в белках или повышенную экспрессию белка ("мутации растворимости") относительно полипептида ICOSL дикого типа или немодифицированного полипептида ICOSL.

В некоторых воплощениях вариантный полипептид ICOSL включает любую из последовательностей внеклеточного домена (ECD), представленную в SEQ ID NO: 435-470. В некоторых воплощениях вариантный полипептид ICOSL включает полипептидную последовательность, которая имеет, по меньшей мере, 90, по меньшей мере, 91, по меньшей мере, 92, по меньшей мере, 93, по меньшей мере, 94, по меньшей мере, 95, такие как, по меньшей мере, 96, 97, 98 или 99% идентичности с любым из внеклеточных доменов (ECD), представленных в SEQ ID NO: 435-470, и включает аминокислотную модификацию(ии), например замену(ы) отсутствующую в ICOSL дикого типа или немодифицированном ICOSL. В некоторых воплощениях вариантный полипептид ICOSL включает специфический связывающий фрагмент любой из последовательностей внеклеточного домена (ECD), представленных в SEQ ID NO: 435-470, и включает аминокислотную модификацию(ии), например, замену(ы) в ICOSL дикого типа или немодифицированном ICOSL.

В некоторых воплощениях вариантный полипептид ICOSL имеет одну или более аминокислотную модификацию, например, замену в немодифицированном ICOSL или его специфическом связывающем фрагменте, соответствующую положению(ям) 52, 57, 100, 138, 198 или 203 относительно нумерации SEQ ID NO: 32. В некоторых воплощениях вариантный полипептид ICOSL имеет одну или несколько аминокислотных модификаций, например, замен, выбранных из N52H, N52Y, N57Y, Q100R, Q100P, F138L,

C198R или L203P. В некоторых воплощениях одна или несколько аминокислотных модификаций, например, замен, представляют собой Q100R, F138L/L203P, N52Y/F138L/L203P, N57Y/Q100R/C198R, N57Y/F138L/L203P, N52H, N57Y, N57Y/Q100P, Q100R/F138L, или L203P.

В некоторых воплощениях вариантный полипептид ICOSL включает любую из последовательностей внеклеточного домена (ECD), представленных в SEQ ID NO: 427-433. В некоторых воплощениях вариантный полипептид ICOSL включает полипептидную последовательность, которая имеет, по меньшей мере, 90, по меньшей мере, 91, по меньшей мере, 92, по меньшей мере, 93, по меньшей мере, 94, по меньшей мере, 95, такие как, по меньшей мере, 96, 97, 98 или 99% идентичности с любым из внеклеточных доменов (ECD), представленных в SEQ ID NO: 427-433, и включает аминокислотную модификацию(ии), например замену(ы), которая отсутствует в ICOSL дикого типа или немодифицированном ICOSL. В некоторых воплощениях вариантный полипептид ICOSL включает специфический связывающий фрагмент любой из последовательностей внеклеточного домена (ECD), представленных в SEQ ID NO: 427-433 и содержащих аминокислотную модификацию(ии), например, замену(ы) в ICOSL дикого типа или немодифицированном ICOSL. В некоторых воплощениях вариантный полипептид ICOSL включает последовательность IgV, представленную в SEQ ID NO: 434. В некоторых воплощениях вариантный полипептид ICOSL включает полипептидную последовательность, которая имеет, по меньшей мере, 90, по меньшей мере, 91, по меньшей мере, 92, по меньшей мере, 93, по меньшей мере, 94, по меньшей мере, 95, такие как, по меньшей мере, 96, 97, 98 или 99% идентичности с последовательностью IgV, представленной в SEQ ID NO: 434, и включает аминокислотную модификацию(ии), например, замену(ы), отсутствующую в ICOSL дикого типа или немодифицированном ICOSL. В некоторых воплощениях вариантный полипептид ICOSL включает специфический связывающий фрагмент последовательности IgV, представленной в SEQ ID NO: 434, и включает аминокислотную замену(ы), не присутствующую в ICOSL дикого типа или немодифицированном ICOSL.

В некоторых воплощениях вариантный полипептид ICOSL имеет одну или более аминокислотную модификацию, например, замену в немодифицированном ICOSL или его специфическом связывающем фрагменте, соответствующую положению(ям) 52, 84, 91, 119, 155, 168, 207 относительно нумерации SEQ ID NO: 32. В некоторых воплощениях вариантный полипептид ICOSL имеет одну или несколько аминокислотных модификаций, например, замен, выбранных из A91S, N52H, N52Q, N84Q, N119Q, N155H, N155Q, N168Q, N207Q. В некоторых воплощениях одна или несколько аминокислотных модификаций, например замен, представляют собой N84Q, N119Q, N168Q, N207Q, N52Q, N52Q/N207Q, N168Q/N207Q, N52Q/N168Q, N84Q/N207Q, N155Q/N207Q, N119Q/N168Q, N119Q/N207Q, N119Q/N155Q, N52Q/N84Q, N52Q/N119Q, N84Q/N119Q, N52Q/N84Q/N168Q, N52Q/N84Q/N207Q, N84Q/N155Q/N168Q, N84Q/N168Q/N207Q, N84Q/N155H/N207Q, N155Q/N168Q/N207Q, N119Q N155Q/N168Q, N119Q/N168Q/N207Q, N84Q/N119Q/N207Q, N119Q/N155H/N207Q, N84Q/N119Q/N155Q, N52Q/N119Q/N155Q, N52H/N84Q/N119Q, N52H/N84Q, N52H/N84Q/N168Q, N52H/N84Q/N207Q, N52H/N84Q/N168Q/N207Q, N52Q/N84Q/N155Q, N52Q/N84Q/N168Q, N52Q/N84Q/N155Q/N168Q, N52Q/N84Q/N119Q/N168Q, N84Q/N119Q/N155Q/N168Q, N84Q/N155Q/N168Q/N207Q, N84Q/N119Q/N155Q/N207Q, N52Q/N84Q/N119Q/N207Q, N52Q/N84Q/N119Q/N155Q, N52Q/N84Q/N119Q/N155Q/N207Q, N84Q/N119Q/N155Q/N168Q/N207Q или A91S/N119Q/N168Q/N207Q. В некоторых воплощениях вариантыные полипептиды ICOSL проявляют потенциально сниженное гликозилирование относительно полипептида ICOSL дикого типа или немодифицированного полипептида ICOSL.

В некоторых воплощениях вариантный полипептид ICOSL включает любой из последовательностей внеклеточного домена (ECD) представлены в SEQ ID NO: 387-424, 427-433, 435-470. В некоторых воплощениях вариантный полипептид ICOSL включает полипептидную последовательность, которая имеет, по меньшей мере, 90, по меньшей мере, 91, по меньшей мере, 92, по меньшей мере, 93, по меньшей мере, 94, по меньшей мере, 95, такие как, по меньшей мере, 96, 97, 98 или 99% идентичности с любым из внеклеточных доменов (ECD), представленных в SEQ ID NO: 387-424, 427-433, 435-470 и содержащем аминокислотную модификацию(ии), например, замену(ы), отсутствующее в ICOSL дикого типа или немодифицированном ICOSL. В некоторых воплощениях вариантный полипептид ICOSL включает специфический связывающий фрагмент любой последовательности внеклеточного домена (ECD), представленной в SEQ ID NO: 387-424, 427-433, 435-470 и содержащей аминокислотную модификацию(ии), например замену(ы), отсутствующую в ICOSL дикого типа или немодифицированном ICOSL. В некоторых воплощениях вариантный полипептид ICOSL включает любую из последовательностей IgV, представленных в SEQ ID NO: 425-426. В некоторых воплощениях вариантный полипептид ICOSL включает полипептидную последовательность, которая имеет, по меньшей мере, 90, по меньшей мере, 91, по меньшей мере, 92, по меньшей мере, 93, по меньшей мере, 94, по меньшей мере, 95, такие как, по меньшей мере, 96, 97, 98 или 99% идентичности с любой из последовательностей IgV, указанных в SEQ ID NO: 425-426, и включает аминокислотную модификацию(ии), например, замену(ы), отсутствующую в ICOSL дикого типа или немодифицированном ICOSL. В некоторых воплощениях вариантный полипептид ICOSL включает специфический связывающий фрагмент любой из последовательностей IgV, представленных в SEQ ID NO: 425-426, и включает аминокислотную замену(ы), отсутствующие в ICOSL ди-

кого типа или немодифицированном ICOSL.

III. Форматы вариантных полипептидов.

Иммуномодуляторный полипептид, содержащий вариантный ICOSL, представленный в данном документе, в котором, содержится vIgD, может быть задан в формате различных форм, в том числе и в виде растворимого белка, мембранного связанного белка, секретируемого белка, конъюгата или слитого белка или для экспрессии с помощью инфекционного агента. В некоторых воплощениях конкретный формат может быть выбран для искомого терапевтического применения. В некоторых случаях иммуномодулирующий полипептид, содержащий вариантный полипептид ICOSL, предоставляется в формате для того, чтобы оказывать антагонистичное воздействие или блокировать активность его когнатного партнера связывания, например, CD28. В некоторых воплощениях антагонизм CD28 может быть полезен для лечения воспаления или аутоиммунитета. В некоторых случаях иммуномодулирующий полипептид, содержащий вариантный полипептид ICOSL, предоставляется в форме для агонистического воздействия или стимуляции активности его когнатного партнера связывания, например, CD28. В некоторых воплощениях агонизм CD28 может быть полезен для лечения онкологических заболеваний. Специалист в данной области может легко определить активность конкретного формата, например, для антагонизма или агонизма одного или нескольких конкретных когнатных партнеров связывания. Примерные способы оценки таких видов активности приведены в данном документе, в том числе в примерах.

В некоторых аспектах, предлагаемое являются иммуномодулирующими белками, содержащими vIgD из ICOSL, где такие белки являются растворимыми, например, слитые с Fc-цепью. В некоторых аспектах один или несколько дополнительных доменов IgSF, таких как один или несколько дополнительных vIgD, могут быть связаны с vIgD из ICOSL, как указано в данном документе (далее называемый "стек" или "стековый" иммуномодулирующий белок). В некоторых воплощениях модульный формат предлагаемых иммуномодулирующих белков обеспечивает гибкость при разработке или получении иммуномодулирующих белков для модуляции активности множественных контрструктур (множественных когнатных партнеров связывания). В некоторых воплощениях такие "стековые" молекулы могут быть представлены в растворимом формате или, в некоторых случаях, могут быть представлены в виде связанных с мембраной или секретируемых белков. В некоторых воплощениях вариантный иммуномодулирующий белок ICOSL предоставляется в виде конъюгата, в котором имеет место прямое или косвенное связывание ICOSL с нацеливающим агентом или функциональным фрагментом, например, с антителом или другими связывающими молекулами, которые специфически связываются с лигандом, например антигеном, например, для нацеливания или локализации vIgD в конкретной среде или клетке, например, при введении объекту. В некоторых воплощениях нацеливающий агент, например, антитело или другая связывающая молекула, связывается с опухолевым антигеном, тем самым локализуя вариантный ICOSL, содержащий vIgD, в микроокружении опухоли, например, для модуляции активности инфильтрационных опухолей лимфоцитов (TIL), специфичных для микроокружения опухоли.

В некоторых воплощениях, предлагаемые иммуномодулирующие белки экспрессируются в клетках и предлагаются как часть конструируемой клеточной терапии (ECT). В некоторых воплощениях вариантный полипептид ICOSL экспрессируется в клетке, такой как иммунная клетка (например, Т-клетка или клетка, представляющая антиген), в связанной с мембраной форме, тем самым обеспечивая трансмембранный иммуномодулирующий белок (далее также называемый "TIP"). В некоторых воплощениях, в зависимости от когнатного партнера связывания, распознаваемого TIP, сконструированные клетки, экспрессирующие TIP, могут оказывать агонистичное воздействие на когнатного партнера связывания, путем предоставления костимулирующего сигнала, положительного или отрицательного, другим сконструированным клеткам и/или эндогенным Т-клеткам. В некоторых аспектах вариантный полипептид ICOSL экспрессируется в клетке, такой как иммунная клетка (например, Т-клетка или клетка, представляющая антиген), в секретируемой форме, чтобы таким образом продуцировать секретируемую или растворимую форму вариантного полипептида ICOSL (далее также называемого "SIP"), например, когда клетки вводят объекту. В некоторых аспектах SIP может оказывать антагонистическое воздействие на когнатного партнера связывания в окружающей среде (например, в микроокружении опухоли), в котором он секретируется. В некоторых воплощениях вариантный полипептид ICOSL экспрессируется в инфекционном агенте (например, вирусном или бактериальном агенте), который при введении объекту способен инфицировать клетку *in vivo*, такую как иммунная клетка (например, Т-клетка или антигенпредставляющая клетка) или опухоль, для доставки или экспрессии вариантного полипептида в виде TIP или SIP в клетке.

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

Неограничивающие примеры предлагаемых форматов описаны на фиг. 13А-13С и дополнительно описано ниже.

А. Растворимый белок.

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

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

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

В некоторых воплощениях изобретения иммуномодулирующий белок включает вариантный полипептид ICOSL, присоединенный к Fc иммуноглобулина (приводит к получению "иммуномодулирующего Слитого с Fc белка", такого как "вариантный слитый белок ICOSL-Fc" также называемым слитым белком ICOSL vIgD-Fc). В некоторых воплощениях присоединение вариантного полипептида ICOSL находится на N-конце Fc. В некоторых воплощениях присоединение вариантного полипептида ICOSL находится на C-конце Fc. В некоторых воплощениях два или более вариантных полипептида ICOSL (одинаковые или разные) независимо присоединены на N-конце и на C-конце.

В некоторых воплощениях Fc является мышинным или человеческим Fc. В некоторых воплощениях Fc представляет собой области Fc из IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 млекопитающих или человека. В некоторых воплощениях Fc получают из IgG1, такого как IgG1 человека. В некоторых воплощениях Fc включает аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 226, или аминокислотную последовательность, которая имеет, по меньшей мере, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% или более идентичности последовательности с SEQ ID NO: 226.

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

В некоторых воплощениях одна или несколько аминокислотных модификаций могут быть введены в Fc-область вариантного слитого белка ICOSL -Fc, представленной в данном описании, тем самым формируя вариантную область Fc. В некоторых воплощениях вариантная область Fc уменьшает эффекторную функцию. Существует много примеров изменений или мутаций в последовательностях Fc, которые могут изменять эффекторную функцию. Например, WO 00/42072, WO 2006019447, WO 2012125850, WO

2015/107026, US 2016/0017041 и Shields et al. J Biol. Chem. 9(2): 6591-6604 (2001) описывают примерные варианты Fc с улучшенным или уменьшенным связыванием с FcR. Содержание этих публикаций специально включено в данный документ ссылкой.

В некоторых воплощениях настоящего изобретения предлагаемые вариантные слитые белки ICOSL-Fc содержат область Fc, которая проявляет пониженные эффекторные функции, что делает их желательным кандидатом для приложений, в которых является важным период полувыведения вариантного слитого белка ICOSL-Fc *in vivo*, а некоторые эффекторные функции (такие как CDC и ADCC) не нужны или вредны.

Анализ цитотоксичности *in vitro* и/или *in vivo* могут проводиться для подтверждения сокращения/истощения активности CDC и/или ADCC. Например, анализы связывания Fc-рецептора (FcR) могут быть проведены для того, чтобы гарантировать, что вариантный слитый белок ICOSL-Fc утратил способность связывания с FcγR (следовательно, вероятно, не имеет активности ADCC), но сохраняет способность связывания FcRn. Первичные клетки, опосредующие ADCC, NK-клетки, экспрессируют только FcγRIII, тогда как моноциты экспрессируют FcγRI, FcγRII и FcγRIII. Экспрессия FcR на гематopoэтических клетках приведена в табл. 3 на стр. 464 Ravetch and Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9:457-492 (1991). Неограничивающие примеры анализов *in vitro* для оценки активности ADCC представляющей интерес молекулы описаны в патенте США № 5500362 (см., например, Hellstrom, I. et al. *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 83:7059-7063 (1986)) и Hellstrom, I et al., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA*, 82: 1499-1502 (1985); Патенте США № 5821337 (см. Bruggemann, M. et al, *J. Exp., Med.*, 166: 1351-1361 (1987)). В качестве альтернативы могут быть использованы методы нерадиоактивного анализа (см., например, нерадиоактивный анализ цитотоксичности АСТИ™ для проточной цитометрии (CellTechnology, Inc. Маунтин-Вью, Калифорния) и нерадиоактивный анализ цитотоксичности CytoTox 96™ (Promega, Мэдисон, Висконсин). Полезные эффекторные клетки для таких анализов включают мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC) и клетки-натуральные киллеры (NK). В ином случае или дополнительно активность ADCC представляющей интерес молекулы может быть оценена *in vivo*, например, в модели на животных, такой как описанная в dynes et al. *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 95:652-656 (1998). Анализы связывания C1q также могут быть проведены для подтверждения того, что вариантный слитый белок ICOSL-Fc не может связывать C1q и, следовательно, не обладает активностью CDC. См., например, ELISA для определения связывания C1q и C3c в WO 2006/029879 и WO 2005/100402. Для оценки активации комплемента может быть проведен анализ CDC (см., например, Gazzano-Santoro et al., *J. Immunol. Methods* 202:163 (1996); Cragg, M. S. et al., *Blood* 101:1045-1052 (2003); и Cragg, M. S. and M. J. Glennie, *Blood* 103:2738-2743 (2004)). Связывание FcRn и определение клиренса/полувыведения *in vivo* также могут быть выполнены с использованием способов, известных в данной области (см., например, Petkova, SB et al., *Int'l. Immunol.* 18(12): 1759-1769 (2006)).

Вариантные слитые белки ICOSL-Fc с пониженной эффекторной функцией включают те, у которых заменен один или несколько остатков в области Fc из числа 238, 265, 269, 270, 297, 327 и 329 по нумерации EU (пат. США № 6737056). Такие Fc-мутанты включают Fc-мутанты с заменами в двух или более положениях аминокислот из числа 265, 269, 270, 297 и 327 по нумерации EU, включая так называемый "DANA" Fc-мутант с заменой остатков 265 и 297 на аланин (пат. США № 7332581).

В некоторых воплощениях Fc-область вариантных слитых белков ICOSL-Fc имеет Fc область, в которой любая одна или несколько из аминокислот в положениях 234, 235, 236, 237, 238, 239, 270, 297, 298, 325, и 329 (обозначенные по нумерации EU) заменены различными аминокислотами по сравнению с нативной Fc-областью. Такие изменения Fc-области не ограничиваются описанными выше изменениями и включают, например, такие изменения, как дегликозилированные цепи (N297A и N297Q), IgG1-N297G, IgG1-L234A/L235A, IgG1-L234A/L235E/G237A, IgG1-A325A/A330S/P331S, IgG1-C226S/C229S, IgG1-C226S/C229S/E233P/L234V/L235A, IgG1-E233P/L234V/L235A/G236del/S267K, IgG1-L234F/L235E/P331S, IgG1-S267E/L328F, IgG2-V234A/G237A, IgG2-H268Q/V309L/A330S/A331S, IgG4-L235A/G237A/E318A и IgG4-L236E, описанные в "Current Opinion in Biotechnology" (2009) 20 (6), 685-691; такие как G236R/L328R, L235G/G236R, N325A/L328R и N325L/L328R, описанные в WO 2008/092117; аминокислотные вставки в положениях 233, 234, 235 и 237 (обозначены по нумерации EU); и изменения в сайтах, описанных в WO 2000/042072.

Описаны некоторые варианты Fc с повышенным или пониженным связыванием с FcR. (см., например, пат. США № 6 737 056, WO 2004/056312, WO 2006019447 и Shields et al., *J. Biol. Chem.* 9(2): 6591-6604 (2001)).

В некоторых воплощениях изобретения, предложен вариант синтеза ICOSL-Fc, включающий вариантную Fc-область, содержащую одну или несколько аминокислотных замен, которые увеличивают период полувыведения и/или улучшение связывания с неонатальным рецептором Fc (FcRn). Антитела с повышенным периодом полувыведения и улучшенным связыванием с FcRn описаны в US 2005/0014934 A1 (Hinton et al.) или WO 2015107026. Эти антитела содержат Fc-область с одной или несколькими заменами, которые улучшают связывание Fc-области с FcRn. Такие варианты Fc включают те, которые имеют замены в одном или нескольких остатках области Fc: 238, 256, 265, 272, 286, 303, 305, 307, 311, 312,

317, 340, 356, 360, 362, 376, 378, 380, 382, 413, 424 или 434 в соответствии с нумерацией EU, например, замена остатка 434 в Fc-области (пат. США 7371826).

В некоторых воплощениях Fc-область вариантного слитого белка ICOSL-Fc включает одну или более аминокислотную замену E356D и M358L. В некоторых воплощениях Fc-область вариантного слитого белка ICOSL-Fc включает одну или несколько аминокислотных замен C220S, C226S, C229S. В некоторых воплощениях Fc-область вариантного слитого белка ICOSL включает одну или несколько аминокислотных замен R292C и V302C. См. также Duncan & Winter, *Nature* 322: 738-40 (1988); пат. США № 5648260; пат. США № 5624821; и WO 94/29351 относительно других примеров вариантов области Fc.

В некоторых воплощениях, изменения введены в Fc-области, которые приводят к уменьшению связывания с C1q и/или снижению комплемент-зависимой цитотоксичности (CDC), например, как описано в патенте США № 6195551, WO 99/51642 и Idusogie et al., *J. Immunol.* 164: 4178-4184 (2000).

В некоторых воплощениях изобретения, предлагается вариант слитого белка ICOSL-Fc, включающий вариант Fc-области, содержащий одну или несколько аминокислотных модификаций, где вариант Fc-области является производным IgG1, такого как IgG1 человека. В некоторых воплощениях вариантная Fc-область получена из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 226. В некоторых воплощениях Fc включает, по меньшей мере, одну аминокислотную замену, которая представляет собой N82G по нумерации SEQ ID NO: 226 (что соответствует N297G в соответствии с нумерацией EU). В некоторых воплощениях Fc дополнительно включает, по меньшей мере, одну аминокислотную замену, которая представляет собой R77C или V87C по нумерации SEQ ID NO: 226 (соответствующих R292C или V302C в соответствии с нумерацией EU). В некоторых воплощениях вариант Fc-области дополнительно включает модификацию аминокислоты C5S по нумерации SEQ ID NO: 226 (что соответствует C220S в соответствии с нумерацией EU). Например, в некоторых воплощениях вариант Fc-области включает следующие аминокислотные модификации: N82G и одну или несколько из следующих аминокислотных модификаций C5S, R77C или V87C относительно SEQ ID NO: 226.

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

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

В некоторых воплощениях Fc включает аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 505 или аминокислотную последовательность, которая обладает по меньшей мере, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% или более идентичности последовательности с SEQ ID NO: 505. В некоторых воплощениях IgG4 Fc представляет собой стабилизированный Fc, в котором домен CH3 IgG4 человека замещен доменом CH3 IgG1 человека и который имеет ингибированное образование агрегатов, антитело, в котором домены CH3 и CH2 IgG4 человека замещены доменами CH3 и CH2 IgG1 человека, соответственно, или антитело, в котором аргинин в положении 409 согласно индексу ЕС, предложенному Kabat et al. для IgG4 человека, замещен лизином, и который проявляет ингибируемое образование агрегатов (см., например, пат. США № 8911726). В некоторых воплощениях Fc представляет собой IgG4, содержащий мутацию S228P, которая, как было показано, предотвращает рекомбинацию между терапевтическим антителом и эндогенным IgG4 путем обмена Fab-плечами (см., например, Labrijn et al. (2009) *Nat. Biotechnol.*, 27(8):767-71.) В некоторых воплощениях Fc включает аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 506, или аминокислотную последовательность, которая имеет, по меньшей мере, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% или более идентичности последовательности с SEQ ID NO: 506.

В некоторых воплощениях вариантный полипептид ICOSL непосредственно связана с последовательностью Fc. В некоторых воплощениях вариантный полипептид ICOSL косвенно связан с последовательностью Fc, например, через линкер. В некоторых воплощениях один или несколько "пептидных линкеров" связывают вариантный полипептид ICOSL и домен Fc. В некоторых воплощениях пептидный линкер может быть одним аминокислотным остатком или может быть более длинным. В некоторых воплощениях пептидный линкер имеет, по меньшей мере, один аминокислотный остаток, но не более 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 аминокислотного остатка. В некоторых воплощениях линкер представляет собой (в однобуквенном аминокислотном коде): GGGGS ("4GS") или мультимеры 4GS-линкера, такие как повторы 2, 3, 4 или 5 4GS-линкеров.

В некоторых воплощениях вариантный слитый белок ICOSL-Fc представляет собой димер, образованный двумя вариантными полипептидами ICOSL-Fc, связанными с доменом Fc. В некоторых конкретных воплощениях идентичные или по существу идентичные виды (с учетом 3 или меньшего количества различий в аминокислотных последовательностях на N-конце или C-конце) вариантных слитых полипептидов ICOSL-Fc будут димеризоваться с созданием гомодимера. В некоторых воплощениях димер

является гомодимером, в котором два вариантных полипептида ICOSL-Fc являются одинаковыми. В ином случае, различные разновидности слитых полипептидов ICOSL-Fc можно димеризовать, чтобы получить гетеродимер. Таким образом, в некоторых воплощениях димер представляет собой гетеродимер, в котором два вариантных полипептида ICOSL-Fc различны.

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

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

В. Стековые молекулы с дополнительными доменами IgSF.

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

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

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

В некоторых воплощениях дополнительный домен IgSF является доменом IgSF с модифицированной или немодифицированной аффинностью содержащийся в представителе семейства IgSF, выбранном из семейства сигнал-регулирующего белка (SIRP), семейства белков, подобных иницирующему рецептору на миелоидных клетках (TREML), семейства молекул клеточной адгезии связанный с карциноэмбриональным антигеном (CEACAM), семейства Ig-подобного лектина, связывающего сиаловую кислоту (SIGLEC), семейства бутирофилина, семейства B7, семейства CD28, семейства белков, содержащих V-set и иммуноглобулиновый домен (VSIG), семейства V-set трансмембранного домена (VSTM), семейства главного комплекса гистосовместимости (MHC), семейства молекул активации лимфоцитарного сигналинга (SLAM), лейкоцитарного иммуноглобулиноподобного рецептора (LIR), семейства нектинов (Nec), семейства нектиноподобных белков (NECL), семейства белков, родственных рецептору полиовируса (PVR), семейства рецептора запуска естественной цитотоксичности (NCR), семейства Т-клеточного иммуноглобулина и муцина (TIM) или семейства иммуноглобулиноподобных рецепторов клеток-киллеров

(KIR). В некоторых воплощениях дополнительные домены IgSF независимо получены из белка IgSF, выбранного из группы, состоящей из CD80 (B7-1), CD86 (B7-2), CD274 (PD-L1, B7-H1), PDCD1LG2 (PD-L2, CD273), ICOSLG (B7RP1, CD275, ICOSL, B7-H2), CD276 (B7-H3), VTCN1 (B7-H4), CD28, CTLA4, PDCD1 (PD-1), ICOS, BTLA (CD272) CD4, CD8A (CD8-альфа), CD8B (CD8-бета), LAG3, HAVCR2 (TIM-3), CEACAM1, TIGIT, PVR (CD155), PVRL2 (CD112), CD226, CD2, CD160, CD200, CD200R1 (CD200R) и NC R3 (NKp30).

В первом столбце табл. 2 указано название и, необязательно, название некоторых возможных синонимов для данного конкретного представителя IgSF. Второй столбец включает идентификатор белка в базе данных UniProtKB, публичной базе данных, доступной через Интернет на uniprot.org или, в некоторых случаях, номер GenBank. Universal Protein Resource (UniProt) - это комплексный ресурс для белковых последовательностей и аннотирующих данных. Базы данных UniProt включают UniProt Knowledgebase (UniProtKB). UniProt представляет собой результат сотрудничества между Европейским институтом биоинформатики (EMBL-EBI), Швейцарским институтом биоинформатики SIB и Protein Information Resource (PIR) и поддерживается главным образом грантом Национальных институтов здоровья США (NIH). GenBank - это база данных генетических последовательностей NIH, аннотированная коллекция всех общедоступных последовательностей ДНК (Nucleic Acids Research, 2013 Jan; 41 (D1): D36-42). Третий столбец включает область, в которой расположен указанный домен IgSF. Область указана как диапазон, где домен расположен между остатками, определяющими диапазон. Столбец 3 также указывает класс домена IgSF для указанной области IgSF. Столбец 4 обеспечивает область, в которой расположены указанные дополнительные домены (сигнальный пептид, S, внеклеточный домен, E, трансмембранный домен, T; цитоплазматический домен, C). Понятно, что описание доменов может варьировать в зависимости от способов, используемых для идентификации или классификации домена, и может быть идентифицировано по-разному из разных источников. Описание остатков, соответствующих домену в табл. 2, представлено только для примера и может быть на несколько аминокислот (например, одну, две, три или четыре) длиннее или короче. Столбец 5 указывает для некоторых из перечисленных представителей IgSF, некоторые из их когнатных партнеров связывания клеточной поверхности.

Таблица 2

Представители IgSF согласно настоящему изобретению

Пред- стави- тель IgSF (Сино- нимы)	Белковый идентифи- фикатор UniProtKB	Область IgSF & Класс Домена	Другие домены	Когнатные партнеры связывания клеточной поверхности	Аминокислотная последовательность представителя IgSF (SEQ ID NO)		
					Прекурсор (зрелые остатки)	Зрелый	ECD
CD80 (B7-1)	NP_005182.1 P33681	35-135, 35-138 или 37-138 IgV, 145-230 или 154-232 IgC	S: 1-34, E: 35-242, T: 243-263, C: 264-288	CD28, CTLA4, PD-L1	SEQ ID NO: 1 (35-288)	SEQ ID NO: 253	SEQ ID NO: 28
CD86 (B7-2)	P42081.2	33-131 IgV, 150-225 IgC2	S: 1-23, E: 24-247, T: 248-268, C: 269-329	CD28, CTLA4	SEQ ID NO: 2 (24-329)	SEQ ID NO: 254	SEQ ID NO: 29
CD274 (PD-L1, B7-H1)	Q9NZQ7.1	24-130 IgV, 133-225 IgC2	S: 1-18, E: 19-238, T: 239-259, C: 260-290	PD-1, B7-1	SEQ ID NO: 3 (19-290)	SEQ ID NO: 255	SEQ ID NO: 30
PDCD1 LG2 (PD-L2, CD273)	Q9BQ51.2	21-118 IgV, 122-203 IgC2	S: 1-19, E: 20-220, T: 221-241, C: 242-273	PD-1, RGMb	SEQ ID NO: 4 (20-273)	SEQ ID NO: 256	SEQ ID NO: 31
ICOSLG (B7RP1, CD275, ICOSL, B7-H2)	O75144.2	19-129 IgV, 141-227 IgC2	S: 1-18, E: 19-256, T: 257-277, C: 278-302	ICOS, CD28, CTLA4	SEQ ID NO: 5 (19-302)	SEQ ID NO: 257	SEQ ID NO: 32
CD276 (B7-H3)	Q5ZPR3.1	29-139 IgV, 145-238 IgC2, 243-357 IgV, 367-453 IgC	S: 1-28, E: 29-466, T: 467-487, C: 488-534		SEQ ID NO: 6 (29-534)	SEQ ID NO: 258	SEQ ID NO: 33
VTCN1 (B7-H4)	Q7Z7D3.1	35-146 IgV, 153-241 IgV	S: 1-24, E: 25-259, T: 260-280, C: 281-282		SEQ ID NO: 7 (25-282)	SEQ ID NO: 259	SEQ ID NO: 34
CD28	P10747.1	28-137 IgV	S: 1-18, E: 19-	B7-1, B7-2, B7RP1	SEQ ID NO: 8	SEQ ID NO: 260	SEQ ID NO: 35

			152, T: 153-179, C: 180- 220		(19-220)		
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: 261	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: 262	SEQ ID NO: 37
ICOS	Q9Y6W8.1	30-132 IgV	S: 1-20, E: 21- 140, T: 141-161, C: 162- 199	B7RP1	SEQ ID NO: 11 (21-199)	SEQ ID NO: 263	SEQ ID NO: 38
BTLA (CD272)	Q7Z6A9.3	31-132 IgV	S: 1-30, E: 31- 157, T: 158-178, C: 179- 289	HVEM	SEQ ID NO: 12 (31-289)	SEQ ID NO: 264	SEQ ID NO: 39
CD4	P01730.1	26-125 IgV, 126-203 IgC2, 204- 317 IgC2, 317-389 IgC2	S: 1-25, E: 26- 396, T: 397-418, C: 419- 458	MHC класс II	SEQ ID NO: 13 (26-458)	SEQ ID NO: 265	SEQ ID NO: 40
CD8A (CD8- альфа)	P01732.1	22-135 IgV	S: 1-21, E: 22- 182, T: 183-203, C: 204- 235	MHC класс I	SEQ ID NO: 14 (22-235)	SEQ ID NO: 266	SEQ ID NO: 41
CD8B (CD8- бета)	P10966.1	22-132 IgV	S: 1-21, E: 22- 170, T: 171-191, C: 192-	MHC класс I	SEQ ID NO: 15 (22-210)	SEQ ID NO: 267	SEQ ID NO: 42

			210					
LAG3	P18627.5	37-167 IgV, 168-252 IgC2, 265-343 IgC2, 349-419 IgC2	S: 1-28, E: 29-450, T: 451-471, C: 472-525	МНС класс II	SEQ ID NO: 16 (29-525)	SEQ ID NO: 268	SEQ ID NO: 43	
HAVCR 2 (TIM-3)	Q8TDQ0.3	22-124 IgV	S: 1-21, E: 22-202, T: 203-223, C: 224-301	CEACAM-1, фосфатидил серин, Галектин-9, HMGB1	SEQ ID NO: 17 (22-301)	SEQ ID NO: 269	SEQ ID NO: 44	
CEACA M1	P13688.2	35-142 IgV, 145-232 IgC2, 237-317 IgC2, 323-413 IgC	S: 1-34, E: 35-428, T: 429-452, C: 453-526	TIM-3	SEQ ID NO: 18 (35-526)	SEQ ID NO: 270	SEQ ID NO: 45	
TIGIT	Q495A1.1	22-124 IgV	S: 1-21, E: 22-141, T: 142-162, C: 163-244	CD155, CD112	SEQ ID NO: 19 (22-244)	SEQ ID NO: 271	SEQ ID NO: 46	
PVR (CD155)	P15151.2	24-139 IgV, 145-237 IgC2, 244-328 IgC2	S: 1-20, E: 21-343, T: 344-367, C: 368-417	TIGIT, CD226, CD96, полиовирус	SEQ ID NO: 20 (21-417)	SEQ ID NO: 272	SEQ ID NO: 47	
PVRL2 (CD112)	Q92692.1	32-156 IgV, 162-256 IgC2, 261-345 IgC2	S: 1-31, E: 32-360, T: 361-381, C: 382-538	TIGIT, CD226, CD112R	SEQ ID NO: 21 (32-538)	SEQ ID NO: 273	SEQ ID NO: 48	
CD226	Q15762.2	19-126 IgC2, 135-239 IgC2	S: 1-18, E: 19-254, T: 255-275, C: 276-336	CD155, CD112	SEQ ID NO: 22 (19-336)	SEQ ID NO: 274	SEQ ID NO: 49	
CD2	P06729.2	25-128 IgV, 129-209 IgC2	S: 1-24, E: 25-209, T: 210-235, C: 236-351	CD58	SEQ ID NO: 23 (25-351)	SEQ ID NO: 275	SEQ ID NO: 50	
CD160	O95971.1	27-122 IgV	S: 1-26, E: 27-122	HVEM, семейство белков МНС	SEQ ID NO: 24 (27-159)	SEQ ID NO: 276	SEQ ID NO: 51	
CD200	P41217.4	31-141 IgV, 142-232 IgC2	S: 1-30, E: 31-232, T: 233-259, C: 260-278	CD200R	SEQ ID NO: 25 (31-278)	SEQ ID NO: 277	SEQ ID NO: 52	
CD200R 1 (CD200 R)	Q8TD46.2	53-139 IgV, 140-228 IgC2	S: 1-28, E: 29-243, T: 244-264, C: 265-325	CD200	SEQ ID NO: 26 (29-325)	SEQ ID NO: 278	SEQ ID NO: 53	
NCR3 (NKp30)	O14931.1	19-126 IgC-like	S: 1-18, E: 19-135, T: 136-156, C: 157-201	B7-H6	SEQ ID NO: 27 (19-201)	SEQ ID NO: 279	SEQ ID NO: 54	
VSIG8	Q5VU13	22-141 IgV 1 146-257 IgV 2	S: 1-21, E: 22-263, T: 264-284, C: 285-414	VISTA	SEQ ID NO: 341 (22-414)	SEQ ID NO: 342	SEQ ID NO: 343	

В некоторых воплощениях настоящего изобретения предусмотренные иммуномодулирующие белки, в дополнении к вариантному полипептиду ICOSL, также содержат, по меньшей мере, 2, 3, 4, 5 или 6 дополнительных доменов суперсемейства иммуноглобулинов (IgSF), такие как домен IgD из представителя семейства IgSF, указанного в табл. 2. В некоторых воплощениях предоставленные иммуномодулирующие белки содержат, по меньшей мере, один дополнительный домен IgSF (например, второй домен IgSF), в котором, по меньшей мере, один дополнительный или второй домен IgSF представляет собой домен IgSF, указанный в домене IgSF дикого типа или немодифицированного или специфического связывающего фрагмента, содержащегося в аминокислотной последовательности, указанной в любой из SEQ ID NO: 1-27 и 341. В некоторых воплощениях домен IgSF дикого типа или немодифицированного IgSF представляет собой домен IgV или домен IgC, такой как домен IgC1 или IgC2.

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

В некоторых воплощениях настоящего изобретения предлагаемый иммуномодулирующий белок содержит, по меньшей мере, один дополнительный или второй домен IgSF, который представляет собой vIgD, включающий одну или несколько аминокислотных замен по сравнению с доменом IgSF (например, IgV) дикого типа или немодифицированным доменом IgSF, отличным от ICOSL.

В некоторых воплощениях дополнительный или второй домен IgSF включает одну или несколько аминокислотных замен по сравнению с доменом IgSF дикого типа или немодифицированным доменом IgSF, таким как домен IgSF в представителе семейства IgSF, указанном в табл. 2. В некоторых воплощениях дополнительный или второй домен IgSF с модифицированной аффинностью имеет, по меньшей мере, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% или более идентичности последовательности с доменом IgSF дикого типа или немодифицированным IgSF или с его фрагментом специфического связывания, содержащемся в аминокислотной последовательности, указанной в любом из SEQ ID NO: 1-27. В некоторых воплощениях домен IgSF дикого типа или немодифицированного IgSF представляет собой домен IgV или домен IgC, такой как домен IgC1 или IgC2. В некоторых воплощениях дополнительный или второй домен IgSF представляет собой домен IgV или IgC с модифицированной аффинностью. В табл. 3-5 представлены примерные полипептиды, содержащие один или несколько доменов с модифицированным аффинностью IgSF, которые могут быть использованы в стековых конструкциях, представленных в данном документе.

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

Таблица 3

Примерные варианты полипептиды CD80

Мутация(ии)	ECD SEQ ID NO	IgV SEQ ID NO
Дикий тип	28	152
L70Q/A91G	55	153
L70Q/A91G/T130A	56	
L70Q/A91G/I118A/T120S/T130A	57	
V4M/L70Q/A91G/T120S/T130A	58	154
L70Q/A91G/T120S/T130A	59	
V20L/L70Q/A91S/T120S/T130A	60	155
S44P/L70Q/A91G/T130A	61	156
L70Q/A91G/E117G/T120S/T130A	62	
A91G/T120S/T130A	63	157
L70R/A91G/T120S/T130A	64	158
L70Q/E81A/A91G/T120S/I127T/T130A	65	159
L70Q/Y87N/A91G/T130A	66	160
T28S/L70Q/A91G/E95K/T120S/T130A	67	161
N63S/L70Q/A91G/T120S/T130A	68	162
K36E/I67T/L70Q/A91G/T120S/T130A/N152T	69	163
E52G/L70Q/A91G/T120S/T130A	70	164
K37E/F59S/L70Q/A91G/T120S/T130A	71	165
A91G/S103P	72	
K89E/T130A	73	166
A91G	74	
D60V/A91G/T120S/T130A	75	167
K54M/A91G/T120S	76	168
M38T/L70Q/E77G/A91G/T120S/T130A/N152T	77	169
R29H/E52G/L70R/E88G/A91G/T130A	78	170
Y31H/T41G/L70Q/A91G/T120S/T130A	79	171
V68A/T110A	80	172
S66H/D90G/T110A/F116L	81	173
R29H/E52G/T120S/T130A	82	174
A91G/L102S	83	
I67T/L70Q/A91G/T120S	84	175
L70Q/A91G/T110A/T120S/T130A	85	
M38V/T41D/M43I/W50G/D76G/V83A/K89E/T120S/T130A	86	176
V22A/L70Q/S121P	87	177
A12V/S15F/Y31H/T41G/T130A/P137L/N152T	88	178
I67F/L70R/E88G/A91G/T120S/T130A	89	179
E24G/L25P/L70Q/T120S	90	180
A91G/F92L/F108L/T120S	91	181
R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/E81V/L85R/K89N/ A91T/F92P/K93V/R94L/I118T/N149S	92	182
R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/E81V/L85R/K89N/ A91T/F92P/K93V/R94L/N144S/N149S	93	
R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M42T/M43R/M47T/E81V/L85R/ K89N/A91T/F92P/K93V/R94L/L148S/N149S	94	183
E24G/R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/F59L/E81V/ L85R/K89N/A91T/F92P/K93V/R94L/H96R/N149S/C182S	95	184
R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/E81V/L85R/K89N/ A91T/F92P/K93V/R94L/N149S	96	
R29V/M43Q/E81R/L85I/K89R/D90L/A91E/F92N/K93Q/R94G	97	185
T41I/A91G	98	186
K89R/D90K/A91G/F92Y/K93R/N122S/N177S	99	187
K89R/D90K/A91G/F92Y/K93R	100	
K36G/K37Q/M38I/F59L/E81V/L85R/K89N/A91T/F92P/K93V/R94L/E 99G/T130A/N149S	101	188
E88D/K89R/D90K/A91G/F92Y/K93R	102	189, 543
K36G/K37Q/M38I/L40M	103	190
K36G	104	191
R29H/Y31H/T41G/Y87N/E88G/K89E/D90N/A91G/P109S	105	192
A12T/H18L/M43V/F59L/E77K/P109S/I118T	106	193
R29V/Y31F/K36G/M38L/M43Q/E81R/V83I/L85I/K89R/D90L/A91E/F 92N/K93Q/R94G	107	194
V68M/L70P/L72P/K86E	108	195

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

Таблица 4

Примерные варианты полипептиды NKp30

Мутация(ии)	ECD SEQ ID NO	IgC-подобный домен SEQ ID NO
Дикий тип	54	214
L30V/A60V/S64P/S86G	143	215
L30V	144	216
A60V	145	217
S64P	146	218
S86G	147	219

Таблица 5

Примерные варианты полипептиды CD86

Мутация(ии)	ECD SEQ ID NO	IgV SEQ ID NO
Дикий тип	29	220
Q35H/H90L/Q102H	148	221
Q35H	149	222
H90L	150	223
Q102H	151	224

Количество таких доменов IgSF с немодифицированной или модифицированной аффинностью, присутствующих в "стековом" конструкторе иммуномодулирующего белка (будь то комбинации с диким типом или компоновки с недикиим типом) составляет, по меньшей мере, 2, 3, 4 или 5 и в некоторых воплощениях точно 2, 3, 4 или 5 доменов IgSF (при этом определение количества доменов IgSF с модифицированной аффинностью игнорирует любые их фракционные последовательности неспецифического связывания и/или по существу иммунологически неактивные фракционные последовательности).

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

рованной аффинностью: домен IgSF немодифицированной аффинностью), может составлять точно или не менее: 2: 0 (с модифицированной аффинностью: дикого типа), 0:2, 2:1, 1:2, 2:2, 2:3, 3:2, 2:4, 4:2, 1:1, 1:3, 3:1, 1:4, 4:1, 1:5 или 5:1.

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

В некоторых воплощениях стековый иммуномодулирующий белок, представленный в данном документе, включает, по меньшей мере, два домена IgSF с модифицированной и/или немодифицированной аффинностью из одного представителя IgSF, но в компоновке не дикого типа (в качестве варианта "пермутации"). Одним иллюстративным примером компоновки или пермутации не дикого типа является иммуномодуляторный белок, включающим порядок не дикого типа аффинности последовательностей домена IgSF с модифицированной и/или немодифицированной аффинностью относительно тех, которые обнаруживаются в ICOSL дикого типа, чьи последовательности домена IgSF служили источником вариантных доменов IgSF, представленных в настоящем документе. Таким образом, в одном примере иммуномодулирующий белок может содержать проксимальный IgV и IgC, дистальный к трансмембранному домену, хотя и в форме с немодифицированной аффинностью и/или модифицированной аффинностью. Присутствие в иммуномодулирующем белке, представленном в данном документе, как комбинаций не дикого типа, так и компоновок недикого типа доменов IgSF с немодифицированной и/или модифицированной аффинностью также входит в объем предоставленного объекта изобретения.

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

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

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

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

В некоторых воплощениях один или более "пептидных линкеров" связывают vIgD из ICOSL и дополнительный домен IgSF (например, второй вариантный домен IgSF). В некоторых воплощениях пептидный линкер может быть одним аминокислотным остатком или иметь большую длину. В некоторых воплощениях пептидный линкер имеет, по меньшей мере, один аминокислотный остаток, но не более 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 аминокислотного остатка. В некоторых воплощениях линкер представляет собой (однобуквенным аминокислотным кодом): GGGGS ("4GS") или мультимеры 4GS-линкера, такие как повторы 2, 3, 4 или 5 4GS-линкеров. В некоторых воплощениях пептидный линкер представляет собой (GGGGS)₂ или (GGGGS)₃. В некоторых воплощениях линкер также может включать ряд остатков аланина отдельно или в дополнение к другому пептидному линкеру (такому как линкер 4GS или его мультимер). В некоторых воплощениях количество аланиновых остатков в

каждой серии составляет: 2, 3, 4, 5 или 6 аланинов.

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

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

В некоторых воплощениях иммуномодулирующие белки II типа дополнительно включает первый трейлерный пептидный линкер дикого типа, вставленный на С-конце первого домена IgSF с модифицированной и/или немодифицированной аффинностью, в котором первый трейлерный пептидный линкер дикого типа включает, по меньшей мере, 5 (например, по меньшей мере, около любое количество из 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 или более) последовательных аминокислот из промежуточной последовательности в белке дикого типа, из которого получают первый домен IgSF с модифицированной и/или немодифицированной аффинностью между родительским доменом IgSF и непосредственно следующим доменом (таким как домен IgSF или трансмембранный домен). В некоторых воплощениях первый трейлерный пептидный линкер дикого типа включает всю промежуточную последовательность в белке дикого типа, из которой происходит первый домен IgSF с модифицированной и/или немодифицированной аффинностью между родительским доменом IgSF и непосредственно следующим доменом (например, доменом IgSF или трансмембранным доменом).

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

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

тельским доменом IgSF и непосредственно следующим доменом (например, доменом IgSF или транс-мембранным доменом).

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

В некоторых воплощениях два или более домена IgSF, в том числе vIgD из ICOSL и один или более дополнительный домен IgSF (например, второй вариантный домен IgSF) из другого представителя семейства IgSF, связаны или присоединены к Fc с образованием димерного многодоменного иммуномодулирующего белка. В некоторых воплощениях вариантный полипептид ICOSL и второй домен IgSF независимо связаны, прямо или косвенно, с N- или C-концом субъединицы Fc. В некоторых воплощениях вариантный полипептид ICOSL и второй домен IgSF связаны прямо или косвенно, и один из вариантных ICOSL или второй домен IgSF также прямо или косвенно связаны с N- или C-концом субъединицы Fc. В некоторых воплощениях связь с Fc осуществляется через пептидный линкер, например, пептидный линкер, такой как описано выше. В некоторых воплощениях связь между вариантным ICOSL и вторым доменом IgSF осуществляется через пептидный линкер, например, пептидный линкер, такой как описанный выше. В некоторых воплощениях vIgD ICOSL, один или несколько дополнительных доменов IgSF и домен Fc могут быть связаны между собой в любой из многочисленных конфигураций, как показано на фиг. 16. Примерные конфигурации описаны в примерах.

В некоторых воплощениях изобретения стековый иммуномодулирующий белок представляет собой димер, образованный двумя стековыми иммуномодулирующими слитыми с Fc полипептидами. Также предлагаются молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие любой из стековых иммуномодулирующих белков. В некоторых воплощениях димерный многодоменный стековый иммуномодулирующий белок может быть получен в клетках путем экспрессии или, в некоторых случаях, совместной экспрессии иммуномодулирующих слитых с Fc полипептидов, таких как описанные выше, соответственно с образованием димерных слитых с Fc белков.

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

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

В некоторых воплощениях многодоменная стековая молекула является гетеродимерной, включающей два разных полипептида Fc, где, по меньшей мере, один представляет собой полипептид Fc, содержащий, по меньшей мере, один вариантный полипептид ICOSL и/или, по меньшей мере, один второй домен IgSF (например, второй вариантный домен IgSF). В некоторых воплощениях многодоменная стековая молекула включает первый полипептид Fc, содержащий вариантный ICOSL и второй домен IgSF, и второй полипептид Fc, содержащий вариантный ICOSL и второй домен IgSF. В некоторых воплощениях многодоменная стековая молекула включает первый полипептид Fc, содержащий вариантный полипептид ICOSL и второй домен IgSF, и второй полипептид Fc, который не связан ни с вариантным полипептидом ICOSL, ни со вторым доменом IgSF.

В некоторых воплощениях многодоменная стековая молекула включает первый полипептид Fc, содержащий 1, 2, 3, 4 или больше вариантных полипептидов ICOSL и/или 1, 2, 3, 4 или больше вторых доменов IgSF, в котором общее количество доменов IgSF в первом стековом полипептиде Fc больше, чем 2, 3, 4, 5, 6 или более. В одном примере такого воплощения второй стековый полипептид Fc включает 1, 2, 3, 4 или более вариантных полипептидов ICOSL и/или 1, 2, 3, 4 или более вторых доменов IgSF, где общее количество доменов IgSF во втором стековом полипептиде Fc больше 2, 3, 4, 5, 6 или более. В другом примере такого воплощения второй полипептид Fc не связан ни с вариантным полипептидом ICOSL, ни со вторым доменом IgSF.

В некоторых воплощениях гетеродимерная стековая молекула включает первый стековый иммуномодулирующий слитый с Fc полипептид и второй стековый иммуномодулирующий слитый с Fc полипептид, в котором первый и второй полипептиды различны. В некоторых воплощениях стековая гетеродимерная молекула включает первую субъединицу Fc, содержащую первый вариантный полипептид ICOSL и/или второй домен IgSF (например, второй вариантный домен IgSF) и вторую субъединицу Fc, содержащую отличный от первого вариантный полипептид ICOSL или второй домен IgSF. В некоторых воплощениях гетеродимерная стековая молекула включает первый стековый иммуномодулирующий

слитый с Fc полипептид и второй стековый иммуномодулирующий слитый с Fc полипептид, в котором первый и второй полипептиды различны. В некоторых воплощениях гетеродимерная стековая молекула включает первую субъединицу Fc, содержащую первый вариантный полипептид ICOSL и/или второй домен IgSF (например, второй вариантный домен IgSF), и вторую субъединицу Fc, содержащую как первый вариантный полипептид ICOSL, так и второй домен IgSF (например, второй вариантный домен IgSF), но в ориентации или конфигурации отличной от первой субъединицы Fc.

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

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

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

Интерфейс CH3 IgG1 человека, например, включает шестнадцать остатков в каждом домене, расположенном на четырех антипараллельных β -цепях, которые создают углубление 1090 Å² с каждой поверхности (см., например, Deisenhofer et al. (1981) *Biochemistry*, 20:2361-2370; Miller et al., (1990) *J Mol. Biol.* 216, 965-973; Ridgway et al., (1996) *Prot. Engin.*, 9: 617-621; U.S. Pat. No. 5,731,168). Модификации домена CH3 для создания выступов или полостей описаны, например, в патенте США № 5731168; международных патентных заявках WO 98/50431 и WO 2005/063816; и Ridgway et al., (1996) *Prot. Engin.*, 9: 617-621. В некоторых примерах модификации домена CH3 для создания выступов или полостей обычно ориентированы на остатки, расположенные на двух центральных антипараллельных β -цепях. Цель состоит в том, чтобы свести к минимуму риск того, чтобы создающиеся выступы, могли быть размещены путем выпячивания в окружающий растворитель, и не размещены в компенсаторную полость в домене партнера CH3.

В некоторых воплощениях гетеродимерная молекула включает мутацию T366W в домене CH3 из "цепи с выступом" цепи и мутации T366S, L368A, Y407V в домене CH3 "цепи с полостью". В некоторых случаях также может быть использован дополнительный межцепочечный дисульфидный мостик между доменами CH3 (Merchant, AM, et al., *Nature Biotech.* 16 (1998) 677-681), например, путем введения мутации Y349C в домен CH3 цепи "выступа" или "отверстия" и мутаций E356C или мутаций S354C в домен CH3 другой цепи. В некоторых воплощениях гетеродимерная молекула включает мутации S354C, T366W в одной из двух доменов CH3 и мутации Y349C, T366S, L368A, Y407V в другом из двух доменов CH3. В некоторых воплощениях гетеродимерная молекула включает мутации E356C, T366W в одной из двух доменов CH3 и мутации Y349C, T366S, L368A, Y407V в другом из двух доменов CH3. В некоторых воплощениях гетеродимерная молекула включает мутации Y349C, T366W в одном из двух доменов CH3

и мутации E356C, T366S, L368A, Y407V в другом из двух доменов CH3. В некоторых воплощениях гетеродимерная молекула включает мутации Y349C, T366W в одной из двух доменов CH3 и мутации S354C, T366S, L368A, Y407V в другом из двух доменов CH3. Примеры других технологий "выступ-во-впадину" известны в данной области техники, например, как описано в EP 1 870 459 A1.

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

В некоторых воплощениях вариантный Fc, содержащий модификации выступа/полости в CH3, может быть присоединен к стековому иммуномодулирующему полипептиду в любом месте, но обычно через его N- или C-конец, к N- или C-концу первого и/или второго стекового иммуномодулирующего полипептида, например, для образования слитого полипептида. Связь может быть прямой или косвенной с помощью линкера. Как правило, молекула с выступом и отверстием генерируется путем совместной экспрессии первого стекового иммуномодулирующего полипептида, связанного с вариантным Fc, содержащим модификацию(ии) выступ на CH3, со вторым стековым иммуномодулирующим полипептидом, связанным с вариантом Fc, содержащим модификацию(ии) полости на CH3.

C. Конъюгаты и слитые белки вариантных полипептидов и иммуномодулирующих белков.

В некоторых воплощениях настоящего изобретения варианты полипептиды, представленные в данном документе, которые представляют собой иммуномодулирующие белки, содержащие варианты домена Ig семейства IgSF (vIgD), могут быть конъюгированы с или слиты с фрагментом, таким как эффекторный фрагмент, такой как другой белок, прямо или косвенно, с образованием конъюгата ("конъюгат IgSF"). В некоторых воплощениях соединение может быть ковалентным или нековалентным, например, посредством нековалентного взаимодействия биотина-стрептавидина. В некоторых воплощениях вариантного слитого белка ICOSL-Fc любая комбинация любых двух или более вышеуказанных конъюгатов может быть присоединена к Fc или вариантному полипептиду CD80 или к обоим.

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

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

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

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

В некоторых воплощениях предлагается конъюгат IgSF, содержащий вариантный полипептид или иммуномодулирующий белок, обеспеченный в данном документе, конъюгированный с направляющим агентом, который связывается с молекулой клеточной поверхности, например, для направленной доставки вариантного полипептида или иммуномодулирующего белка к специфической клетке. В некоторых воплощениях нацеливающий агент представляет собой молекулу(ы), которая обладает способностью локализоваться и связываться с молекулой, присутствующей в нормальной клетке/ткани и/или опухоли.

вой клетке/опухоли у объекта. Другими словами, конъюгаты IgSF, содержащие нацеливающий агент, могут связываться с лигандом (прямо или косвенно), который присутствует в клетке, такой как опухолевая клетка. Нацеливающие агенты по изобретению включают антитела, полипептиды, пептиды, аптамеры, другие лиганды или любую их комбинацию, которые могут связывать компонент клетки-мишени или молекулы.

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

В различных аспектах настоящего изобретения, раскрытый в настоящем описании конъюгат IgSF по настоящему изобретению включает нацеливающий агент, который может связывать/нацеливать на клеточный компонент, такой как опухолевый антиген, бактериальный антиген, вирусный антиген, антиген микоплазмы, антиген гриба, прионный антиген, антиген из паразита. В некоторых аспектах клеточный компонент, антиген или молекула могут быть использованы для обозначения искомой мишени для нацеливающего агента. Например, в различных воплощениях нацеливающий агент специфичен для или связывается с компонентом, который включает, без ограничения указанным, рецептор эпидермального фактора роста (EGFR, ErbB-1, HER1), ErbB-2 (HER2/neu), ErbB-3/HER3, ErbB-4/HER4, семейство лигандов EGFR; семейство инсулиноподобных рецепторов фактора роста (IGFR), IGF-связывающие белки (IGFBP), семейство лигандов IGFR; семейство рецепторов фактора роста тромбоцитов (PDGFR), семейство лигандов PDGFR; семейство рецепторов фактора роста фибробластов (FGFR), семейство лигандов FGFR, семейство рецепторов фактора роста эндотелиальных сосудов (VEGFR), семейство VEGF; семейство рецепторов HGF; семейство TRK-рецепторов; семейство рецепторов эфрина (EPH); семейство рецепторов AXL; семейство рецепторов лейкоцитарной тирозинкиназы (LTK); семейство рецепторов TIE, ангиопозитин 1,2; семейство рецепторов-сирот, подобных рецепторной тирозинкиназе (ROR), например ROR1; CD171 (L1CAM); B7-H6 (NCR3LG1); PD-L1, антиген гликозилирования опухолей, например sTn или Tn, такой как sTn Ag MUC1; LHR (LHCGR); фосфатидилсерин, семейство рецепторов доменного диска (DDR); семейство RET-рецепторов; семейство рецепторов KLG; семейство рецепторов RYK; семейство рецепторов MuSK; рецепторы трансформирующего фактора роста- α (TGF- α), TGF- β ; рецепторы цитокинов, рецепторы класса I (семейство гематопозитина) и семейства II (интерферон/IL-10), суперсемейство рецепторов некроза опухолей (TNF) (TNFRSF), семейство рецепторов смерти; антигены рака яичка (CT), специфические для линии антигены, дифференцирующие антигены, альфа-актинин-4, ARTC1, область кластеров точки останова-продукты слияния Абелсона (Bcr-abl), B-RAF, каспаза-5 (CASP-5) каспаза-8 (CASP-8), β -катенин (CTNNB1), цикл клеточного деления 27 (CDC27), циклинзависимая киназа 4 (CDK4), CDKN2A, COA-I, слитый белок dek-can, EFTUD-2, фактор элонгации 2 (ELF2), слитый белок, содержащий вариантный ген Ets 6/острый миелоидный лейкоз 1 ген ETS (ETC6-AML1), фибронектин (FN), например экстрадомен A (EDA) фибронектина, GPNMB, слитый белок, включающий липидный рецептор низкой плотности/GDP-L фукоза: слитый белок β -D галактоза 2- α -L фукозилтрансферазу (LDLR/FUT), HLA-A2, замена аргинина изолейцин в остатке 170 α -спирали α 2-домена в гене HLA-A2 (HLA-A * 201-R170I), HLA-A1 1, мутированный белок теплового шока 70-2 (HSP70-2M), K1AA0205, MART2, убиквитинный для меланомы, мутированный 1, 2, 3 (MUM-I, 2, 3), простатическая кислая фосфатаза (PAP), нео-PAP, миозин класса I, NFYC, OGT, OS-9, слитый белок pml-RARальфа, PRDX5, PTPRK, K-ras (KRAS2), N-ras (NRAS), HRAS, RBAF600, SIRT2, SNRPD1, SYT-SSX1 или -SSX2, триозофосфатизомераза, BAGE, BAGK-1, BAGE-2,3, 4,5, GAGE-1,2,3,4,5,6,7,8, GnT-V (аберрантная N-ацетилглюкозилтрансфераза V, MGAT5), HERV-K-MEL, KK-LC, KM-H-1, LAGE, LAGE-I, CTL-распознаваемый антиген при меланоме (CAMEL), MAGE-A1 (MAGE-I), MAGE-A2, MAGE-A3, MAGE-A4, MAGE-A5, MAGE-A6, MAGE-A8, MAGE-A9, MAGE-A10, MAGE-A11, MAGE-A12, MAGE-3, MAGE-B1, MAGE-B2, MAGE-B5, MAGE-B6, MAGE-C1, MAGE-C2, муцин 1 (MUC1), MART-1/мелан-A (MLANA), gp100, gp100/Pmel17 (SILV), тирозиназа (TYR), TRP-I, HAGE, NA-88, NY-ESO-I, NY-ESO-1/LAGE-2, SAGE, Spl7, SS X-1,2,3,4, TRP2-INT2, карцино-эмбриональный антиген (CEA), калликреин 4, маммаглобин-A, OA1, антиген предстательной железы (PSA), TRP-1/gp75, TRP-2, адипофилин, индуцируемый интерфероном белок в меланоме 2 (AIM-2), BING-4, CPSF, циклин D1, молекула адгезии эпителиальных клеток (Ep-CAM), EphA3, фактор роста фибробластов-5 (FGF-5), гликопротеин 250 (gp250),

EGFR (ERBB1), HER-2/neu (ERBB2), цепь $\alpha 2$ рецептора интерлейкина-13 (IL13R $\alpha 2$), рецептор IL-6, кишечная карбоксиэстераза (iCE), альфа-фетобетон (AFP), M-CSF, mdm-2, MUC1, p53 (TP53), PBF, PRAME, PSMA, RAGE-I, RNF43, RU2AS, SOX10, STEAP1, сурвивин (BIRC5), обратную транскриптазу теломеразы человека (hTERT), теломеразу, ген опухоли Вильмса (WT1) SYCP1, BRDT, SPANX, XAGE, ADAM2, PAGE-5, LIPI, CTAGE-I, CSAGE, MMA1, CAGE, BORIS, HOM-TES-85, AF15q14, HCA661, LDHC, MORC, SGY-I, SPO1 1, TPX1, NY-SAR-35, FTHL17, NXF2, TDRD1, TEX15, FATE, TPTE, идиотипы иммуноглобулина, белок Bence-Jones, рецепторы эстрогенов (ER), андрогенные рецепторы (AR), CD40, CD30, CD20, CD19, CD33, опухолевый антиген 72-4 (CA 72-4), опухолевый антиген 15-3 (CA 15-3), опухолевый антиген 27-29 (CA 27-29), опухолевый антиген 125 (CA 125), опухолевый антиген 19-9 (CA 19-9), хорионический гонадотропин β -человека, β -2 микроглобулин, антиген плоскоклеточной карциномы, нейроспецифическую энолазу, белок теплового шока gp96, GM2, сарграмостим, CTLA-4, 707 аланин-пролин (707-AP), антиген аденокарциномы, распознаваемый Т-клетками 4 (APT-4), карциноэмбриональный антигенный пептид 1 (CAP-1), кальций-активированный хлоридный канал-2 (CLCA2), циклофилин В (Сур-В), перстневидноклеточная опухоль человека-2 (HST-2), белки вируса папилломы человека (HPV) (HPV-E6, HPV-E7, основные или малые капсидные антигены, другие), белки вируса Эпштейна-Барр (EBV) (латентные мембранные белки EBV-LMP1, LMP2; другие), белки вируса гепатита В или С и белки HIV.

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

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

В некоторых воплощениях нацеливающий агент представляет собой иммуноглобулин. Используемый в данном документе термин "иммуноглобулин" включает природные или искусственные моно- или поливалентные антитела, включая, без ограничения указанным, поликлональные, моноклональные, мультиспецифические, человеческие, гуманизированные или химерные антитела, одноцепочечные антитела, Fab-фрагменты, F(ab')-фрагменты, фрагменты, полученные библиотекой экспрессии Fab, одноцепочечные Fv (scFv); анти-идиотипические (анти-Id) антитела (включая, например, антитела против Id к антителам по изобретению) и эпитоп-связывающие фрагменты любого из вышеуказанных. Термин "антитело", используемый в данном описании, относится к молекулам иммуноглобулинов и иммунологически активным частям молекул иммуноглобулина, то есть к молекулам, которые содержат сайт связывания антигена, который специфически связывается с антигеном. Молекулы иммуноглобулина по изобретению могут быть любого типа (например, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA и IgY), класса (например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и IgA2) или подкласса молекулы иммуноглобулина.

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

гированных эффекторных фрагментов в опухолевую мишень, например, посредством рецептор-опосредованного эндоцитоза конъюгата IgSF; или такие конъюгаты могут рекрутировать, связывать и/или активировать иммунные клетки (например, NK-клетки, моноциты/макрофаги, дендритные клетки, Т-клетки, В-клетки).

В некоторых воплощениях конъюгат IgSF, через его антителный нацеливающий фрагмент, будет связывать клеточный компонент опухолевой клетки, опухолевой сосудистой системы или опухолевого микроокружения, тем самым модулируя иммунный ответ (например, путем активации костимулирующих молекул или ингибирования молекул отрицательной регуляции активации иммунных клеток). В некоторых воплощениях такие конъюгаты могут распознавать, связывать и/или модулировать (например, ингибировать или активировать) иммунные клетки (например, NK-клетки, моноциты/макрофаги, дендритные клетки, Т-клетки, В-клетки).

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

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

Примеры антител, которые могут быть включены в конъюгаты IgSF включают, без ограничения указанным, антитела, такие как цетуксимаб (IMC-C225; Erbitux®), трастузумаб (Herceptin®), ритуксимаб (Rituxan®; MabThera®), бевацизумаб (Avastin®), алемтузумаб (Campath®, Campath-1H®, Mabcampath®), панитумумаб (ABX-EGF, Vectibix®), ранибизумаб (Lucentis®), ибритумомаб, ибритумомаб труксетан, (Zevalin®), тоситумомаб, йод I131 тоситумомаб (BEXXAR®), катумаксомаб (Removab®), гемтузумаб, гемтузумаб озогамидин (Mylotarg®), абатацепт (CTLA4-Ig, Orencia®), белатацепт (L104EA29YIg, LEA29Y, LEA), ипилимумаб (MDX-010, MDX-101), тремелимумаб (тицилимумаб, CP-675,206), PRS-010, PRS-050, афлиберцепт (VEGF Trap, AVE005), волоциксимаб (M200), F200, MORAb-009, SS1P (CAT-5001), циксутумумаб (IMC-A12), матузумаб (EMD72000), нимотузумаб (h-R3), залутумумаб (HuMax-EGFR), нецитумумаб IMC-11F8, mAb806/ch806, Sym004, mAb-425, панорекс @ (17-1A) (мышинное моноклональное антитело); панорекс @ (17-1A) (химерное мышинное моноклональное антитело); IDEC-Y2B8 (мышинное, анти-CD20 моноклональное антитело); BEC2 (анти-идиотипическое моноклональное антитело, имитирующий эпитоп GD) (с BCG); онколим (моноклональное антитело Lym-1); SMART MI95 Ab, гуманизированный 13 I LYM-I (Oncolym), оварекс (B43.13, анти-идиотипическое мышинное моноклональное антитело); MDX-210 (гуманизированное биспецифическое антитело против HER-2); моноклональное антитело 3622W94 MAb, которое связывается с антигенами панкарциномы EGP40 (17-1A) на аденокарциномах; Анти-VEGF, зенапакс (SMART Anti-Tac (рецептор IL-2), SMART MI95 Ab, гуманизированное Ab, гуманизированное); MDX-210 (гуманизированное биспецифическое антитело против HER-2); MDX-447 (гуманизированное биспецифическое антитело против рецептора EGF); NovoMAb-G2 (специфичное для панкрециномы антитело); TNT (химерное моноклональное антитело-гистоновые антигены); TNT (химерное моноклональное антитело-гистоновые антигены); Gliomab-H (моноклональные-гуманизированные антитела); GNI-250 Mab; EMD-72000 (антагонист химерного EGF); LymphoCide (гуманизированное антитело LL2); и MDX-260, предназначенные для GD-2, ANA Ab, SMART IDIO Ab, SMART ABL 364 Ab или ImmuRAIT-CEA. Как проиллюстрировано вышеизложенным перечнем, принято получать антитела к определенному целевому эпитопу.

В некоторых воплощениях изобретения антителный нацеливающий фрагмент представляет собой полноразмерное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащий домен Fc. В некоторых

воплощениях вариантный полипептид или иммуномодулирующий белок конъюгируют с Fc-частью антительного нацеливающего фрагмента, например, конъюгацией с N-концом Fc-части антитела.

В некоторых воплощениях vIgD связана, прямо или косвенно, с N- или C-концом легкой и/или тяжелой цепи антитела. В некоторых воплощениях связь может осуществляться через пептидный линкер, такой как любой описанный выше. Могут быть построены различные конфигурации. На фиг. 10A-10C изображены примерные конфигурации. В некоторых воплощениях конъюгат антитела может быть получен путем совместной экспрессии тяжелой и легкой цепи антитела в клетке.

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

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

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

В одном воплощении нацеливающий агент представляет собой Vvβ3. Интегрин Vvβ3 экспрессируется на множестве клеток и, как было показано, опосредует несколько биологически важных процессов, включая адгезию остеокластов к костному матриксу, миграцию клеток гладких мышц сосудов и ангиогенез. Подходящие целевые молекулы для интегринов включают RGD-пептиды или пептидомиметики, а также не-RGD-пептиды или пептидомиметики (см., например, пат. США № 5767771 и 5780426) для других интегринов, таких как V4.β1 (VLA-4), V4-P7 (см., например, пат. США 6365619, Chang et al., *Bioorganic & Medicinal Chem Lett*, 12: 159-163 (2002), Lin et al., *Bioorganic & Medicinal Chem Lett*, 12: 133-136 (2002)), и тому подобное.

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

В некоторых воплощениях, предлагается конъюгат IgSF, содержащий вариантный полипептид или иммуномодулирующий белок, предлагаемый в данном документе, конъюгированный с токсином. В некоторых воплощениях токсин включает, например, бактериальные токсины, такие как дифтерийный токсин, растительные токсины, такие как рицин, низкомолекулярные токсины, такие как гелданамицин (Mandler et al., *J. Nat. Cancer Inst.*, 92 (19): 1573- 1581 (2000), Mandler et al., *Bioorganic & Med. Chem. Letters* 10: 1025-1028 (2000), Mandler et al., *Bioconjugate Chem.*, 13: 786-791 (2002)), майтанзиноиды (EP 1391213, Liu et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 8618-8623 (1996)) и калихеамицин (Lode et al., *Cancer Res.*, 58: 2928

(1998), Hinman et al., *Cancer Res.*, 53: 3336-3342 (1993)). Токсины могут оказывать свои цитотоксические и цитостатические эффекты с помощью механизмов, включая связывание тубулина, связывание ДНК или ингибирование топоизомеразы.

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

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

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

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

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

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

Конъюгат IgSF также может быть получен с использованием методик рекомбинантной ДНК. В этом случае последовательность ДНК, кодирующая варианты полипептиды или иммуномодулирующие белки, слита с последовательностью ДНК, кодирующей эффекторную часть, в результате чего образуется

молекула гибридной ДНК. Гибридную последовательность ДНК трансфицируют в клетку-хозяин, которая экспрессирует слитый белок. Слитый белок может быть выделен из культуры клеток и очищен с использованием методов, известных в данной области.

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

Радиоактивные или другие метки могут быть включены в конъюгат известными способами. Например, пептид может быть биосинтезирован или может быть синтезирован химическим аминокислотным синтезом с использованием подходящих предшественников аминокислот, включающих, например, фтор-19 вместо водорода. Метки, такие как ^{123}I , ^{186}Re , ^{188}Re и ^{111}In , могут быть присоединены через остаток цистеина в пептиде. Иттрий-90 может быть присоединен через остаток лизина. Способ IO-DOGEN (Fraker et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 80:49-57 (1978)) можно использовать для включения йода-123. "Monoclonal Antibodies in Immunoscintigraphy" (Chatal, CRC Press 1989) подробно описывает другие способы.

Конъюгаты вариантных полипептидов или иммуномодулирующих белков и цитотоксического агента могут быть получены с использованием различных бифункциональных связывающих белки агентов, таких как N-сукцинимидил-3-(2-пиридилдитио)пропионат (SPDP), сукцинимидил-4-(N-малеимидометил) циклогексан-1-карбоксилат (SMCC), иминотиолан (IT), бифункциональные производные имидозфиров (таких как диметиладипимидат HCl), активные сложные эфиры (такие как дисукцинимидил суберат), альдегиды (такие как глутаровый альдегид), бис-азидосоединения (такие как бис-(п-азидобензоил) гександиамин), производные бис-диазония (такие как бис-(п-диазонийбензоил) этилендиамин), диизоцианаты (такие как толуол-2,6-диизоцианат) и бис-активные соединения фтора (такие как 1,5-дифтор-2,4-динитробензол). Например, иммунотоксин ричин может быть получен, как описано в Vitti et al., *Science* 238: 1098 (1987). Углерод-14-меченная 1-изотиоцианатобензил-3-метилдиэтилен-таминпентауксусная кислота (MX-DTPA) представляет собой примерный хелатирующий агент для конъюгации радионуклеотида с антителом. См., например, WO 94/11026. Линкер может быть "расщепляемым линкером", облегчающим высвобождение цитотоксического лекарственного средства в клетке. Например, может быть использован кислотнo-лабильный линкер, линкер, чувствительный к пептидазе, фотолabileный линкер, диметилловый линкер или дисульфидсодержащий линкер (Chari et al., *Cancer Research* 52: 127-131 (1992), пат. США № 5202020).

Конъюгаты IgSF по настоящему изобретению явно рассматривают, без ограничения указанным, конъюгаты лекарственных средств, приготовленных с помощью перекрестно-связывающих реагентов: Bmps, EMCS, GMBs, HBVS, LC-SMCC, MBS, MPBH, SBAP, SIA, SIAB, SMCC, SMPB, SMPH, сульфo-EMCS, сульфo-GMBs, сульфo-KMUS, сульфo-MBS, сульфo-SIAB, сульфo-SMCC и сульфo-SMPB и SVSB (сукцинимидил-(4-винилсульфон)бензоат), которые являются коммерчески доступными (например, у Pierce Biotechnology, Inc., Рокфорд, Иллинойс, США). См. стр. 467-498, 2003-2004 Applications Handbook and Catalog.

D. Трансмембранные и секретируемые иммуномодулирующие белки и сконструированные клетки.

В данном документе предлагаются сконструированные клетки, которые экспрессируют иммуномодулирующие вариантные полипептиды ICOSL (в качестве варианта "сконструированные клетки"). В некоторых воплощениях экспрессируемый иммуномодулирующий вариантный полипептид ICOSL представляет собой трансмембранный белок и экспрессируется на поверхности. В некоторых воплощениях экспрессированный иммуномодулирующий вариантный полипептид ICOSL экспрессируется и секретируется из клетки.

1. Трансмембранные иммуномодулирующие белки.

В некоторых воплощениях иммуномодулирующий полипептид, содержащий вариантный ICOSL может быть мембраносвязанным белком. Как описано более подробно ниже, иммуномодулирующий полипептид может представлять собой трансмембранный иммуномодулирующий полипептид, содержащий вариантный ICOSL, в котором содержится: эктодомен, содержащий, по меньшей мере, один домен IgSF с модифицированной аффинностью (IgV или IgC), трансмембранный домен и, необязательно, цитоплазматический домен. В некоторых воплощениях трансмембранный иммуномодулирующий белок может быть экспрессирован на поверхности иммунной клетки, такой как клетка млекопитающего, в том числе на поверхности лимфоцита (например, Т-клетки или НК-клетки) или антигенпредставляющей клетки. В некоторых воплощениях трансмембранный иммуномодулирующий белок экспрессируется на поверхности Т-клетки млекопитающего, включая такие Т-клетки, как: Т-хелперная клетка, цитотоксическая Т-клетка (альтернативно цитотоксический Т-лимфоцит или ЦТЛ), Т-клетка натурального киллера, регуляторная Т-клетка, Т-клетка памяти или гамма-дельта Т-клетка. В некоторых воплощениях клетка млекопитающего представляет собой антигенпредставляющую клетку (APC). Обычно, но не исключительно,

эктодомен (в качестве варианта "внеклеточный домен") включает одну или несколько вариаций аминокислот (например, аминокислотных замен) варианта ICOSL по изобретению. Так, например, в некоторых воплощениях трансмембранный белок будет содержать эктодомен, который включает одну или несколько аминокислотных замен в вариантном ICOSL по изобретению.

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

В некоторых воплощениях может быть использован полноразмерный трансмембранный якорный домен, чтобы гарантировать, что TИР будут экспрессированы на поверхности сконструированной клетки, такой как сконструированная Т-клетка. Удобно, что этот домен может быть из конкретного нативного белка, который является модифицированным по аффинности (например, CD80 или ICOSL или другого нативного белка IgSF), и который просто сливается с последовательностью первого мембранного проксимального домена аналогично природному белку IgSF (например, CD80 или ICOSL). В некоторых воплощениях трансмембранный иммуномодулирующий белок включает трансмембранный домен соответствующего дикого типа или немодифицированного представителя IgSF, такого как трансмембранный домен, содержащийся в аминокислотной последовательности, указанные в SEQ ID NO: 5 (табл. 2). В некоторых воплощениях связанная с мембраной форма включает трансмембранный домен соответствующего полипептида дикого типа или немодифицированного полипептида, такого как соответствующие остатки 257-277 из SEQ ID NO: 5.

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

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

В некоторых воплощениях предлагаемый трансмембранный иммуномодулирующий белок, который является или включает вариантный ICOSL включающий аминокислотную последовательность, которая имеет, по меньшей мере, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% последовательности SEQ ID NO: 257 и включает эктодомен, содержащий, по меньшей мере, один аффинномодифицированный домен ICOSL IgSF, как описано, и трансмембранный домен. В некоторых воплощениях трансмембранный иммуномодулирующий белок включает любую одну или несколько аминокислотных замен в домене IgSF (например, домен IgV), как описано, включая любые, указанные в табл. 1. В некоторых воплощениях трансмембранный иммуномодулирующий белок может дополнительно содержать цитоплазматический домен, как описано. В некоторых воплощениях трансмембранный иммуномодулирующий белок может дополнительно включать сигнальный пептид. В некоторых воплощениях сигнальный пептид представляет собой нативный сигнальный пептид из представителя IgSF дикого типа, такой как содержащийся в аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 5 (см., например, табл. 2).

В некоторых воплощениях предлагаемое представляет собой трансмембранные иммуномодулирующие белки, содержащие аминокислотные замены E16V/N52H/N57Y/Q100R/V110D/H115R/Y152C/K156M/C198R, N52H/N57Y/Q100R или

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

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

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

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

Также предусматривается i) последовательность нуклеотидов, представленных в SEQ ID NO: 384, ii) последовательность, которая имеет, по меньшей мере, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% последовательности SEQ ID NO: 244 и которая кодирует TIP, который включает домен с модифицированной аффинностью SEQ ID NO: 243 или iii) последовательность i) или ii) с вырожденными кодонами.

В некоторых воплощениях предоставлены трансмембранные иммуномодулирующие белки, связанные с CAR, в которых эндодомен трансмембранного иммуномодулирующего белка включает цитоплазматический сигнальный домен, который включает, по меньшей мере, один ITAM (иммунорецепторный тирозиновый активирующий мотив)-содержащий сигнальный домен. ITAM является консервативным мотивом, обнаруженным в ряде белковых доменов сигнализации, участвующих в сигнальной трансдукции иммунных клеток, в том числе в CD3-дзета-цепи ("CD3-z"), участвующей в трансдукции сигнала Т-клеточного рецептора. В некоторых воплощениях эндодомен включает сигнальный домен CD3-дзета. В некоторых воплощениях сигнальный домен CD3-дзета включает аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 243, или аминокислотную последовательность, которая имеет, по меньшей мере, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% к SEQ ID NO: 247 и сохраняет сигнальную активность Т-клеток. В некоторых воплощениях эндодомен трансмембранного иммуномодулирующего белка, связанного с CAR, может дополнительно содержать костимулирующий сигнальный домен для дальнейшей модуляции иммуномодулирующих ответов Т-клетки. В некоторых воплощениях костимулирующий сигнальный домен является CD28, ICOS, 41BB или OX40. В некоторых воплощениях костимулирующий сигнальный домен является производным от CD28 или 4-1BB и включает аминокислотную последовательность, указанную в любом из SEQ ID NO: 484-487, или аминокислотную последовательность, которая имеет, по меньшей мере, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичности с SEQ ID NO: 484-487 и сохраняет костимулирующую сигнальную активность Т-клеток. В некоторых воплощениях предоставлены связанные с CAR трансмембранные иммуномодулирующие белки имеют признаки CAR для стимуляции передачи Т-клеток при связывании домена IgSF с модифицированной аффинностью с когнатным связывающим партнером или контрструктурой. В некоторых во-

площениях специфическое связывание домена с модифицированной аффинностью IgSF с его контр-структурой может приводить к изменениям в иммунологической активности Т-клеток, что отражается в изменениях цитотоксичности, пролиферации или выработки цитокинов.

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

2. Секретируемые иммуномодулирующие белки и сконструированные клетки.

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

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

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

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

Таблица 6

Примерные сигнальные пептиды

SEQ ID NO	Сигнальный пептид	Пептидная последовательность
SEQ ID NO: 346	сигнальный пептид HSA	MKWVTFISLLFLFSSAYS
SEQ ID NO: 347	Ig легкая цепь каппа	MDMRAPAGIFGFLLVLPFGYRS
SEQ ID NO: 348	Сигнальная последовательность пребелка азуроцидина человека	MTRLTVLALLAGLLASSRA
SEQ ID NO: 349	сигнальный пептид тяжелой цепи IgG	MELGLSWIFLLAILKGVQC
SEQ ID NO: 350	сигнальный пептид тяжелой цепи IgG	MELGLRWVFLVAILEGVQC
SEQ ID NO: 351	сигнальный пептид тяжелой цепи IgG	MKHLWFFLLLVAAPRWVLS
SEQ ID NO: 352	сигнальный пептид тяжелой цепи IgG	MDWTWRILFLVAAATGAHS
SEQ ID NO: 353	сигнальный пептид тяжелой цепи IgG	MDWTWRFLFVVAATGVQS
SEQ ID NO: 354	сигнальный пептид тяжелой цепи IgG	MEFGLSWLFLVAILKGVQC
SEQ ID NO: 355	сигнальный пептид тяжелой цепи IgG	MEFGLSWVFLVALFRGVQC
SEQ ID NO: 356	сигнальный пептид тяжелой цепи IgG	MDLLHKNMKHLWFFLLLVAAPRWVLS
SEQ ID NO: 357	сигнальная последовательность легкой цепи каппа IgG	MDMRVPAQLLGLLLLWLSGARC
SEQ ID NO: 358	сигнальная последовательность легкой цепи каппа IgG	MKYLLPTAAAGLLLLAAQPAMA
SEQ ID NO: 359	Люцифераза <i>Gaussia</i>	MGVKVLFALICIAVAEA
SEQ ID NO: 360	Альбумин человека	MKWVTFISLLFLFSSAYS
SEQ ID NO: 361	химотрипсиноген человека	MAFLWLLSCWALLGTTFG
SEQ ID NO: 362	интерлейкин-2 человека	MQLLSCIALILALV
SEQ ID NO: 363	Трипсиноген-2 человека	MNLLLILTFVAAAVA

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

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

3. Клетки и сконструированные клетки.

В данном документе предлагаются сконструированные клетки, экспрессирующие любой из представленных иммуномодулирующих полипептидов. В некоторых воплощениях сконструированные клетки экспрессируют на своей поверхности любой из представленных трансмембранных иммуномодулирующих полипептидов. В некоторых воплощениях сконструированные клетки экспрессируют и способны или могут секретировать иммуномодулирующий белок из клеток в условиях, подходящих для секреции белка. В некоторых воплощениях трансмембранный иммуномодулирующий белок экспрессируется на лимфоците, таком как инфильтрирующий опухоль лимфоцит (TIL), Т-клетка или НК-клетка, или на миелоидной клетке. В некоторых воплощениях сконструированные клетки представляют собой антигенпредставляющие клетки (APC). В некоторых воплощениях сконструированные клетки представляют собой модифицированные Т-клетки млекопитающих или сконструированные антигенпредставляющие клетки млекопитающих (APC). В некоторых воплощениях сконструированные Т-клетки или APC представляют собой человеческие или мышиные клетки.

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

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

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

В некоторых воплощениях CAR дополнительно включает спейсер или шарнир, трансмембранный домен и внутриклеточный домен сигнализации (эндодомен), содержащий сигнальный домен ITAM, например, сигнальный домен CD3-дзета. В некоторых воплощениях изобретения CAR включает костимулирующий сигнальный домен. В некоторых воплощениях спейсер или шарнир присутствует между антигенсвязывающим доменом и трансмембранным доменом, например, между антигенсвязывающим доменом и плазматической мембраной, когда он экспрессируется в клетке. В некоторых воплощениях спейсер или шарнир получают из подкласса IgG (такого как IgG1 и IgG4, IgD или CD8 (см., например, Qin et al. (2017) J. Nematol. Oncol., 10:68). В некоторых воплощениях спейсер или шарнир получают из IgG1.

В некоторых воплощениях спейсер и трансмембранный домен являются шарниром и трансмембранным доменом, которые получены из CD8, например, как указано в SEQ ID NO: 246 или 483 или аминокислотной последовательности, которая имеет по меньшей мере, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% или более идентичности последовательности с SEQ ID NO: 246 или 483. В некоторых воплощениях эндодомен включает сигнальный домен CD3-дзета. В некоторых воплощениях сигнальный домен CD3-дзета включает аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 387, или аминокислотную последовательность, которая имеет, по меньшей мере, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичности с SEQ ID NO: 387 и сохраняет сигнальную активность для Т-клеток. В некоторых воплощениях эндодомен трансмембранного иммуномодулирующего белка, связанного с CAR, может дополнительно содержать костимулирующий сигнальный домен для дальнейшей модуляции иммуномодулирующих ответов Т-клетки. В некоторых воплощениях костимулирующий сигнальный домен является CD28, ICOS, 41BB или OX40. В некоторых воплощениях костимулирующий сигнальный домен является производным CD28 или 4-1BB и включает аминокислотную последовательность, указанную в любом из SEQ ID NO: 484-487, или аминокислотную последовательность, которая имеет, по меньшей мере, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичности с SEQ ID NO: 484-487 и сохраняет костимулирующую сигнальную активность Т-клеток.

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

В некоторых воплощениях иммуномодулирующие полипептиды, такие как трансмембранные иммуномодулирующие полипептиды или секретируемые иммуномодулирующие полипептиды, могут быть включены в сконструированные клетки, такие как сконструированные Т-клетки или сконструированные APC, с помощью различных стратегий, таких как те, которые используются для рекомбинантных клеток-хозяев. В данной области техники известно множество способов введения ДНК-конструктов в первичные Т-клетки. В некоторых воплощениях используют вирусную трансдукцию или плазмидную электропорацию. В типичных воплощениях нуклеотидная молекула, кодирующая иммуномодулирующий белок или экспрессирующий вектор, включают сигнальный пептид, который локализует экспрессируемые трансмембранные иммуномодулирующие белки в клеточной мембране или для секреции. В некоторых воплощениях нуклеиновая кислота, кодирующая трансмембранные иммуномодулирующие белки по изобретению, субклонируется в вирусный вектор, такой как ретровирусный вектор, который позволяет экспрессироваться в клетке-хозяине млекопитающего. Экспрессирующий вектор можно вводить в клетку-хозяина млекопитающего, и в условиях культивирования клеток-хозяев иммуномодулирующий белок экспрессируется на поверхности или секретируется.

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

При экспрессии иммуномодулирующего полипептида сконструированные Т-клетки могут быть проанализированы по соответствующей функции с помощью различных средств. Коэкспрессия сконструированных CAR или TCR может быть подтверждена для того, чтобы показать, что эта часть сконструированной Т-клетки существенно не повлияла на экспрессию иммуномодулирующего белка. После подтверждения, для оценки функции сконструированных Т-клеток можно использовать стандартные анализы цитотоксичности, пролиферации или выработки цитокинов *in vitro* (например, экспрессии IFN-гамма). Типичными стандартными конечными точками являются процент лизиса опухолевой линии, пролиферация сконструированной Т-клетки или экспрессия белка IFN-гамма в культуральных надосадочных жидкостях. Может быть выбран сконструированный конструкт, который приводит к статистически значимому увеличению лизиса опухолевой линии, увеличению пролиферации сконструированной Т-клетки или увеличению экспрессии IFN-гамма по сравнению с контрольной конструкцией. Кроме того, неочищенные клетки, такие как нативные первичные или эндогенные Т-клетки, также могут быть включены в один и тот же анализ *in vitro* для измерения способности иммуномодулирующего пептида, экспрессированного в сконструированных клетках, таких как сконструированные Т-клетки, модулировать активность, включая, в некоторых случаях, модулировать активацию и генерацию эффекторной функции у нативных Т-клеток-"свидетелей". Повышенная экспрессия маркеров активации, таких как CD69, CD44 или CD62L, может контролироваться на эндогенных Т-клетках, а увеличенные пролиферация и/или выработка цитокинов могут указывать на искомую активность T_H1, экспрессированных на сконструированных Т-клетках.

В некоторых воплощениях аналогичные анализы могут использоваться для сравнения функции сконструированных Т-клеток, содержащих CAR или TCR отдельно, с теми, которые содержат CAR или TCR и конструкцию T_H1. Как правило, эти анализы *in vitro* проводят путем рассеивания вместе в культуре различных соотношений сконструированных Т-клеток и "опухолевой" клеточной линии, содержащей когнатный CAR или TCR антиген. Стандартными конечными точками являются процент лизиса опухолевой линии, пролиферация сконструированных Т-клеток, или продуцирование IFN-гамма в культуральных надосадочных жидкостях. Может быть выбран сконструированный иммуномодулирующий белок, который дает статистически значимое увеличение лизиса опухолевой линии, увеличение пролиферации сконструированной Т-клетки или увеличение продуцирования IFN-гамма по сравнению с одной и той же конструкцией TCR или CAR отдельно. Сконструированные человеческие Т-клетки могут быть проанализированы.

зированы у мышей с ослабленным иммунитетом, таких как линия NSG, которая утратила мышинные Т-, NK- и В-клетки. Сконструированные человеческие Т-клетки, в которых CAR или TCR связывают контр-структуру-мишень на ксенотрансплантате и коэкспрессируются с T1P с доменом IgSF с модифицированной аффинностью, могут быть адоптивно перенесены *in vivo* в разных количествах и соотношениях клеток по сравнению с ксенотрансплантатом. Например, приживление опухолевых линий CD19+ лейкоза, содержащих вектор люциферазы/GFP, можно контролировать с помощью биолуминесценции или *ex vivo* с помощью проточной цитометрии. В обычном воплощении ксенотрансплантат вводят в мышиную модель, а затем через несколько дней - сконструированные Т-клетки. Сконструированные Т-клетки, содержащие иммуномодулирующий белок, могут быть проанализированы на предмет увеличения выживаемости, клиренса опухоли или количества размноженных сконструированных Т-клеток по сравнению с сконструированными Т-клетками, содержащими только CAR или TCR. Как и в анализе *in vitro*, эндогенные, нативные (т.е. не-сконструированные) человеческие Т-клетки могут быть ко-адоптивно перенесены для поиска успешного распространения эпитопа в этой популяции, что приводит к лучшей выживаемости или клиренсу опухоли.

Е. Инфекционные агенты, экспрессирующие варианты полипептиды и иммуномодулирующие белки.

Также предлагаемое представляет собой инфекционные агенты, которые содержат нуклеиновые кислоты, кодирующие любой из вариантных полипептидов, таких как полипептиды ICOSL vIgD, в том числе секретируемые или трансмембранные иммуномодулирующие белки, описанные в настоящем изобретении. В некоторых воплощениях такие инфекционные агенты могут доставлять нуклеиновые кислоты, кодирующие описанные в данном документе вариантные иммуномодулирующие полипептиды, такие как полипептиды ICOSL vIgD, в клетку-мишень у объекта, например, иммунную клетку и/или антиген-презентирующую клетку (APC) или опухолевую клетку в объекте. Также предусмотрены нуклеиновые кислоты, содержащиеся в таких инфекционных агентах, и/или нуклеиновые кислоты для получения или модификации таких инфекционных агентов, такие как векторы и/или плазмиды, и композиции, содержащие такие инфекционные агенты.

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

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

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

В некоторых воплощениях настоящего изобретения клетки в объекте, которые нацелены на инфекционный агент включают опухолевую клетку, иммунную клетку и/или антигенпредставляющую клетку (APC). В некоторых воплощениях инфекционный агент нацелен на клетку в микроокружении опухоли (TME). В некоторых воплощениях инфекционный агент доставляет нуклеиновые кислоты, кодирующие варианты полипептиды, такие как полипептиды ICOSL vIgD, включая секретируемые или трансмембранные иммуномодулирующие белки, в соответствующую клетку (например, APC, такую как клетка, которая презентует комплекс пептид/MHC на своей клеточной поверхности, такой как дендритная

клетка) или ткань (например, лимфоидная ткань), которая будет индуцировать и/или увеличивать искомый эффект, например иммуномодуляцию и/или специфический иммунный ответ на клетки, например, CD4 и/или CD8 Т-клеточный ответ, где CD8 Т-клеточный ответ может включать цитотоксический Т-клеточный ответ (CTL). В некоторых воплощениях инфекционный агент нацелен на APC, такую как дендритная клетка (DC). В некоторых воплощениях нуклеотидная молекула, доставленная описанными в данном документе инфекционными агентами, включает соответствующие нуклеотидные последовательности, необходимые для экспрессии функционально связанных последовательностей, кодирующих варианты иммуномодулирующие полипептиды, в конкретной клетке-мишени, например, регуляторные элементы, такие как промоторы.

В некоторых воплощениях, инфекционный агент, который включает нуклеотидные последовательности, кодирующие иммуномодулирующие полипептиды может также содержать нуклеотидные последовательности, которые кодируют один или несколько дополнительных генных продуктов, например, цитокин, ферменты, конвертирующие пролекарства, цитотоксины и/или детектируемые генные продукты. Например, в некоторых воплощениях инфекционный агент представляет собой онколитический вирус, и вирус может включать нуклеотидные последовательности, кодирующие дополнительные терапевтические генные продукты (см., например, Kirn et al., (2009) *Nat Rev Cancer* 9: 64-71; Garcia-Aragoncillo et al., (2010) *Curr Opin Mol Ther* 12: 403-411, см. пат. США 7588767, 7588771, 7662398 и 7754221 и публ. пат. США No. 2007/0202572, 2007/0212727, 2010/0062016, 2009/0098529, 2009/0053244, 2009/0155287, 2009/0117034, 2010/0233078, 2009/0162288, 2010/0196325, 2009/0136917 и 2011/0064650. В некоторых воплощениях дополнительный генный продукт может быть продуктом терапевтического гена, который может привести к гибели клетки-мишени (например, опухолевой клетки) или генными продуктами, которые могут усиливать или стимулировать или регулировать иммунный ответ (например, цитокином). Примеры генных продуктов также включают противоопухолевый агент, антиметастатический агент, антиангиогенный агент, иммуномодулирующую молекулу, ингибитор иммунного чекпойнта, антитело, цитокин, фактор роста, антиген, продукт цитотоксического гена, продукт апоптотического гена, продукт антиапоптотического гена, ген деградации клеточной матрицы, гены для регенерации тканей и перепрограммирования соматических клеток человека в плюрипотентность и другие гены, описанные в данном документе или известные специалисту в данной области. В некоторых воплощениях дополнительный генный продукт представляет собой гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (GM-CSF).

1. Вирусы.

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

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

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

Онколитический вирус для применения в доставке нуклеиновых кислот, кодирующие варианты полипептиды ICOSL или иммуномодулирующие полипептиды, описанные в данном документе, могут быть любыми из тех, которые известны специалисту в данной области и включают, например, вирус везикулярного стоматита, см., например, пат. США № 7731974, 7153510, 665,103 и публ. пат. США № 2010/0178684, 2010/0172877, 2010/0113567, 2007/0098743, 20050260601, 20050220818 и пат. EP № 1385466, 1606411 и 1520175; вирус простого герпеса, см., например, пат. США. № 7 897 146, 7 731 952, 7 550 276, 7 537 924, 6 723 316, 6 428 968 и публ. пат. США № 2014/0154216, 2011/0177032, 2011/0158948,

2010/0092515, 2009/0274728, 2009/0285860, 2009/0215147, 2009/0010889, 2007/0110720, 2006/0039894, 2004/0009604, 2004/0063094, публ. международных пат. № WO 2007/052029, WO 1999/038955; ретровирусы, см., например, пат. США № 6 689 871, 6 635 472, 5 851 529, 5 716 826, 5 716 613 и публ. пат. США № 20110212530; вирусы коровьей оспы, см., например, 2016/0339066, и адено-ассоциированные вирусы, см., например, № 8 007 780, 7 968 340, 7 943 374, 7 906 111, 7 927 585, 7 811 814, 7 662 627, 7 241 447, 7 238 526, 7 172 893, 7 033 826, 7 001 765, 6 897 045 и 6 632 670.

Онколитические вирусы также включают вирусы, которые были генетически изменены для ослабления их вирулентности, для улучшения их профиля безопасности, повышения их специфичности к опухолям, а также были оснащены дополнительными генами, например, цитотоксинами, цитокинами, ферментами, конвертирующими пролекарства, для улучшения общей эффективности вирусов (см., например, Kim et al., (2009) *Nat Rev Cancer* 9: 64-71; Garcia-Aragoncillo et al., (2010) *Curr Opin Mol Ther* 12: 403-411, см. пат. США № 7 588 767, 7 588 771, 7 662 398 и 7 754 221 и публ. пат. США № 2007/0202572, 2007/0212727, 2010/0062016, 2009/0098529, 2009/0053244, 2009/0155287, 2009/0117034, 2010/0233078, 2009/0162288, 2010/0196325, 2009/0136917 и 2011/0064650). В некоторых воплощениях онколитические вирусы могут быть теми, которые были модифицированы так, чтобы они выборочно реплицировались в злокачественных опухолевых клетках и, таким образом, являлись онколитическими. Например, онколитический вирус представляет собой аденовирус, который был спроектирован так, чтобы иметь модифицированный тропизм для лечения опухолей, а также в качестве векторов для генной терапии. Примерами таких вирусов являются ONYX-015, H101 и Ad5ΔCR (Hallden and Portella (2012) *Expert Opin Ther Targets*, 16: 945-58) и TNFerade (McLoughlin et al. (2005) *Ann. Surg. Oncol*, 12: 825-30) или условно репликативный аденовирус Oncorine®.

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

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

1. Бактерии.

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

В некоторых воплощениях эта бактерия доставляет нуклеиновые кислоты в клетки с помощью бак-

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

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

В некоторых воплощениях инфекционный агент является бактерией, которая принадлежит к *Listeria* sp., *Bifidobacterium* sp., *Escherichia* sp., *Clostridium* sp., *Salmonella* sp., *Shigella* sp., *Vibrio* sp. или *Yersinia* sp. В некоторых воплощениях бактерии выбраны из одной или нескольких из числа *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella choleraesuis*, *Escherichia coli*, *Vibrio cholera*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium butyricum*, *Clostridium novyi*, *Clostridium acetobutylicum*, *Bifidobacterium infantis*, *Bifidobacterium longum* и *Bifidobacterium adolescentis*. В некоторых воплощениях бактерия представляет собой сконструированную бактерию. В некоторых воплощениях бактерия представляет собой сконструированную бактерию, такую как описанная, например, в Seow and Wood (2009) *Molecular Therapy* 17(5):767-777; Baban et al. (2010) *Bioengineered Bugs* 1:6, 385-394; Patyar et al. (2010) *J Biomed Sci* 17:21; Tangney et al. (2010) *Bioengineered Bugs* 1:4, 284-287; van Pijkeren et al. (2010) *Hum Gene Ther.* 21 (4): 405-416; WO 2012/149364; WO 2014/198002; US 9103831; US 9453227; US 2014/0186401; US 2004/0146488; US 2011/0293705; US 2015/0359909 и EP 3020816. Бактерия может быть модифицирована для доставки нуклеотидных последовательностей, кодирующих любой из вариантов иммуномодулирующих полипептидов, конъюгатов и/или слитых белков, представленных в данном документе, и/или для экспрессии таких вариантов иммуномодулирующих полипептидов в объекте.

Г. Нуклеиновые кислоты, векторы и способы получения полипептидов или клеток.

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

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

Предлагаемое в данном документе также представляет собой сконструированные клетки, такие как

сконструированные иммунные клетки, содержащие любую из предоставленных нуклеотидных молекул или любой из вариантных полипептидов ICOSL или иммуномодулирующих полипептидов, например, любой из трансмембранных иммуномодулирующих полипептидов или секретируемых иммуномодулирующих полипептидов.

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

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

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

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

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

В некоторых воплощениях, индуцируемый промотор функционально связан с нуклеотидной молекулой, кодирующей вариантный полипептид или иммуномодулирующий белок, таким образом, что экспрессия нуклеиновой кислоты является управляемой путем контроля наличия или отсутствия соответствующего индуктора транскрипции. Например, промотор может быть регулируемой промоторной системой и системой экспрессии транскрипционных факторов, такой как опубликованные системы, регулируемые тетрациклином, или другие регулируемые системы (см., например, опубликованную Международную заявку РСТ № WO 01/30843), чтобы обеспечить регулируемую экспрессию кодированного полипептида. Типичной регулируемой промоторной системой является система Tet-On (и Tet-Off), доступная, например, у Clontech (Пало-Альто, Калифорния). Эта промоторная система позволяет регулировать экспрессию трансгена, контролируемого производными тетрациклина или тетрациклина, такими как доксициклин. Известны другие регулируемые промоторные системы (см., например, опубликованную заявку США № 2002-0168714, озаглавленную "Регулирование экспрессии генов с использованием одноцепо-

чечных, мономерных, зависящих от лиганда полипептидных переключателей", которая описывает переключатели генов, которые содержат домены, связывающие лиганды, и домены, регулирующие транскрипцию, такие как гормональные рецепторы).

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

В некоторых воплощениях индуцируемый промотор функционально связан с нуклеотидной молекулой, кодирующей иммуномодулирующий белок таким образом, чтобы иммуномодулирующий белок экспрессировался в ответ на ядерный фактор активированных Т-клеток (NFAT) или ядерный фактор, энхансер легких цепей каппа активированных В-клеток (NF-κB). Например, в некоторых воплощениях индуцируемый промотор включает сайт связывания для NFAT или NF-κB. Например, в некоторых воплощениях промотор представляет собой промотор NFAT или NF-κB или его функциональный вариант. Таким образом, в некоторых воплощениях нуклеиновые кислоты позволяют контролировать экспрессию иммуномодулирующего белка, одновременно уменьшая или устраняя токсичность иммуномодулирующего белка. В частности, сконструированные иммунные клетки, содержащие нуклеиновые кислоты по изобретению, экспрессируют и секретируют иммуномодулирующий белок только тогда, когда клетка (например, Т-клеточный рецептор (TCR) или химерный антигенный рецептор (CAR), экспрессируемый клеткой) специфически стимулируется антигеном и/или клеткой (например, сигнальный путь кальция в клетке), неспецифически стимулируется, например, фоболмиристатацетатом (PMA)/иономицином.

Соответственно, экспрессия и, в некоторых случаях, секреция иммуномодулирующего белка может контролироваться только тогда, когда и где это необходимо (например, в присутствии возбудителя инфекционных заболеваний, в злокачественной опухоли или в опухолевом участке), что позволяет уменьшить или избежать нежелательных иммуномодулирующих белковых взаимодействий.

В некоторых воплощениях нуклеиновая кислота, кодирующая, описанный в данном документе иммуномодулирующий белок, включает подходящую нуклеотидную последовательность, которая кодирует промотор NFAT, промотор NF-κB, или его функциональный вариант. Используемый в данном документе "промотор NFAT" означает один или несколько чувствительных к NFAT элементов, связанных с минимальным промотором, "промотор NF-κB" относится к одному или нескольким чувствительным к NF-κB элементам, связанным с минимальным промотором. В некоторых воплощениях минимальный промотор гена представляет собой минимальный промотор IL-2 человека или промотор CMV. Респонсивные элементы NFAT могут включать, например, респонсивные элементы NFAT1, NFAT2, NFAT3 и/или NFAT4. Промотор NFAT, промотор NF-κB или его функциональный вариант, может включать любое количество связывающих мотивов, например, по меньшей мере, два, по меньшей мере, три, по меньшей мере, четыре, по меньшей мере, пять, или, по меньшей мере, шесть, по меньшей мере, семь, по меньшей мере, восемь, по меньшей мере, девять, по меньшей мере, десять, по меньшей мере, одиннадцать или вплоть до двенадцати мотивов связывания.

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

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

Любой из большого числа общедоступных и хорошо известных клеток-хозяев млекопитающих, в

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

В некоторых воплощениях, клетки-хозяева могут представлять собой различные эукариотические клетки, например, клетки дрожжей, или с клетки млекопитающих, таких как клетки яичника китайского хомячка (СНО) или клетки НЕК293. Клетки-хозяева также могут быть прокариотическими клетками, такими как *E. coli*. Трансформированный рекомбинантный хозяин культивируется в условиях экспрессии полипептидов и затем очищается с получением растворимого белка. Рекомбинантные клетки-хозяева можно культивировать в обычных условиях ферментации, так чтобы экспрессировались искомые полипептиды. Такие условия ферментации хорошо известны в данной области. Наконец, представленные в данном документе полипептиды могут быть выделены и очищены из культур рекомбинантных клеток любым из ряда способов, хорошо известных в данной области, включая осаждение сульфатом аммония или этанолом, экстракцию кислотой, анионную или катионообменную хроматографию, фосфоцеллюлозную хроматографию, хроматографию с гидрофобным взаимодействием, аффинную хроматографию. Стадии повторного сворачивания белка можно использовать по желанию при завершении конфигурации зрелого белка. Наконец, высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) может быть использована на заключительных стадиях очистки.

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

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

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

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

В некоторых воплощениях рекомбинантный вектор представляет собой вирусный вектор. Иллюстративные рекомбинантные вирусные векторы включают геном лентивирусного вектора, геном поксвирусного вектора, геном вектора вируса коровьей оспы, геном аденовирусного вектора, геном вектора на основе аденоассоциированного вируса, геном герпесвирусного вектора и геном альфа-вирусного вектора. Вирусные векторы могут быть живыми, ослабленными, вектором с зависимой от условий реплика-

цией или репликативно-дефицитным вектором, непатогенным (дефектным), репликативно-компетентным вектором и/или модифицированным для экспрессии гетерологичного гена, например, вариантов иммуномодулирующих полипептидов, представленных в данном документе. Векторы для получения вирусов также могут быть модифицированы для изменения ослабления вируса, которое включает любой способ увеличения или уменьшения транскрипционной или трансляционной нагрузки.

Примерные вирусные векторы, которые могут быть использованы, включают модифицированные вирусные векторы вируса коровьей оспы (см., например, Guerra et al., *J. Virol.* 80:985-98 (2006); Tartaglia et al., *AIDS Research and Human Retroviruses* 8: 1445-47 (1992); Gheradi et al., *J. Gen. Virol.* 86:2925-36 (2005); Mayr et al., *Infection* 3:6-14 (1975); Hu et al., *J. Virol.* 75: 10300-308 (2001); Пат. США № 5 698 530, 6 998 252, 5 443 964, 7 247 615 и 7 368 116); аденовирусный вектор или векторы на основе аденовирус-ассоциированного вируса (см., например, Molin et al., *J. Virol.* 72:8358-61 (1998); Narumi et al., *Am J. Respir. Cell Mol. Biol.* 19:936-41 (1998); Mercier et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. США* 101: 6188-93 (2004); Пат. США № 6 143 290; 6 596 535; 6 855 317; 6 936 257; 7 125 717; 7 378 087; 7 550 296); ретровирусные векторы, включая те, которые основаны на вирусе лейкоза мышей (MuLV), вирусе лейкоза гиббонов (GaLV), экотропных ретровирусах, вирусе иммунодефицита обезьян (SIV), вирусе иммунодефицита человека (HIV) и комбинациях (см., например, Buchscher et al. *J. Virol.* 66:2731-39 (1992); Johann et al., *J. Virol.* 66: 1635-40 (1992); Sommerfelt et al., *Virology* 176:58-59 (1990); Wilson et al., *J. Virol.* 63:2374-78 (1989); Miller et al., *J. Virol.* 65:2220-24 (1991); Miller et al., *Mol. Cell Biol.* 10:4239 (1990); Kolberg, *NIH Res.* 4:43 1992; Cornetta et al., *Hum. Gene Ther.* 2: 215 (1991)); лентивирусные векторы, включая те, которые основаны на вирусе иммунодефицита человека (HIV-1), вирусе иммунодефицита кошек (FIV), вирусе инфекционной анемии лошадей, вирусе иммунодефицита обезьян (SIV) и вирусе Маеди/Висна (см., например, Pfeifer et al., *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 2: 177-211 (2001); Zufferey et al., *J. Virol.* 72: 9873, 1998; Miyoshi et al., *J. Virol.* 72:8150, 1998; Philpott and Thrasher, *Human Gene Therapy* 18:483, 2007; Engelman et al., *J. Virol.* 69: 2729, 1995; Nightingale et al., *Mol. Therapy*, 13: 1121, 2006; Brown et al., *J. Virol.* 73:9011 (1999); WO 2009/076524; WO 2012/141984; WO 2016/011083; McWilliams et al., *J. Virol.* 77: 11150, 2003; Powell et al., *J. Virol.* 70:5288, 1996) или любые их варианты и/или векторы, которые могут быть использованы для получения любого из описанных выше вирусов. В некоторых воплощениях рекомбинантный вектор может включать регуляторные последовательности, такие как промоторные или энхансерные последовательности, которые могут регулировать экспрессию вирусного генома, например, в случае РНК-вирусов, в упаковочной клеточной линии (см., например, пат. США № 5 385 839 и 5 168 062).

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

В некоторых аспектах нуклеиновые кислоты или экспрессирующий вектор включают нуклеотидную последовательность, которая кодирует иммуномодулирующий белок, функционально связанный с соответствующими последовательностями, контролирующими экспрессию. Способы воздействия на эту функциональную связь, либо до, либо после нуклеотидной последовательности, кодирующей иммуномодулирующий белок, вставленной в вектор, хорошо известны. Контрольные последовательности экспрессии включают промоторы, активаторы, энхансеры, операторы, сайты рибосомного связывания, сигналы запуска, сигналы остановки, кэп-сигналы, сигналы полиаденилирования и другие сигналы, связанные с контролем транскрипции или трансляции. Промотор может быть функционально связан с частью нуклеотидной последовательности, кодирующей иммуномодулирующий белок. В некоторых воплощениях промотор представляет собой конститутивно активный промотор в клетке-мишени (такой как тканеспецифический конститутивно активный промотор или другой конститутивный промотор). Например, рекомбинантный экспрессирующий вектор может также включать регуляторные элементы транскрипции, специфичные для лимфоидной ткани (TRE), такой как TRE, специфичные для В-лимфоцитов, Т-лимфоцитов или дендритных клеток. TRE, специфические для лимфоидной ткани, известны в данной области (см., например, Thompson et al., *Mol. Cell. Biol.* 12:1043-53 (1992); Todd et al., *J. Exp. Med.* 177:1663-74 (1993); Penix et al., *J. Exp. Med.* 178:1483-96 (1993)). В некоторых воплощениях промотор представляет собой индуцибельный промотор, который может реагировать на индуцирующий агент (такой как сигнал активации Т-клеток). В некоторых воплощениях нуклеиновые кислоты, доставленные в клетку-мишень объекта, например, опухолевую клетку, иммунную клетку и/или APC, могут быть функционально связаны с любым из регуляторных элементов, описанных выше.

В некоторых воплощениях вектор представляет собой бактериальный вектор, например, бактериальную плазмиду или космиду. В некоторых воплощениях бактериальный вектор доставляется в клетку-мишень, например, опухолевую клетку, иммунные клетки и/или APC, посредством опосредованной бактериями передачи плазмидной ДНК в клетки млекопитающих (также называемой "бактофекцией"). В некоторых воплощениях доставленный бактериальный вектор также включает соответствующие после-

довательности контроля экспрессии для экспрессии в клетках-мишенях, такие как промоторная последовательность и/или энхансерные последовательности, или любые регуляторные или контрольные последовательности, описанные выше. В некоторых воплощениях бактериальный вектор включает соответствующие последовательности для контроля экспрессии для экспрессии и/или секреции кодированных вариантов полипептидов в инфекционном агенте, например, бактерии.

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

IV. Способы оценки иммунной модуляции активности вариантных полипептидов ICOSL и иммуномодулирующих белков.

В некоторых воплощениях вариантные полипептиды ICOSL, представленные в данном документе (например, полноразмерные и/или специфические связывающие фрагменты или конъюгаты, стековые конструкции или их слитые белки), демонстрируют иммуномодулирующую активность, для того, чтобы модулировать активацию Т-клеток. В некоторых воплощениях полипептиды ICOSL модулируют экспрессию IFN-гамма в первичном анализе Т-клеток относительно контрольного ICOSL дикого типа или немодифицированного ICOSL. В некоторых случаях модуляция экспрессии IFN-гамма может увеличивать или уменьшать экспрессию IFN-гамма по сравнению с контролем. Анализы для определения специфического связывания и экспрессии IFN-гамма хорошо известны в данной области и включают реакции MLR (реакции смешанных лимфоцитов), в которых измеряются уровни интерферона-гамма-цитокинов в культуральных надосадочных жидкостях (Wang et al., *Cancer Immunol Res.*, 2014, Sep: 2 (9): 846-56), анализ стимуляции Т-клеток SEB (стафилококковым энтеротоксином B) (Wang et al., *Cancer Immunol Res.*, 2014, Sep: 2 (9): 846-56) и анализы стимуляции анти-CD3 Т-клеток (Li and Kurlander, *J Transl Med.*, 2010: 8: 104).

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

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

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

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

В некоторых воплощениях вариантный ICOSL увеличивает экспрессию IFN-гамма (т.е. экспрессию белка) относительно контрольного ICOSL дикого типа или немодифицированного ICOSL, по меньшей

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

V. Фармацевтические композиции.

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

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

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

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

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

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

В некоторых воплощениях предлагаемое представляет собой фармацевтические композиции, содержащие трансмембранные иммуномодулирующие белки, в том числе сконструированные клетки, экспрессирующие такие трансмембранные иммуномодулирующие белки. В некоторых воплощениях фармацевтические композиции и составы включают один или несколько необязательных фармацевтически

приемлемых носителей или эксципиентов. Такие композиции могут включать буферы, например, нейтральный буферный физиологический раствор, фосфатно-солевой буферный раствор и т.п.; углеводы, такие как глюкоза, манноза, сахароза или декстраны, маннит; белки; полипептиды или аминокислоты, такие как глицин; антиоксиданты; хелатирующие агенты, такие как EDTA или глутатион; адъюванты (например, гидроксид алюминия); и консерванты. Композиции по настоящему изобретению предпочтительно составлены для внутривенного введения.

В некоторых воплощениях изобретения фармацевтическая композиция включает инфекционные агенты, содержащие нуклеотидные последовательности, кодирующие иммуномодулирующие варианты полипептиды. В некоторых воплощениях фармацевтическая композиция включает дозу инфекционных агентов, подходящих для введения объекту, которому необходимо лечение. В некоторых воплощениях фармацевтическая композиция включает инфекционный агент, который является вирусом, в количестве одной или нескольких доз, от около 1×10^5 до около 1×10^{12} бляшкообразующих единиц (БОЕ), 1×10^6 - 1×10^{10} или 1×10^7 - 1×10^{10} БОЕ, в каждом случае включительно, например, по меньшей мере, или, по меньшей мере, около или около 1×10^6 , 1×10^7 , 1×10^8 , 1×10^9 , 2×10^9 , 3×10^9 , 4×10^9 , 5×10^9 или около 1×10^{10} БОЕ. В некоторых воплощениях фармацевтическая композиция может содержать концентрацию вируса от или от около 10^5 до около 10^{10} БОЕ/мл, например, от 5×10^6 до 5×10^9 или от 1×10^7 до 1×10^9 БОЕ/мл, например, по меньшей мере, или, по меньшей мере, около или около 10^6 , 10^7 , 10^8 или 10^9 БОЕ/мл. В некоторых воплощениях фармацевтическая композиция включает инфекционный агент, который представляет собой бактерию, в количестве единичной или множественной дозы, от, от около 1×10^3 до около 1×10^9 колониеобразующих единиц (КОЕ), 1×10^4 и 1×10^9 КОЕ, или 1×10^5 и 1×10^7 КОЕ, в каждом случае включительно, например, по меньшей мере, или, по меньшей мере, около или около 1×10^4 , 1×10^5 , 1×10^6 , 1×10^7 , 1×10^8 или 1×10^9 КОЕ. В некоторых воплощениях фармацевтическая композиция может включать бактерии в концентрации от или от около 10^3 до около 10^8 КОЕ/мл, например, от 5×10^5 до 5×10^7 или от 1×10^6 до 1×10^7 КОЕ/мл, например, по меньшей мере, или, по меньшей мере, около или около 10^5 , 10^6 , 10^7 или 10^8 КОЕ/мл.

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

В некоторых воплощениях фармацевтическую композицию вводят объекту. Как правило, дозы и пути введения фармацевтической композиции определяются в соответствии с размером и состоянием объекта, в соответствии со стандартной фармацевтической практикой. Для любой композиции терапевтически эффективную дозу можно оценить первоначально либо в анализах на клеточных культурах, либо на моделях животных, таких как мыши, крысы, кролики, собаки, свиньи или обезьяны. Модель животного может также использоваться для определения соответствующего диапазона концентраций и пути введения. Такая информация может быть использована для определения подходящих доз и путей их введения человеку. Точная дозировка будет определяться в свете факторов, связанных с объектом, нуждающимся в лечении. Дозировку и введение регулируют так, чтобы обеспечить достаточные уровни активного соединения или поддерживать искомый эффект. Факторы, которые могут быть приняты во внимание, включают тяжесть состояния болезни, общее состояние здоровья объекта, возраст, массу и пол объекта, время и частоту введения, комбинацию(и) лекарственных средств, чувствительности реакции и реакцию на терапию.

Пролонгированные фармацевтические композиции могут быть введены через каждые 3-4 дня, каждую неделю, или раз в две недели в зависимости от периода полувыведения и скорости клиренса конкретной композиции. Частота дозирования будет зависеть от фармакокинетических параметров молекулы в используемой рецептуре. Обычно композицию вводят до тех пор, пока не будет достигнута доза, которая достигает искомого эффекта. Таким образом, композицию можно вводить в виде разовой дозы или в виде нескольких доз (в тех же или разных концентрациях/дозах) со временем или в виде непрерывной инфузии. В дальнейшем производится уточнение соответствующей дозы. Соответствующие дозы могут быть установлены с использованием соответствующих данных о дозозависимом эффекте. Можно отслеживать ряд биомаркеров или физиологических маркеров для терапевтического эффекта, включая активацию или пролиферацию Т-клеток, синтез или выработку цитокинов (например, выработку TNF- α , IFN- γ , IL-2), индукцию различных маркеров активации (например, CD25, рецептор IL-2), воспаления, набухания или болезненности суставов, уровень С-реактивного белка в сыворотке, продуцирования ан-

тител против коллагена и/или Т-зависимого ответа на антигены.

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

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

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

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

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

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

VI. Готовые изделия и наборы.

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

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

VII. Терапевтические применения.

Фармацевтические композиции, описанные в данном документе (в том числе фармацевтическая композиция, содержащая варианты полипептиды ICOSL, иммуномодулирующие протеины, конъюгаты, сконструированные клетки и инфекционные агенты, описанные в данном описании) могут быть использованы в различных терапевтических применениях, таких, как лечение заболеваний. Например, в некоторых воплощениях фармацевтическая композиция используется для лечения воспалительных или аутоиммунных заболеваний, злокачественных новообразований, трансплантации органов, вирусных инфекций и/или бактериальных инфекций у млекопитающих. Фармацевтическая композиция может модулировать (например, увеличивать или уменьшать) иммунный ответ для лечения заболевания. В некоторых воплощениях предлагаемые способы применимы для терапевтического введения вариантов полипептидов ICOSL, иммуномодулирующих белков, конъюгатов, сконструированных клеток и инфекционных агентов, описанных в данном документе. В пределах уровня квалифицированного специалиста, с учетом предоставленного изобретения, выбирать формат для указания в зависимости от типа модуляции иммунного ответа, например увеличения или уменьшения желаемого.

В некоторых воплощениях вводится фармацевтическая композиция, предлагаемая в данном описании, стимулирующая иммунный ответ, которая может быть полезна, например, при лечении онкологических заболеваний, вирусных или бактериальных инфекций. В некоторых воплощениях фармацевтическая композиция включает вариантный полипептид ICOSL в формате, который проявляет агонистическую активность к его когнатному связующему партнеру CD28 или ICOS и/или который стимулирует или инициирует костимулирующую сигнализацию через CD28 или ICOS. Типичные форматы полипептида ICOSL для использования в таких терапевтических применениях включают, например, иммуномодулирующий белок или "стековый" вариантный полипептид ICOSL и домен IgSF или его вариант, который связывается с опухолевым антигеном (например, Nkp30 или вариантом с модифицированной аффинностью) (также называемый "локализирующим опухоль доменом IgSF"), конъюгатом, содержащим вариантный полипептид ICOSL, связанный с нацеливающим на опухоль фрагментом (также называемым опухоль-локализирующим фрагментом), сконструированную клетку, экспрессирующую трансмембранный иммуномодулирующий белок или инфекционный агент, включающий нуклеотидную молекулу, кодирующую трансмембранный иммуномодулирующий белок, например, для экспрессии трансмембранного иммуномодулирующего белка в инфицированной клетке (например, опухолевой клетке или APC, например дендритной клетке).

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

Злокачественные новообразования, которые можно лечить с помощью фармацевтических композиций и способов лечения, описанных в данном документе, включают, без ограничения указанным, меланому, рак мочевого пузыря, гематологические злокачественные опухоли (лейкоз, лимфому, миелому), рак печени, рак мозга, рак почек, рак молочной железы, рак поджелудочной железы (аденокарцинома), колоректальный рак, рак легкого (мелкоклеточный рак легкого и немелкоклеточный рак легкого), рак

селезенки, рак тимуса или клеток крови (то есть лейкемия), рак предстательной железы, яичек рак, рак яичников, рак матки, рак желудка, мышечно-скелетную злокачественную опухоль, рак головы и шеи, рак желудочно-кишечного тракта, рак зародышевых клеток или эндокринный и нейроэндокринный рак. В некоторых воплощениях злокачественное новообразование представляет собой саркому Юинга. В некоторых воплощениях злокачественное новообразование выбирают из меланомы, рака легкого, рака мочевого пузыря и гематологической злокачественности. В некоторых воплощениях злокачественное новообразование представляет собой лимфому, лимфоидный лейкоз, миелоидный лейкоз, рак шейки матки, нейробластома или множественную миелому.

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

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

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

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

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

маглобулинемию, первичный билиарный цирроз/аутоиммунную холангиопатию, псориаз, псориатический артрит, феномен Рейно, синдром Рейтера/реактивный артрит, рестеноз, ревматическую лихорадку, ревматическое заболевание, саркоидоз, синдром Шмидта, склеродермию, синдром Сьоргена, синдром жесткого человека, системную красную волчанку (SLE), системную склеродермию, артерит Такаюсу, височный артериит/гигантский клеточный артериит, тиреоидит, диабет 1 типа, язвенный колит, увеит, васкулит, витилиго, интерстициальное заболевание кишечника или гранулематоз Вегенера. В некоторых воплощениях воспалительное или аутоиммунное заболевание выбрано из интерстициального заболевания кишечника, трансплантации, болезни Крона, язвенного колита, рассеянного склероза, астмы, ревматоидного артрита и псориаза.

В некоторых воплощениях фармацевтической композиция вводится для того, чтобы модулировать аутоиммунное состояние. Например, подавление иммунного ответа может быть полезным в способах ингибирования отторжения трансплантата ткани, клетки или органа от донора реципиентом. Соответственно, в некоторых воплощениях фармацевтические композиции, описанные в данном документе, используются для ограничения или предотвращения связанных с трансплантатом или связанных с трансплантацией заболеваний или расстройств, таких как болезнь трансплантат против хозяина (GVHD). В некоторых воплощениях фармацевтические композиции используются для подавления аутоиммунного отторжения трансплантированного или привитого костного мозга, органов, кожи, мышц, нейронов, островков или паренхиматозных клеток.

Фармацевтические композиции, включающие сконструированные клетки и способы, описанные в данном документе, могут быть использованы в приложениях адоптивного переноса клеток. В некоторых воплощениях клеточные композиции, содержащие сконструированные клетки, могут быть использованы в связанных способах, например, для модуляции иммунологической активности в иммунотерапевтическом подходе для лечения, например, онкологических заболеваний млекопитающих или в других воплощениях для лечения аутоиммунных расстройств. Используемые способы обычно включают способ контакта T1P по настоящему изобретению с клеткой млекопитающего в условиях, которые разрешают специфическое связывание домена IgSF с модифицированной аффинностью и модуляцию иммунологической активности клетки млекопитающего. В некоторых воплощениях иммунные клетки (такие как инфильтрирующие опухоли лимфоциты (TIL), Т-клетки (включая CD8 + или CD4 + Т-клетки) или APC) сконструированы для экспрессии в виде мембранного белка и/или в виде растворимого полипептида ICOSL, иммуномодулирующего белка или конъюгата, как описано в данном документе. Затем сконструированные клетки могут контактировать с клеткой млекопитающего, такой как APC, второй лимфоцит или опухолевая клетка, в которой желательна модуляция иммунологической активности и в условиях, которые разрешают специфическое связывание домена IgSF с модифицированной аффинностью с контрструктурой на клетке млекопитающего, так что иммунологическая активность может модулироваться в клетке млекопитающего. Клетки могут контактировать *in vivo* или *ex vivo*.

В некоторых воплощениях сконструированные клетки являются аутологичными клетками. В других воплощениях клетки являются аллогенными. В некоторых воплощениях клетки представляют собой аутологичные модифицированные клетки, повторно вводимые в организм млекопитающего, из которого он был выделен. В некоторых воплощениях клетки представляют собой аллогенные сконструированные клетки, введенные в млекопитающее. В некоторых воплощениях клетки собирают из крови или опухоли пациента, конструируют для экспрессии полипептида (такого как вариантный полипептид ICOSL, иммуномодулирующий белок или конъюгат, как описано в данном документе), размножают в системе культивирования *in vitro* (например, посредством стимуляции клетки) и повторно вводят пациенту для опосредованного разрушения опухоли. В некоторых воплощениях способы проводят с помощью адоптивного переноса клеток, в которой клетки, экспрессирующие T1P (например, Т-клетки), вводятся обратно пациенту. В некоторых воплощениях способы по изобретению используются для лечения пациентов-млекопитающих со злокачественным новообразованием, таким как лимфома, лимфоидный лейкоз, миелоидный лейкоз, рак шейки матки, нейробластома или множественная миелома.

VIII. Примерные воплощения.

Среди предлагаемых воплощений.

1. Полипептид вариантного лиганда ICOS (ICOSL), включающий домен IgV или его специфический связывающий фрагмент, домен IgC или его специфический связывающий фрагмент, или и то, и другое, отличающийся тем, что вариантный полипептид ICOSL включает одну или несколько аминокислотных модификаций в немодифицированном ICOSL или специфическом связывающем фрагменте, соответствующих положению(ям), выбранным из 10, 11, 13, 16, 18, 20, 25, 27, 30, 33, 37, 38, 42, 43, 47, 52, 54, 57, 61, 62, 67, 71, 72, 74, 75, 77, 78, 80, 84, 89, 90, 92, 93, 94, 96, 97, 98, 99, 100, 102, 111, 113, 115, 116, 117, 119, 120, 121, 122, 126, 129, 130, 132, 133, 135, 138, 139, 140, 142, 143, 144, 153, 154, 155, 156, 158, 161, 164, 166, 168, 172, 173, 175, 190, 192, 193, 194, 198, 201, 203, 207, 208, 210, 212, 217, 220, 221, 224, 225 или 227 относительно SEQ ID NO: 32.

2. Вариантный полипептид ICOSL по воплощению 1, где немодифицированный ICOSL представляет собой ICOSL млекопитающих или его специфический связывающий фрагмент.

3. Вариантный полипептид ICOSL по воплощению 2, где немодифицированный ICOSL представля-

ет собой ICOSL человека или его специфический связывающий фрагмент.

4. Вариантный полипептид ICOSL по любому из воплощений 1-3, где немодифицированный ICOSL включает (i) аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 32, (ii) аминокислотную последовательность, которая имеет, по меньшей мере, 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 32; или (iii) ее часть, содержащую домен IgV или домен IgC или их специфические связывающие фрагменты или и то, и другое.

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

специфический связывающий фрагмент домена IgV или домена IgC имеет длину, по меньшей мере, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110 или более аминокислот; или

специфический связывающий фрагмент домена IgV имеет длину, которая составляет, по меньшей мере, 80% длины домена IgV, заданного как аминокислоты 19-129 в SEQ ID NO: 5, и/или специфический связывающий фрагмент домена IgC имеет длину, которая составляет, по меньшей мере, 80% длины домена IgC, заданного как аминокислоты 141-227 в SEQ ID NO: 5.

6. Вариантный полипептид ICOSL по любому из воплощений 1-5, где вариант ICOSL включает до 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 аминокислотных модификаций, необязательно, аминокислотных замен, вставок и/или делеций.

7. Вариантный ICOSL по любому из воплощений 1-6, где вариант ICOSL включает аминокислотную последовательность, которая имеет, по меньшей мере, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичности с последовательностью SEQ ID NO: 32 или их специфическим связывающим фрагментом.

8. Вариантный полипептид ICOSL по любому из воплощений 1-7, где вариант полипептид ICOSL демонстрирует измененное связывание с эктодоменом ICOS, CD28 или CTLA-4 по сравнению с немодифицированным ICOSL.

9. Вариантный полипептид ICOSL по любому из воплощений 1-8, где вариант полипептид ICOSL демонстрирует измененное связывание с эктодоменом ICOS или CD28 по сравнению с немодифицированным ICOSL.

10. Вариантный полипептид ICOSL по воплощению 8 или воплощению 9, где измененное связывание представляет собой измененную аффинность связывания и/или измененную селективность связывания.

11. Вариантный полипептид ICOSL по любому из воплощений 1-10, где одна или несколько аминокислотных модификаций выбраны из M10V, M10I, V11E, S13G, E16V, S18R, A20V, S25G, F27S, F27C, N30D, Y33del, Q37R, K42E, T43A, Y47H, N52H, N52D, N52Q, N52S, N52Y, N52K, S54A, S54P, N57D, N57Y, R61S, R61C, Y62F, L67P, A71T, G72R, L74Q, R75Q, D77G, F78L, L80P, N84Q, E90A, K92R, F93L, H94E, H94D, L96F, L96I, V97A, L98F, S99G, Q100R, Q100K, Q100P, L102R, G103E, V107A, V107I, S109G, S109N, V110D, V110N, V110A, E111del, T113E, H115Q, H115R, V116A, A117T, N119Q, F120I, F120S, S121G, V122A, V122M, S126T, S126R, H129P, S130G, S132F, Q133H, E135K, F138L, T139S, C140del, S142F, I143V, I143T, N144D, Y146C, V151A, Y152C, Y152H, W153R, I154F, N155H, N155Q, K156M, D158G, L161P, L161M, L166Q, N168Q, F172S, L173S, M175T, T190A, T190S, S192G, V193M, N194D, C198R, N201S, L203P, L203F, N207Q, L208P, V210A, S212G, D217V, I218T, I218N, E220G, R221G, R221I, I224V, T225A, N227K или их консервативной аминокислотной замены.

12. Вариантный полипептид ICOSL по любому из воплощений 1-11, где одна или несколько аминокислотных модификаций выбраны из числа N52Y/N57Y/F138L/L203P, N52H/N57Y/Q100P, N52S/Y146C/Y152C, N52H/C198R, N52H/C140D/T225A, N52H/C198R/T225A, N52H/K92R, N52H/S99G, N57Y/Q100P, N52S/S130G/Y152C, N52S/Y152C, N52S/C198R, N52Y/N57Y/Y152C, N52Y/N57Y/H129P/C198R, N52H/L161P/C198R, N52S/T113E, N52D/S54P, N52K/L208P, N52S/Y152H, N52D/V151A, N52H/I143T, N52S/L80P, F120S/Y152H/N201S, N52S/R75Q/L203P, N52S/D158G, N52D/Q133H, N52S/N57Y/H94D/L96F/L98F/Q100R, N52S/N57Y/H94D/L96F/L98F/Q100R/G103E/F120S, N52H/F78L/Q100R, N52H/N57Y/Q100R/V110D, N52H/N57Y/R75Q/Q100R/V110D, N52H/N57Y/Q100R, N52H/N57Y/L74Q/Q100R/V110D, N52H/Q100R, N52H/S121G, A20V/N52H/N57Y/Q100R/S109G, N52H/N57Y/R61S/Q100R/V110D/L173S, N52H/N57Y/Q100R/V122A, N52H/N57Y/Q100R/F172S, N52H/N57Y, N52S/F120S, N52S/V97A, N52S/G72R, N52S/A71T/A117T, N52S/E220G, Y47H/N52S/V107A/F120S, N52H/N57Y/Q100R/V110D/S132F/M175T, E16V/N52H/N57Y/Q100R/V110D/H115R/Y152C/K156M/C198R, Q37R/N52H/N57Y/Q100R/V110N/S142F/C198R/D217V/R221G, N52H/N57Y/Q100R/V110D/V116A/L161M/F172S/S192G/C198R, N52S/H94E/L96I/S109N/L166Q, S18R/N52S/F93L/I143V/R221G, A20T/N52D/Y146C/Q164L, V11E/N30D/N52H/N57Y/H94E/L96I/L98F/N194D/V210A/I218T, N52S/H94E/L96I/V122M, N52H/N57Y/H94E/L96I/F120I/S126T/W153R/I218N, M10V/S18R/N30D/N52S/S126R/T139S/L203F, S25G/N30D/N52S/F120S/N227K, N30D/N52S/L67P/Q100K/D217G/R221K/T225S, N52H/N57Y/Q100R/V110D/A117T/T190S/C198R, N52H/N57Y/Q100R/V110D/F172S/C198R, S25G/F27C/N52H/N57Y/Q100R/V110D/E135K/L173S/C198R, N52H/N57Y/V110A/C198R/R221I, M10I/S13G/N52H/N57Y/D77G/V110A/H129P/I143V/F172S/V193M, C198R,

N52H/N57Y/R61C/Y62F/Q100R/V110N/F120S/C198R, N52H/N57Y/Q100R/V110D/H115R/C198R,
 N52H/N57Y/Q100R/V110D/N144D/F172S/C198R, N52S/H94E/L98F/Q100R, N52S/E90A,
 N30D/K42E/N52S, N52S/F120S/I143V/I224V, N52H/N57Y/Q100R/V110D/C198R/S212G,
 N52H/N57Y/Q100R/C198R, N52S/N194D, N52H/N57Y/Q100R/L102R/V110D/H115R/C198R,
 N52H/N57Y/Q100R/V110D/C198R/S212G, N52H/N57Y/Q100R/C198R, N52S/N194D,
 N52H/N57Y/Q100R/L102R/V110D/H115R/C198R, N52S/S54P, T38P/N52S/N57D, E111del, Y33del,
 N52H/C140del/T225A, N52H/F78L/Q100R/C198R, N52H/N57Y/R75Q/Q100P/V110D,
 N52H/N57Y/L74Q/V110D/S192G, N52H/S121G/C198R, N52S/F120S/N227K,
 N52S/A71T/A117T/T190A/C198R, T43A/N52H/N57Y/L74Q/D89G/V110D/F172S,
 N52H/N57Y/Q100R/V110D/S132F/M175T, N52D, N52H/N57Y/Q100R/V107I/V110D/I154F/C198R/R221G,
 N52Q/N207Q, N168Q/N207Q, N52Q/N168Q, N155Q/N207Q, N119Q/N168Q, N119Q/N207Q,
 N119Q/N155Q, N52Q/N84Q, N52Q/N119Q, N84Q/N119Q, N52Q/N84Q/N168Q, N52Q/N84Q/N207Q,
 N84Q/N155Q/N168Q, N84Q/N168Q/N207Q, N84Q/N155H/N207Q, N155Q/N168Q/N207Q,
 N119Q/N155Q/N168Q, N119Q/N168Q/N207Q, N84Q/N119Q/N207Q, N119Q/N155H/N207Q,
 N84Q/N119Q/N155Q, N52Q/N119Q/N155Q, N52H/N84Q/N119Q, N52H/N84Q, N52H/N84Q/N168Q,
 N52H/N84Q/N207Q, N52H/N84Q/N168Q/N207Q, N52Q/N84Q/N155Q, N52Q/N84Q/N168Q,
 N52Q/N84Q/N155Q/N168Q, N52Q/N84Q/N119Q/N168Q, N84Q/N119Q/N155Q/N168Q,
 N84Q/N155Q/N168Q/N207Q, N84Q/N119Q/N155Q/N207Q, N52Q/N84Q/N119Q/N207Q,
 N52Q/N84Q/N119Q/N155Q, N52Q/N84Q/N119Q/N155Q/N207Q, N84Q/N119Q/N155Q/N168Q/N207Q,
 F138L/L203P, N52Y/F138L/L203P, N57Y/Q100R/C198R, N57Y/F138L/L203P, Q100R/F138L,
 N52H/N57Y/Q100R/H115R/C198R, N52H/N57Y/Q100R/F172S/C198R,
 N52H/N57Y/Q100R/H115R/F172S/C198R, N52H/N57Y/Q100R/H115R/I143V/F172S/C198R,
 N52H/N57Y/Q100R/L102R/H115R/F172S/C198R, N52H/V122A/F172S/C198R,
 N52H/N57Y/Q100R/H115R/F172S/N194D, N52H/N57Y/H115R/F172S/C198R,
 N52H/N57Y/Q100R/H115R/C198R, N52H/N57Y/H115R, N52H/N57Y/Q100R/H115R,
 N52H/N57Y/Q100R/H115R/F172S/I224V, N52H/N57Y/Q100R/H115R/F172S, N52H/N57Y/Q100R/F172S,
 N52H/Q100R/H115R/I143T/F172S, N52H/N57Y/Q100P/H115R/F172S, N52Y/N57Y/Q100P/F172S,
 E16V/N52H/N57Y/Q100R/V110D/H115R/C198R,
 E16V/N52H/N57Y/Q100R/V110D/H115R/Y152C/K156M/F172S/C198R, N52S/E90A/H115R, N30D/K42E
 N52S/H115R, N30D/K42E/N52S/H115R/C198R/R221I, N30D/K42E/N52S/H115R/C198R,
 N30D/K42E/N52S/H115R/F172S/N194D, N52S/H115R/F120S/I143V/C198R, N52S/H115R/F172S/C198R,
 N52H/N57Y/Q100P/C198R, N52H/N57Y/Q100P H115R/F172S/C198R, N52H/N57Y/Q100P/F172S/C198R,
 N52H/N57Y/Q100P/H115R, N52H/N57Y/Q100P/H115R/C198R, N52H/Q100R/C198R,
 N52H/Q100R/H115R/F172S, N52H/Q100R/F172S/C198R, N52H/Q100R/H115R/F172S/C198R или
 N52H/N57Y/Q100R/F172S/C198R.

13. Вариантный полипептид ICOSL по любому из воплощений 1-12, где одна или несколько аминокислотных модификаций соответствуют положению(ям), выбранным из 52, 57, 100, 110 или 198.

14. Вариантный полипептид ICOSL по любому из воплощений 1-13, где одна или несколько аминокислотных модификаций выбраны из N52H, N52D, N52Q, N52S, N52K, S54A, S54P, N57Y, Q100P, Q100R, V110A, V110D, C198R или их консервативной аминокислотной замены.

15. Вариантный полипептид ICOSL по любому из воплощений 1-14, дополнительно содержащий одну или несколько аминокислотных модификаций, выбранных из V11E, E16V, N30D, K42E, N52H, N52S, N52Y, N57Y, E90A, H94E, L96I, L98F, Q100R, Q100P, V110A, V110D, H115R, F120S, V122A, F138L, I143V, K156M, K156R, F172S, N194D, C198R, L203P, V210A, R221I, I224V или их консервативной аминокислотной замены.

16. Вариантный полипептид ICOSL по любому из воплощений 1-14, где одна или несколько аминокислотных модификаций являются N52H/N57Y/Q100R/C198R, N52H/N57Y/Q100R/V122A, N52H/N57Y/Q100R/F172S, N52Y/N57Y/F138L/L203P, V11E/N30D/N52H/N57Y/H94E/L96I/L98F/N194D/V210A/I218T, N52H/N57Y/Q100R/L102R/V110D/H115R/C198R, N52H/N57Y/Q100R, N52H/Q100R, N52H/N57Y/Q100R/V110D/C198R/S212G, E16V/N52H/N57Y/Q100R/V110D/H115R/V152C/K156M/C198R, N30D/K42E/N52S, N52S/F120S/I143V/I224V, N52S/E90A, N52H/N57Y/V110A/C198R/R221I, N52H/N57Y/Q100P или N52S/N194D.

17. Вариантный полипептид ICOSL по любому из воплощений 1-16, где вариантный полипептид ICOSL включает домен IgV или его специфический фрагмент и домен IgC или его специфический фрагмент.

18. Вариантный полипептид ICOSL по любому из воплощений 1-17, включающий аминокислотную последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO: 109-142, 239, 280-325, 364-381, 387-424, 427-433, 435-470 или его специфический связывающий фрагмент или аминокислотную последовательность, которая имеет, по меньшей мере, 95% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 109-142, 239, 280-325, 364-381, 387-424, 427-433, 435-470 или его специфическим связывающим фраг-

ментом и который включает одну или несколько аминокислотных замен.

19. Вариантный полипептид ICOSL по любому из воплощений 1-18, где вариантный полипептид ICOSL включает домен IgV или его специфический связывающий фрагмент.

20. Вариантный полипептид ICOSL по любому из воплощений 1-19, где домен IgV или его специфический связывающий фрагмент является единственной частью ICOSL вариантного полипептида ICOSL.

21. Вариантный полипептид ICOSL по любому из воплощений 1-18, где домен IgC или его специфический связывающий фрагмент является единственной частью ICOSL вариантного полипептида ICOSL.

22. Вариантный полипептид ICOSL по любому из воплощений 1-20, включающий аминокислотную последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO: 197-199, 201-208, 210, 212, 240, 326-340, 382-386, 425-426 и 434 или его специфический связывающий фрагмент, аминокислотная последовательность, которая имеет, по меньшей мере, 95% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 197-199, 201-208, 210, 212, 240, 326-340, 382-386, 425-426 и 434 или его специфическим связывающим фрагментом и который включает одну или несколько аминокислотных замен.

23. Вариантный полипептид ICOSL по любому из воплощений 1-22, где вариантный полипептид ICOSL специфически связывается с эктодоменом ICOS, CD28 или CTLA-4 с повышенной аффинностью по сравнению с немодифицированным ICOSL.

24. Вариантный полипептид ICOSL по любому из воплощений 1-23, где вариантный полипептид ICOSL специфически связывается с эктодоменом ICOS или CD28 с повышенной аффинностью по сравнению с немодифицированным ICOSL.

25. Вариантный полипептид ICOSL по любому из воплощений 1-24, где вариантный полипептид ICOSL специфически связывается с эктодоменом ICOS и эктодоменом CD28 каждый с повышенной аффинностью по сравнению с немодифицированным ICOSL.

26. Вариантный полипептид ICOSL по любому из воплощений 1-24, где вариантный полипептид ICOSL специфически связывается с эктодоменом CD28 с повышенной аффинностью по сравнению с немодифицированным ICOSL.

27. Вариантный полипептид ICOSL по любому из воплощений 1-26, где повышенная аффинность к эктодомену CD28 увеличивается более чем в 1,2, в 1,5, в 2, в 3, в 4, в 5, в 6, в 7, в 8, в 9, в 10, в 20, в 30, в 40, в 50 или в 60 раз по сравнению с немодифицированным ICOSL.

28. Вариантный полипептид ICOSL по любому из воплощений 1-24, где вариантный полипептид ICOSL специфически связывается с эктодоменом ICOS с повышенной аффинностью по сравнению с немодифицированным ICOSL.

29. Вариантный полипептид ICOSL по любому из воплощений 1-25 и 28, где повышенная аффинность к эктодомену ICOS увеличивается более чем в 1,2, в 1,5, в 2, в 3, в 4, в 5, в 6, в 7, в 8, в 9, в 10, в 20, в 40, в 50, в 60 или в 70 раз по сравнению с немодифицированным ICOSL.

30. Вариантный полипептид ICOSL по любому из воплощений 1-29, где одна или несколько аминокислотных модификаций соответствуют положению(ям), выбранному из 52, 54 или 57.

31. Вариантный полипептид ICOSL по любому из воплощений 1-30, где одна или несколько аминокислотных модификаций выбраны из N52H, N52D, N52S, N52Y, N52K, S54A, S54P, N57Y или их консервативной аминокислотной замены.

32. Вариантный полипептид ICOSL по любому из воплощений 1-31, где одна или несколько аминокислотных модификаций соответствуют положению(ям), выбранным из 52 или 57.

33. Вариантный полипептид ICOSL по любому из воплощений 1-31, где один или несколько аминокислотных модификаций выбирают из N52H, N52D, N52S, N52K или N57Y.

34. Вариантный полипептид ICOSL по любому из воплощений 25-29 и воплощению 33, дополнительно включающий одну или несколько аминокислотных модификаций, выбранных из N52H, N52D, N52S, N52Y, N52K, S54A, S54P, N57Y, R75Q, L80P, K92R, S99G, H94D, L96F, L98F, S99G, Q100R, Q100P, G103E, T113E, F120S, H129P, S130G, Q133H, F138L, C140D, C140del, I143T, Y146C, V151A, Y152C, Y152H, D158G, L161P, C198R, N201S, L203P, L208P или T225A, или их консервативной аминокислотной замены.

35. Вариантный полипептид ICOSL по любому из воплощений 1-34, где одна или несколько аминокислотных модификаций выбраны из числа N52Y/N57Y/F138L/L203P, N52H/N57Y/Q100P, N52S/Y146C/Y152C, N52H/C198R, N52H/C140del/T225A, N52H/C198R/T225A, N52H/K92R, N57Y/Q100P, N52S/C198R, N52Y/N57Y/Y152C, N52Y/N57Y/H129P/C198R, N52H/L161P/C198R, N52S/T113E, N52S/S54P, N52K/L208P, N52S/Y152H, N52H/I143T, N52S/R75Q/L203P, N52S/D158G, N52D/Q133H, N52H/N57Y/Q100R/V110D/C198R/S212G, N52H/N57Y/Q100R/C198R, N52S/N194D, N52H/N57Y/Q100R/L102R/V110D/H115R/C198R, N52S/S54P, T38P/N52S/N57D, N52H/C140del/T225A, N52H/F78L/Q100R/C198R, N52H/N57Y/R75Q/Q100P/V110D, N52H/N57Y/L74Q/V110D/S192G, N52H/S121G/C198R, N52S/F120S/N227K, N52S/A71T/A117T/T190A/C198R, T43A/N52H/N57Y/L74Q/D89G/V110D/F172S, N52H/N57Y/Q100R/V110D/S132F/M175T, N52H/N57Y/Q100R/V107I/V110D/I154F/C198R/R221G, N52Q/N207Q, N52Q/N168Q, N52Q/N84Q,

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

36. Вариантный полипептид ICOSL по любому из воплощений 1-35, где одна или несколько аминокислотных модификаций выбраны из N52H/N57Y/F138L/L203P, N52H/N57Y/Q100P, N52H/K92R, N52H/C140del/T225A, N52H/C198R/T225A, N52H/K92R, N57Y/Q100P, N52Y/N57Y/H129P/C198R, N52H/L161P/C198R, N52K/L208P или N52H/I143T.

37. Вариантный полипептид ICOSL по любому из воплощений 1-34, где одна или несколько аминокислотных замен выбраны из N57Y/Q100P, N52S/S130G/Y152C, N52S/Y152C, N52Y/N57Y/Y152C, N52H/L161P/C198R, N52H/L161P/C198R, N52S/L80P, A20V/N52H/N57Y/Q100R/S109G, N52H/N57Y/R61S/Q100R/V110D/L173S, N52H/N57Y/Q100R/V107I/V110D/S132F/I154F/C198R/R221G, Q37R/N52H/N57Y/Q100R/V110N/S142F/C198R/D217V/R221G, N52H/N57Y/Q100R/V110D/C198R, F27S/N52H/N57Y/V110N, S18R/N52S/F93L/I143V/R221G, A20T/N52D/Y146C/Q164L, N52H/N57Y/H94E/L96I/F120I/S126T/W153R/I218N, N52H/N57Y/Q100R/V110D/F172S/C198R, S25G/F27C/N52H/N57Y/Q100R/V110D/E135K/L173S/C198R или M10I/S13G/N52H/N57Y/D77G/V110A/H129P/I143V/F172S/V193M/C198R.

38. Вариантный полипептид ICOSL по любому из воплощений 1-37, где вариантный полипептид специфически связывается с эктодоменом ICOS, CD28 или CTLA4 с повышенной селективностью по сравнению с немодифицированным ICOSL.

39. Вариантный полипептид ICOSL по воплощению 38, где повышенная селективность включает большее отношение связывания вариантного полипептида к одному когнатному партнеру связывания, выбранному из ICOS, CD28 и CTLA4, относительно другого когнатного партнера связывания по сравнению с отношением связывания немодифицированного полипептида ICOSL к одному когнатному партнеру относительно другого когнатного партнера связывания.

40. Вариантный полипептид ICOSL по воплощению 39, в котором отношение больше, по меньшей мере, или, по меньшей мере, около в 1,5, в 2,0, в 3,0, в 4, в 5, в 10, в 15, в 20, в 30, в 40, в 50 раз или более.

41. Вариантный полипептид ICOSL по любому из воплощений 1-40, где вариантный полипептид ICOSL специфически связывается с эктодоменом ICOS или CD28 с повышенной аффинностью и специфически связывается с эктодоменом другого ICOS или CD28 с уменьшенной аффинностью по сравнению с немодифицированным ICOSL.

42. Вариантный полипептид ICOSL по воплощению 41, где вариантный полипептид ICOSL специфически связывается с эктодоменом ICOS с повышенной аффинностью и специфически связывается с эктодоменом CD28 с пониженной аффинностью по сравнению с немодифицированным ICOSL.

43. Вариантный полипептид ICOSL по воплощению 41, где вариантный полипептид ICOSL специфически связывается с эктодоменом CD28 с повышенной аффинностью и специфически связывается с эктодоменом ICOS с пониженной аффинностью по сравнению с немодифицированным ICOSL.

44. Вариантный полипептид ICOSL по любому из воплощений 1-43, включающий аминокислотные замены N52S/R75Q/L203P или N30D/K42E/N52S.

45. Вариантный полипептид ICOSL по любому из воплощений 1-40, где вариантный полипептид ICOSL специфически связывается с эктодоменом CTLA-4 с повышенной аффинностью по сравнению с немодифицированным ICOSL.

46. Вариантный полипептид ICOSL по воплощению 45, где повышенная аффинность к эктодомену CTLA-4 увеличивается более чем в 1,2, в 1,5, в 2, в 3, в 4, в 5, в 6, в 7, в 8, в 9, в 10, в 20, в 40, в 50, в 60 или в 70 раз по сравнению с немодифицированным ICOSL.

47. Вариантный полипептид ICOSL по любому из воплощений 8-46, где ICOS представляет собой ICOS человека.

48. Вариантный полипептид ICOSL по любому из воплощений 8-47, где CD28 представляет собой CD28 человека.

49. Вариантный полипептид ICOSL по любому из воплощений 1-48, где связывание изменено (увеличено или уменьшено) более чем в 1,2, в 1,5, в 2, в 3, в 4, в 5, в 6, в 7, в 8, в 9, в 10, в 20, в 40 или в 50 раз по сравнению с немодифицированным ICOSL.

50. Вариантный полипептид ICOSL по любому из воплощений 1-49, который является растворимым белком.

51. Вариантный полипептид ICOSL по любому из воплощений 1-50, который связан с доменом мультимеризации.

52. Вариантный полипептид ICOSL по любому из воплощений 1-51, где вариантный полипептид ICOSL представляет собой мультимерный полипептид, необязательно димерный полипептид, содержащий первый вариантный полипептид ICOSL, связанный с доменом мультимеризации, и второй вариантный полипептид ICOSL, связанный с доменом мультимеризации.

53. Вариантный полипептид ICOSL по воплощению 52, где первый вариантный полипептид ICOSL и второй вариантный полипептид ICOSL являются одинаковыми или разными.

54. Вариантный полипептид ICOSL по любому из воплощений 51-53, где домен мультимеризации является доменом Fc или его вариантом с уменьшенной эффекторной функцией.

55. Вариантный полипептид ICOSL по любому из воплощений 1-54, который связан с фрагментом, который увеличивает биологический период полувыведения полипептида.

56. Вариантный полипептид ICOSL по любому из воплощений 1-55, который связан с доменом Fc или его вариантом с пониженной эффекторной функцией.

57. Вариантный полипептид ICOSL по любому из воплощений 54-56, где: домен Fc представляет собой млекопитающее, необязательно человека; или вариантный домен Fc включает одну или несколько аминокислотных модификаций по сравнению с доменом с модифицированным Fc, который является млекопитающим, необязательно человеком.

58. Вариантный полипептид ICOSL по любому из воплощений 54, 56 и 57, где домен Fc или его вариант включает аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 226 или SEQ ID NO: 227, или аминокислотную последовательность, которая имеет, по меньшей мере, 85% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 226 или SEQ ID NO: 227.

59. Вариантный полипептид ICOSL по любому из воплощений 54 и 56-58, где домен Fc включает одну или несколько аминокислотных модификаций, выбранных из E233P, L234A, L234V, L235A, L235E, G236del, G237A, S267K, R292C, N297G и V302C, каждая в соответствии с нумерацией EU.

60. Вариантный полипептид ICOSL по любому из воплощений 54 и 56-59, где домен Fc включает аминокислотную модификацию C220S в соответствии с нумерацией EU.

61. Вариантный полипептид ICOSL по любому из воплощений 54 и 56-60, где домен Fc включает аминокислотную последовательность, изложенную в любом из SEQ ID NO: 474, 476, 477, 478 или аминокислотную последовательность, которая проявляет, по меньшей мере, 85% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 474, 476, 477, 478 и проявляет сниженную эффекторную функцию.

62. Вариантный полипептид ICOSL по любому из воплощений 51-61, где вариантный полипептид ICOSL связан с доменом мультимеризации или доменом Fc косвенно через линкер, необязательно линкер G4S.

63. Вариантный полипептид ICOSL по любому из воплощений 1-49, который представляет собой трансмембранный иммуномодулирующий белок, дополнительно содержащий трансмембранный домен, связанный с внеклеточным доменом (ECD) или его специфическим связывающий фрагмент из вариантного полипептида ICOSL.

64. Вариантный полипептид ICOSL по воплощению 63, в котором трансмембранный домен включает аминокислотную последовательность, обозначенную как остатки 257-277 из SEQ ID NO: 5, или его функциональный вариант, который имеет, по меньшей мере, 85% идентичности последовательности с остатками 257-277 из SEQ ID NO: 5.

65. Вариантный полипептид ICOSL по воплощению 63 или воплощению 64, дополнительно содержащий цитоплазматический сигнальный домен, связанный с трансмембранным доменом.

66. Вариантный полипептид ICOSL по воплощению 65, в котором цитоплазматический сигнальный домен включает аминокислотную последовательность, обозначенную как остатки 278-302 из SEQ ID NO: 5, или их функциональный вариант, который имеет, по меньшей мере, 85% идентичности последовательности с остатками 278-302 из SEQ ID NO: 5.

67. Вариантный полипептид ICOSL по любому из воплощений 63-66, включающий аминокислотную последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO: 494-503, или аминокислотную последовательность, которая имеет, по меньшей мере, 85% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 494-503.

68. Вариантный полипептид ICOSL по любому из воплощений 1-67, где вариантный ICOSL увеличивает экспрессию IFN-гамма (интерферон-гамма) относительно немодифицированного ICOSL в анализе первичных Т-клеток in vitro.

69. Вариантный полипептид ICOSL по любому из воплощений 1-68, где вариантный ICOSL уменьшает экспрессию IFN-гамма (интерферон-гамма) относительно немодифицированного ICOSL в анализе первичных Т-клеток *in vitro*.

70. Вариантный полипептид ICOSL по любому из воплощений 1-51, который является дегликозилированным.

71. Иммуномодулирующий белок, включающий вариантный полипептид ICOSL по любому из воплощений 1-70, связанного со вторым полипептидом, содержащим домен суперсемейства иммуноглобулинов (IgSF).

72. Иммуномодулирующий белок по воплощению 71, где домен IgSF имеет модифицированную аффинность и имеет измененное связывание с одним или несколькими его когнатными партнерами связывания по сравнению с немодифицированным доменом IgSF или доменом IgSF дикого типа.

73. Иммуномодулирующий полипептид по воплощению 72, где домен IgSF проявляет повышенное связывание с одним или несколькими его когнатными партнерами связывания по сравнению с немодифицированным доменом IgSF или доменом IgSF дикого типа.

74. Иммуномодулирующий полипептид по любому из воплощений 71-73, где вариантный полипептид ICOSL представляет собой первый вариантный полипептид ICOSL, а домен IgSF второго полипептида представляет собой домен IgSF из второго вариантного полипептида ICOSL по любому из воплощений 1-70, где первый и второй варианты ICOSL являются одинаковыми или разными.

75. Иммуномодулирующий белок по любому из воплощений 71-74, где вариантный полипептид ICOSL способен специфически связываться с CD28 или ICOS, а домен IgSF второго полипептида способен связываться с когнатным партнером связывания, отличным от партнера связывания, специфически связанного вариантным полипептидом ICOSL.

76. Иммуномодулирующий полипептид по воплощению 75, где домен IgSF является представителем семейства B7.

77. Иммуномодулирующий полипептид по любому из воплощений 71-73 и 75, где домен IgSF представляет собой фрагмент, локализуемый в опухоли, который связывается с лигандом, экспрессируемым на опухоли.

78. Иммуномодулирующий полипептид по воплощению 77, где лиганд представляет собой B7H6.

79. Иммуномодулирующий полипептид по воплощению 77 или воплощению 78, где домен IgSF находится из NKp30.

80. Иммуномодулирующий полипептид по любому из воплощений 71-79, где домен IgSF является или включает домен IgV.

81. Иммуномодулирующий полипептид по любому из воплощений 71-80, где вариантный полипептид ICOSL представляет собой или включает домен IgV.

82. Иммуномодулирующий белок по любому из воплощений 71-81, где иммуномодулирующий белок включает домен мультимеризации, связанный с одним или обоими вариантами полипептидами ICOSL или вторым полипептидом, содержащим домен IgSF.

83. Иммуномодулирующий белок по воплощению 82, где домен мультимеризации является доменом Fc или его вариантом с уменьшенной эффекторной функцией.

84. Иммуномодулирующий белок по любому из воплощений 71-83, который является димерным.

85. Иммуномодулирующий белок по воплощению 84, который является гомодимерным.

86. Иммуномодулирующий белок по воплощению 84, который является гетеродимерным.

87. Конъюгат, содержащий вариантный полипептид ICOSL по любому из воплощений 1-70 или иммуномодулирующий полипептид по любому из воплощений 71-86, связанный с фрагментом.

88. Конъюгат по воплощению 87, в котором фрагмент представляет собой нацеливающий фрагмент, который специфически связывается с молекулой на поверхности клетки.

89. Конъюгат по воплощению 88, где нацеливающий фрагмент специфически связывается с молекулой на поверхности иммунной клетки.

90. Конъюгат по воплощению 89, где иммунная клетка представляет собой антигенпредставляющую клетку или лимфоцит.

91. Конъюгат по воплощению 88, где нацеливающий фрагмент представляет собой локализуемый в опухоли фрагмент, который связывается с молекулой на поверхности опухоли.

92. Конъюгат по любому из воплощений 87-91, где фрагмент представляет собой белок, пептид, нуклеиновую кислоту, небольшую молекулу или наночастицу.

93. Конъюгат по любому из воплощений 87-92, где фрагмент представляет собой антитело или антигенсвязывающий фрагмент.

94. Конъюгат по любому из воплощений 87-93, где конъюгат является двухвалентным, четырехвалентным, шестивалентным или восьмивалентным.

95. Молекула(ы) нуклеиновой кислоты, кодирующей вариантный полипептид ICOSL по любому из воплощений 1-70 или иммуномодулирующий полипептид по любому из воплощений 71-86.

96. Молекула(ы) нуклеиновой кислоты по воплощению 95, которая представляет собой синтетическую нуклеиновую кислоту.

97. Молекула(ы) нуклеиновой кислоты по воплощению 95 или воплощению 96, которая представляет собой кДНК.
98. Вектор, включающий молекулу(ы) нуклеиновой кислоты по любому из воплощений 95-97.
99. Вектор по воплощению 98, который является экспрессирующим вектором.
100. Вектор по воплощению 98 или по воплощению 99, где вектор представляет собой экспрессирующий вектор млекопитающих или вирусный вектор.
101. Клетка, содержащая вектор по воплощению 102 или по воплощению 103.
102. Клетка по воплощению 101, которая является клеткой млекопитающего.
103. Клетка по воплощению 101 или воплощению 102, которая является человеческой клеткой.
104. Способ получения вариантного полипептида ICOSL или иммуномодулирующего белка, включающий введение молекулы нуклеиновой кислоты по любому из воплощений 95-97 или вектора по любому из воплощений 98-100 в клетку-хозяина в условиях экспрессии белка в клетке.
105. Способ по воплощению 104, дополнительно включающий выделение или очистку вариантного полипептида ICOSL или иммуномодулирующего белка из клетки.
106. Способ конструирования клетки, экспрессирующей вариантный полипептид ICOSL, включающий введение молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей вариантный полипептид ICOSL по любому из воплощений 1-70, или иммуномодулирующий полипептид по любому из воплощений 71-86, в клетку-хозяина в условиях, когда полипептид экспрессируется в клетке.
107. Сконструированная клетка, включающая вариантный полипептид ICOSL по любому из воплощений 1-70, иммуномодулирующий полипептид по любому из воплощений 71-86, молекулу нуклеиновой кислоты по любому из воплощений 95-97 или вектор по любому из воплощений 98-100.
108. Сконструированная клетка по воплощению 107, в которой вариантный полипептид ICOSL или иммуномодулирующий полипептид включает сигнальный пептид.
109. Сконструированная клетка по воплощению 107 или воплощению 108, где вариантный полипептид ICOSL или иммуномодулирующий полипептид не включает трансмембранный домен и/или не экспрессируется на поверхности клетки.
110. Сконструированная клетка по любому из воплощений 107-109, где вариантный полипептид ICOSL или иммуномодулирующий полипептид секретируется из сконструированной клетки.
111. Сконструированная клетка по воплощению 107 или воплощению 108, где сконструированная клетка включает вариантный полипептид ICOSL, который включает трансмембранный домен и/или представляет собой трансмембранный иммуномодулирующий белок по любому из воплощений 63-67.
112. Сконструированная клетка по воплощению 107, по воплощению 108 или воплощению 111, где вариантный полипептид ICOSL экспрессируется на поверхности клетки.
113. Сконструированная клетка по воплощению 67, где клетка является иммунной клеткой.
114. Сконструированная клетка по воплощению 113, в которой иммунная клетка представляет собой антигенпредставляющую клетку (APC) или лимфоцит.
115. Сконструированная клетка по любому из воплощений 107-114, которая является первичной клеткой.
116. Сконструированная клетка по любому из воплощений 107-115, где клетка представляет собой клетку млекопитающего.
117. Сконструированная клетка по любому из воплощений 107-116, где клетка представляет собой человеческую клетку.
118. Сконструированная клетка по любому из воплощений 107-117, где лимфоцит представляет собой Т-клетку.
119. Сконструированная клетка по воплощению 114, где APC является искусственным APC.
120. Сконструированная клетка по любому из воплощений 107-119, дополнительно содержащая химерный антигенный рецептор (CAR) или сконструированный Т-клеточный рецептор.
121. Инфекционный агент, содержащий нуклеотидную молекулу, кодирующую вариантный полипептид ICOSL по любому из воплощений 1-70 или иммуномодулирующего полипептида по любому из воплощений 71-86.
122. Инфекционный агент по воплощению 121, где кодированный вариантный полипептид ICOSL или иммуномодулирующий полипептид не включает трансмембранный домен и/или не экспрессируется на поверхности клетки, в которой он экспрессируется.
123. Инфекционный агент по воплощению 121 или воплощению 122, где кодируемый вариантный полипептид ICOSL или иммуномодулирующий полипептид секретируется из клетки, в которой он экспрессируется.
124. Инфекционный агент по воплощению 121, где кодируемый вариантный полипептид ICOSL включает трансмембранный домен.
125. Сконструированная клетка по воплощению 107, по воплощению 108 или воплощению 111, где кодируемый вариантный полипептид ICOSL экспрессируется на поверхности клетки, в которой он экспрессируется.
126. Инфекционный агент по любому из воплощений 121-125, где инфекционный агент представля-

ет собой бактерию или вирус.

127. Инфекционный агент по воплощению 126, где вирус является онколитическим вирусом.

128. Инфекционный агент по воплощению 127, где онколитический вирус представляет собой аденовирусы, адено-ассоциированные вирусы, вирусы герпеса, вирус простого герпеса, вирус везикулярного стоматита, реовирус, вирус болезни Ньюкасла, парвовирус, вирус кори, вирус имплантированного стоматита (VSV), вирус Коксаки или вирус коровьей оспы.

129. Инфекционный агент по воплощению 126, где вирус специфически нацелен на дендритные клетки (DC) и/или является тропным к дендритным клеткам.

130. Инфекционный агент по воплощению 129, где вирус представляет собой лентивирусный вектор, который псевдотипирован модифицированным продуктом оболочки вируса Синдбис.

131. Инфекционный агент по любому из воплощений 121-130, дополнительно включающий нуклеотидную молекулу, кодирующую дополнительный генный продукт, который приводит к гибели клетки-мишени или которая может усиливать или стимулировать иммунный ответ.

132. Инфекционный агент по воплощению 131, где дополнительный генный продукт выбирают из противоопухолевого агента, антиметастатического агента, антиангиогенного агента, иммуномодулирующей молекулы, ингибитора иммунного чекпойнта, антитела, цитокина, фактора роста, антигена, продукта цитотоксического гена, проапоптотического генного продукта, продукта антиапоптотического гена, гена деградации клеточной матрицы, генов регенерации тканей или перепрограммирования соматических клеток человека в плюрипотентные.

133. Фармацевтическая композиция, включающая вариантный полипептид ICOSL по любому из воплощений 1-70, иммуномодулирующий белок по любому из воплощений 71-86, конъюгат по любому из воплощений 87-94, сконструированная клетка по любому из воплощений 107-120 или инфекционный агент по любому из воплощений 121-132.

134. Фармацевтическая композиция по воплощению 133, содержащая фармацевтически приемлемый эксципиент.

135. Фармацевтическая композиция по воплощению 123 или 134, где фармацевтическая композиция является стерильной.

136. Изделие, содержащее фармацевтическую композицию по любому из воплощений 133-135 во флаконе.

137. Изделие по воплощению 136, где флакон герметизирован.

138. Набор, содержащий фармацевтическую композицию по любому из воплощений 133-135 и инструкции для применения.

139. Набор, содержащий изделие по воплощению 136 и 137, и инструкции по применению.

140. Способ модуляции иммунного ответа у объекта, включающий введение объекту фармацевтической композиции по любому из воплощений 133-135.

141. Способ модуляции иммунного ответа у объекта, включающий введение сконструированных клеток по любому из воплощений 107-120.

142. Способ по воплощению 141, где сконструированные клетки являются аутологичными объекту.

143. Способ по воплощению 141, где сконструированные клетки являются аллогенными для объекта.

144. Способ по любому из воплощений 140-143, где модуляция иммунного ответа лечит заболевание или состояние у объекта.

145. Способ по любому из воплощений 140-144, где иммунный ответ увеличивается.

146. Способ по любому из воплощений 140, 144 и 145, где объекту вводят иммуномодулирующий белок или конъюгат, содержащий вариантный полипептид ICOSL, связанный с опухоль-локализирующим фрагментом.

147. Способ по воплощению 146, где опухоль-локализирующий фрагмент представляет собой или включает связывающую молекулу, которая распознает опухолевой антиген.

148. Способ по воплощению 147, где связывающая молекула включает антитело или его антиген-связывающий фрагмент или включает домен IgSF дикого типа или его вариант.

149. Способ по любому из воплощений 140 и 144-148, где фармацевтическую композицию, содержащую иммуномодулирующий белок по любому из воплощений 77-86 или конъюгат по любому из воплощений 87-94, вводят объекту.

150. Способ по любому из воплощений 140-145, где сконструированную клетку, содержащую вариантный полипептид ICOSL, который представляет собой трансмембранный иммуномодулирующий белок, вводят объекту и/или сконструированную клетку по 107, 108 и 111-120.

151. Способ по любому из воплощений 140, 144 и 145, где инфекционный агент, кодирующий вариантный полипептид ICOSL, который представляет собой трансмембранный иммуномодулирующий белок, вводят объекту, необязательно в условиях, при которых инфекционный агент инфицирует опухолевую клетку или иммунную клетку, и трансмембранный иммуномодулирующий белок экспрессируется на поверхности инфицированной клетки.

152. Способ по любому из воплощений 150 или воплощения 151, где трансмембранный иммуномо-

дулирующий белок по любому из воплощений 63-70.

153. Способ по любому из воплощений 140-152, где заболевание или состояние являются опухолью или злокачественной опухолью.

154. Способ по любому из воплощений 140-153, где заболевание или состояние выбраны из меланомы, рака легкого, рака мочевого пузыря, гематологической злокачественности, рака печени, рака мозга, рака почки, рака молочной железы, рака поджелудочной железы, колоректального рака, рака селезенки, рака предстательной железы, рака яичка, рака яичника, рака матки, рака желудка, мышечно-скелетного злокачественного новообразования, рака головы и шеи, рака желудочно-кишечного тракта, герминогенного рака или эндокринного и нейроэндокринного рака.

155. Способ по любому из воплощений 140-144, где иммунный ответ уменьшается.

156. Способ по любому из воплощений 140, 144 и 155, где объекту вводится вариантный полипептид ICOSL или иммуномодулирующий белок, который является растворимым.

157. Способ по воплощению 156, где растворимый полипептид или иммуномодулирующий белок представляет собой слитый с Fc белок.

158. Способ по любому из воплощений 140, 144 и 155-157, где фармацевтическая композиция, содержащая вариантный полипептид ICOSL по любому из воплощений 1-62 и 68-70, или иммуномодулирующий белок по любому из воплощений 71-76 и 80-86, вводится объекту.

159. Способ по любому из воплощений 140-144 и 155-157, где сконструированную клетку, содержащую секретируемый полипептид ICOSL, вводят объекту.

160. Способ по любому из воплощений 140-144, 155-157 и 159, где сконструированную клетку по любому из воплощений 107-110 и 113-120 вводят объекту.

161. Способ по любому из воплощений 140, 144 и 155-157 и 159, где инфекционный агент, кодирующий вариантный полипептид ICOSL, который является секретируемым иммуномодулирующим белком, вводят объекту, необязательно в условиях, при которых инфекционный агент инфицирует опухолевую клетку или иммунную клетку и секретируемый иммуномодулирующий белок секретируется из инфицированной клетки.

162. Способ по любому из воплощений 140-144 и 155-161, где заболевание или состояние являются воспалительным или аутоиммунным заболеванием или состоянием.

163. Способ по любому из воплощений 140-144 и 155-162, где заболевание или состояние представляют собой васкулит, ассоциированный с антинейтрофильными цитоплазматическими антителами (ANCA), васкулит, аутоиммунное заболевание кожи, трансплантацию, ревматическую болезнь, воспалительное желудочно-кишечное заболевание, воспалительное заболевание глаз, воспалительное неврологическое заболевание, воспалительное заболевание легкого, воспалительное эндокринное заболевание или аутоиммунное гематологическое заболевание.

164. Способ по воплощению 162 или воплощению 163, где заболевание или состояние выбрано из воспалительного заболевания кишечника, трансплантации, болезни Крона, язвенного колита, рассеянного склероза, астмы, ревматоидного артрита или псориаза.

165. Вариантный полипептид ICOSL по любому из воплощений 1-70, где аминокислотная модификация представляет собой аминокислотную замену, вставку или делецию.

IX. Примеры.

Следующие примеры включены только для иллюстративных целей и не предназначены для ограничения объема изобретения.

Пример 1. Получение мутантных ДНК-конструктов доменов IgSF Пример 1 описывает получение мутантных ДНК-конструктов доменов ICOSL IgSF человека для трансляции и экспрессии на поверхности дрожжей в качестве библиотек дрожжевого дисплея.

A. Вырожденные библиотеки.

Конструкты были получены на основе следующей последовательности внеклеточного домена (ECD) ICOSL человека дикого типа, представленной в SEQ ID NO: 32 (содержащей домен ECD, соответствующий остаткам 19-256, изложенным в учетном номере UniProt No. O75144.2):

DTQEKEVRAMVGSDVELSCACPEGSRFDLNDVYVYWQTSESKTVVTVYHIPQ

NSSLENVDSRYNRALMSPAGMLRGDFSLRLFNVTQPDEQKFHCLVLSQSLGFEVL

SVEVTLHVAANFSPVVSAPHSPSQDELFTFTCSINGYPRPNVYWINKTDNSLLDQAL

QNQDVTFLNMRGLYDVVSVLRIARTPSVNIACCIEENVLLQQNLTVGSQTGNDIGERDKI

TENPVSTGEKNAAT

Для библиотек, которые нацелены на специфические остатки для полной или частичной рандомизации с помощью вырожденных кодонов, кодирующую ДНК из SEQ ID NO: 32 заказали в "Integrated DNA Technologies" (Коралвилл, Айова) в виде набора перекрывающихся олигонуклеотидов до 80 пар оснований (п.о.) в длину. Для получения библиотеки различных вариантов каждого ECD, олигонуклеотиды содержали искомые вырожденные кодоны в искомых положениях аминокислот. Вырожденные кодоны были сгенерированы с использованием алгоритма по URL: rosettadesign.med.unc.edu/SwiftLib/.

В целом, положения для мутации и вырождения кодонов были выбраны из моделей гомологии

(ICOSL) представляющих интерес пар мишень-лиганд, для идентификации контактных остатков лиганда, а также остатков, которые находятся на границе взаимодействия белка. Этот анализ был выполнен с использованием средства просмотра структуры, доступного по адресу URL: spdbv.vital-it.ch).

Следующим шагом при разработке библиотеки было выравнивание последовательностей ICOSL человека, мыши, крысы и обезьяны для идентификации консервативных остатков. Основываясь на этом анализе, консервативные целевые остатки мутировали с помощью вырожденных кодонов, которые только указывали на консервативные аминокислотные изменения плюс остаток дикого типа. Остатки, которые не были консервативны, мутировали более агрессивно, но также включали остатки дикого типа. Во избежание чрезмерного мутагенеза целевого белка были размещены вырожденные кодоны, которые также кодировали остаток дикого типа. По той же причине одновременно мутагенезу были подвержены только вплоть до 20 положений. Эти остатки представляют собой комбинацию контактных остатков и неконтактных остатков области взаимодействия.

Олигонуклеотиды растворяли в стерильной воде, смешивали в эквимольных соотношениях, нагревали до 95°C в течение пяти минут и медленно охлаждали до комнатной температуры для отжига. ECD-специфические олигонуклеотидные праймеры, которые отжигали на начале и конце ECD, соответственно, затем использовали для получения продукта ПЦР. ECD-специфические олигонуклеотиды, которые перекрываются на 40-50 п.о. с модифицированной версией вектора клонирования pBYDS03 (Life Technologies США), за пределами и включая сайты клонирования BamH1 и Kpn1, затем использовали для амплификации 100 мкг продукта ПЦР с предыдущей стадии для получения в общей сложности 5 мкг ДНК. Обе ПЦР проводились с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) с использованием мастер-микса OneTaq 2x PCR (New England Biolabs, США). Второй продукт ПЦР очищали с использованием набора для очистки ПЦР (Qiagen, Германия) и ресуспендировали в стерильной деионизированной воде.

Для приготовления вставок в библиотеку модифицированную версию вектора pBYDS03 дрожжевого дисплея расщепляли рестрикционными ферментами BamH1 и Kpn1 (New England Biolabs, США), очищали большой векторный фрагмент в геле и растворяли в стерильной деионизированной воде. Готовая к электропорации ДНК для следующей стадии была получена путем смешивания 12 мкг библиотеки ДНК с 4 мкг линейаризованного вектора в общем объеме 50 мкл деионизированной и стерильной воды. Альтернативным способом создания целевых библиотек было проведение сайт-направленного мутагенеза (Multisite kit, Agilent, США) целевых ECD с помощью олигонуклеотидов, содержащих вырожденные кодоны. Этот подход был использован для создания суббиблиотек, предназначенных только для мутагенеза конкретных участков целевого белка. В этих случаях суббиблиотеки были перемешаны перед переходом к стадиям отбора. В общем, размеры библиотеки находились в диапазоне от 10E7 до 10E8 клонов, причем суббиблиотеки находились только в диапазоне от 10E4 до 10E5. Для ICOSL были созданы большие библиотеки и суббиблиотеки.

F. Случайные библиотеки.

Случайные библиотеки также были сконструированы для идентификации вариантов ECD из ICOSL, представленного в SEQ ID NO: 32 (содержащей домен ECD, соответствующий остаткам 19-256, представленным под учетным номером UniProt No. O75144.2, фланкированный смежным N- и C-концевым остаткам последовательности дикого типа). ДНК, кодирующую ECD дикого типа, клонировали между сайтами BamH1 и Kpn1 модифицированного вектора pBYDS03 для дрожжевого дисплея и затем вырезали с использованием тех же рестрикционных ферментов. Затем вырезанную ДНК подвергали мутагенезу с помощью набора Genemorph II (Agilent, США) для того, чтобы получить в среднем три-пять аминокислотных изменений на один вариант библиотеки. Затем подвергнутую мутагенезу ДНК амплифицировали с помощью двухступенчатой ПЦР и далее обрабатывали, как описано выше, для целевых библиотек.

Пример 2. Введение ДНК-библиотек в дрожжи.

Пример 2 описывает введение ДНК-библиотек ICOSL в дрожжи.

Чтобы ввести вырожденную и случайную библиотечную ДНК в дрожжи, подготавливали компетентные к электропорации клетки штамма дрожжей BJ5464 (ATCC.org, ATCC номер 208288) и подвергали электропорации на Gene Pulser II (Biorad, США) с помощью ДНК, готовой к электропорации, по существу со стадии выше, как описано (Colby, DW et al. 2004 Methods Enzymology 388, 348-358). Единственным исключением является то, что трансформированные клетки выращивали в неиндуцирующей минимальной селективной среде SCD-Leu для обеспечения селективного маркера LEU2, переносимого модифицированной плазмидой pBYDS03.

Размер библиотеки определяли путем рассева разведений свежесобранных клеток на планшетах с агаром SCD-Leu, с последующей экстраполяцией размера библиотеки из числа одиночных колоний при рассеивании, при котором образовывались, по меньшей мере, 50 колоний на планшет. Остальную часть электропорированной культуры выращивали до насыщения и клетки из этой культуры снова субкультивировали в той же среде, чтобы минимизировать фракцию нетрансформированных клеток. Для поддержания разнообразия библиотеки эта стадия субкультивирования проводилась с использованием инокулята, который содержал, по меньшей мере, 10× больше клеток, чем рассчитанный размер библиотеки. Клетки из второй насыщенной культуры ресуспендировали в свежей среде, содержащей 25% (мас./об.)

стерильного глицерина, до плотности 10×10^6 /мл и замораживали и хранили при -80°C (сток замороженной библиотеки).

Один литр среды SCD-Leu состоит из 14,7 г цитрата натрия, 4,29 г моногидрата лимонной кислоты, 20 г декстрозы, 6,7 г основы азотного агара для дрожжей Difco и 1,6 г дрожжевой синтетической исключаяющей средовой добавки без лейцина. Перед применением среду стерильно фильтровали с помощью 0,2 мкм вакуумного фильтрующего устройства.

Размер библиотеки определяли путем рассева разведений свежесобранных клеток на чашках агара SCD-Leu с последующей экстраполяцией размера библиотеки из числа отдельных колоний при рассеивании, при котором образуются, по меньшей мере, 50 колоний на чашку.

Для отделения плазмиды от клеток, которые содержат два или более различных клонов библиотеки, количество клеток, соответствующее 10-кратному размеру библиотеки, отбирали из культуры SCD-Leu в течение ночи, субкультивировали 1/100 в свежей среде SCD-Leu и выращивали в течение ночи. Клетки из этой ночной культуры ресуспендировали в стерильном 25% (мас./об.) глицерине до плотности 10×10^6 /мл и замораживали и хранили при -80°C (сток замороженной библиотеки).

Пример 3. Отбор дрожжей.

Пример 3 описывает отбор дрожжей, экспрессирующих варианты ICOSL с модифицированной аффинностью.

Количество клеток, по меньшей мере, в 10 раз превышающее размер библиотеки, оттаивали из отдельных библиотечных стоков, суспендировали до $0,1 \times 10^6$ клеток/мл в неиндуцирующей среде SCD-Leu и выращивали в течение ночи. На следующий день количество клеток, в 10 раз превышающее размер библиотеки, центрифугировали при 2000 об./мин в течение двух минут и ресуспендировали до $0,5 \times 10^6$ клеток/мл в индуцирующей среде SCDG-Leu. Один литр индуцирующей среды SCDG-Leu состоит из 5,4 г Na_2HPO_4 , 8,56 г $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 20 г галактозы, 2,0 г декстрозы, 6,7 г основы азотного агара для дрожжей Difco и 1,6 г дрожжевой синтетической исключаяющей средовой добавки без лейцина, растворенных в воде, и стерилизованных через 0,22 мкм мембранное фильтрующее устройство. Культуру выращивали в течение двух дней при 20°C , чтобы индуцировать экспрессию библиотечных белков на поверхности клеток дрожжей.

Клетки процессировали с помощью магнитных гранул, чтобы уменьшить количество несвязывающих молекул и обогатить все варианты ICOSL, которые обладают способностью связывать их экзогенные рекомбинантные контрструктурные белки. Затем следовало от двух до трех циклов сортировки проточной цитометрией с использованием окрашивания экзогенными контрструктурными белками для обогащения фракции дрожжевых клеток, презентующих улучшенные связывающие молекулы. Обогащение с помощью магнитных гранул и отбор с помощью проточной цитометрии в основном описаны в Keith D. Miller, 1 Noah B. Pefaur, 2 and Cheryl L. Baird Current Protocols in Cytometry 4.7.1-4.7.30, July 2008.

С помощью библиотеки ICOSL, получали следующие целевые лигандные белки у R & D Systems (США): rCD28.Fc человека (т.е. рекомбинантный слитый белок CD28-Fc), rCTLA4.Fc и rICOS.Fc. Магнитные гранулы со стрептавидином получали у New England Biolabs, США. Для биотинилирования контрструктурного белка использовали биотинилирующий набор № 21955, Life Technologies, США. Для двухцветной, проточной цитометрической сортировки использовали сортировщик Becton Dickinson FACS Aria II. Уровни презентации ICOSL контролировали антителом против гемагглютинаина, помеченным Alexafluor 488 (Life Technologies, США). Лиганд-связывающие слитые с Fc белки rCD28.Fc, rCTLA4.Fc, или rCD112R.Fc, детектировали с помощью РЕ-конъюгированных козьих Fab, специфичных к человеческому Ig (Jackson ImmunoResearch, США). Двойные дрожжи были отобраны выше порогового значения с использованием параметров прямого рассеяния (FSC)/бокового рассеяния (SSC), а сортировочные ворота были основаны на более высоком лигандном связывании, обнаруженном в FL4, который обладал более ограниченным связыванием экспрессии метки в FL1.

Полученные после проточной цитометрической сортировки дрожжи анализировали по более высокой удельной аффинности связывания. Отсортированные дрожжи на выходе были размножены и повторно индуцированы, чтобы экспрессировать специфические варианты доменов, модифицированных IgSF, которые они кодируют. Затем эту популяцию можно сравнить с родительским штаммом дрожжей дикого типа или с любыми другими отобранными на выходе дрожжами, такими как популяция дрожжей на выходе на гранулах, с помощью проточной цитометрии.

Для ICOSL результаты второй сортировки (F2) сравнивались с родительскими дрожжами ICOSL для связывания каждого из числа rICOS.Fc, rCD28.Fc и rCTLA4.Fc путем двойного окрашивания каждой популяции с помощью экспрессии анти-НА (гемагглютинина) метки вторичного антитела против Fc человека для детекции связывания лиганда.

В случае вариантов ICOSL в дрожжах, отобранных по связыванию с ICOS, результаты сортировки F2 дали значения средней интенсивности флуоресценции (MFI) 997 при окрашивании с помощью 5,6 нМ rICOS.Fc, тогда как MFI родительского штамма ICOSL равно 397 при окрашивании в той же самой концентрации rICOS.Fc. Это представляет собой приблизительно трехкратное улучшение среднего связывания в этом выбранном пуле клонов F2, и прогнозируется, что отдельные клоны из этого пула будут иметь

значительно улучшенное MFI/аффинности при индивидуальном тестировании.

В случае вариантных ICOSL в дрожжах, выбранных для связывания с CD28, результаты сортировки F2 дали значения MFI 640 при окрашивании 100 нМ rCD28.Fc, тогда как MFI родительского штамма ICOSL было равно 29 при окрашивании с той же концентрацией rCD28.Fc (улучшение в 22 раза). В случае вариантов дрожжей ICOSL, выбранных для связывания с CTLA4, результаты сортировки F2 дали значения MFI 949 при окрашивании 100 нМ rCTLA4.Fc, тогда как MFI родительского штамма ICOSL измеряли при 29 при окраске с той же концентрацией rCTLA4.Fc (32-кратное улучшение).

Важно отметить, что значения MFI всех результатов F2, описанных выше, при измерении антителом против HA-метки на FL1, не увеличивались и иногда уменьшались по сравнению с штаммами дикого типа, что указывает на то, что увеличенное связывание было не функцией повышенной экспрессии выбранных вариантов на поверхность дрожжей, а валидированной стратегией отбора выше порогового значения только для отбора средних и низких экспрессоров с высоким связыванием лиганда.

Отобранные вариантные ICOSL ECD домены были дополнительно отформатированы в виде слитых белков и испытаны на связывание и функциональную активность, как описано ниже.

Пример 4. Переформатирование результатов отбора в виде слитых с Fc белков и в различных типах иммуномодулирующих белков.

В примере 4 описывается переформатирование результатов отбора в виде иммуномодулирующих белков, содержащих модифицированный (вариантный) внеклеточный домен (ECD) ICOSL, слитый с молекулой Fc (вариантные молекулы слитого белка ECD-Fc).

Клетки, полученные на выходе конечной проточной цитометрической сортировки ICOSL, выращивали до предельной плотности в среде SCD-Leu. Плазмидную ДНК в случае каждого результата выделяли с использованием набора для выделения дрожжевой плазмидной ДНК (Zymoresearch, США). Для слияния с Fc ПЦР-праймеры с добавленными сайтами рестрикции, подходящими для клонирования в выбранный вектор для слияния с Fc, использовали для периодической амплификации из препаратов плазмидной ДНК, кодирующей ДНК мутантных целевых ECD. После рестрикционного гидролиза продукты ПНР лигировали в соответствующий Fc-вектор с последующей химической трансформацией в штамм XL1 Blue E. Coli (Agilent, США) или NEB5alpha (New England Biolabs), как указано поставщиком. Примером вектора для слияния с Fc является pFUSE-hIgG1-Fc2 (Invivogen, США).

Разбавления реакций трансформации высевали на LB-агар, содержащий 100 мкг/мл карбенициллина (Teknova, США) для получения отдельных колоний. До 96 колоний из каждой трансформации затем выращивали в 96-луночных планшетах до насыщения в течение ночи при 37°C в LB-бульоне (Teknova cat # L8112) и небольшую аликвоту из каждой лунки представляли для секвенирования ДНК ECD-вставки для того, чтобы идентифицировать мутацию(и) во всех клонах. Подготовка образца для секвенирования ДНК проводилась с использованием протоколов, предоставленных поставщиком услуг (Genewiz, Саус Плейнфилд, Нью-Джерси). После удаления образца для секвенирования ДНК к оставшимся культурам добавляли глицерин для получения конечного содержания глицерина 25% и планшеты хранили при -20°C для будущего применения в качестве мастер-планшетов (см. ниже). В ином случае, образцы для секвенирования ДНК были получены путем пересева репликацией из растущих жидких культур на планшетах с твердым агаром с использованием одноразового 96-луночного репликатора (VWR, США). Эти планшеты инкубировали в течение ночи для получения ростовых патчей, и планшеты были предоставлены Genewiz, в соответствии с указаниями Genewiz. В некоторых случаях для проверки мутаций выполняли повторное ресеквенирование.

После идентификации представляющих интерес клонов из результатов анализа данных секвенирования ДНК, полученных от Genewiz, клоны, представляющие интерес, извлекали из мастер-планшетов и индивидуально выращивали до плотности в 5 мл жидкого LB-бульона, содержащего 100 мкг/мл карбенициллина (Teknova, США) и 2 мл каждой культуры затем использовали для приготовления около 10 мкг минипрепаративной плазмидной ДНК каждого клона с использованием стандартного набора, такого как набор Pureyield (Promega). Идентификация клонов, представляющих интерес, обычно включает следующие стадии. Сначала файлы данных последовательности ДНК загружались с веб-сайта Genewiz. Затем все последовательности обрабатывали вручную, так чтобы они начинались с начала кодирующей области ECD. Проверенные последовательности затем пакетно транслировали с использованием подходящей программы, доступной по URL: www.ebi.ac.uk/Tools/st/emboss_transeq/. Затем транслированные последовательности выравнивали с использованием подходящей программы, доступной по URL: multalin.toulouse.inra.fr/multalin/multalin.html.

Клоны, представляющие интерес, затем идентифицировали с использованием следующих критериев: 1) идентичный клон встречается, по меньшей мере, два раза при выравнивании и 2) мутация происходит, по меньшей мере, два раза при выравнивании и предпочтительно в отдельных клонах. Клоны, которые удовлетворяют хотя бы одному из этих критериев, были клонами, которые были обогащены нашим процессом сортировки из-за улучшения связывания.

Для получения иммуномодулирующих белков, которые являются слитыми с Fc белками, содержащими ECD из ICOSL, по меньшей мере, с одним доменом с модифицированной аффинностью (например, вариант ICOSL ECD-Fc), кодирующую молекулу нуклеиновой кислоты получали для кодирова-

ния белка, спроектированного следующим образом: сигнальный пептид за которым следует вариантный (мутантный) ECD, за которым следует линкер из трех аланинов (AAA), за которым следует человеческий IgG1 Fc, содержащий мутацию N82G, относительно Fc IgG1 человека дикого типа, представленную в SEQ ID NO: 226 (что соответствует N297G по нумерации EU). Этот примерный Fc также содержал стабилизирующие цистеиновые мутации R77C и V87C и замену остатка цистеина на остаток серина в положении 5 (C5S), каждый относительно Fc IgG1 человека дикого типа, представленного в SEQ ID NO: 226 (соответствует R292C, V302C и C220S, соответственно, согласно нумерации EU). В некоторых случаях сайт клонирования NotI, который вносит вклад в линкерную последовательность AAA, был удален для создания непосредственного слияния ICOSL ECD и начала Fc. Поскольку конструктор не включает никаких легких цепей антител, которые могут образовывать ковалентную связь с цистеином, человеческий IgG1 Fc также содержал замену остатков цистеина на остаток серина в положении 5 (C5S) по сравнению с диким или немодифицированным Fc, представленным в SEQ ID NO: 226.

Пример 5. Экспрессия и очистка слитых с Fc белков.

Пример 5 описывает крупномасштабную экспрессию и очистку слитых с Fc белков, содержащих вариантный ECD ICOSL.

Рекомбинантные вариантные слитые с Fc белки были получены с помощью экспрессирующей системы Expi293 (Invitrogen, США). 4 мкг каждой плазмидной ДНК с предыдущей стадии добавляли к 200 мкл Opti-MEM (Invitrogen, США) с одновременным отдельным добавлением 10,8 мкл ExpiFectamine к другим 200 мкл Opti-MEM. Через 5 мин 200 мкл плазмидной ДНК смешивали с 200 мкл ExpiFectamine и дополнительно инкубировали в течение дополнительных 20 мин перед добавлением этой смеси к клеткам. Десять миллионов клеток Expi293 распределяли в отдельные стерильные 10 мл лунки 24-луночного глубокого планшета с коническим дном (Thomson Instrument Company, США) в объеме 3,4 мл среды Expi293 (Invitrogen, США). Планшеты встряхивали в течение 5 дней при 120 об./мин в инкубаторе для клеточных культур млекопитающих при 95% влажности и 8% CO₂. После 5-дневной инкубации клетки осаждали и удаляли культуральные надосадочные жидкости.

Белок очищали из надосадочных жидкостей с помощью высокопроизводительного набора для очистки с протеином A в 96 луночном формате согласно протоколу производителя (каталожный номер 45202, Life Technologies, США). В полученных элюированных фракциях заменяли буфер на PBS с использованием спин-обессоливающего планшета Zeba 96 (каталожный номер 89807, Life Technologies, США) в соответствии с протоколом изготовителя. Очищенный белок определяли количественно при оптической плотности 280 нм, измеренной прибором Nanodrop (Thermo Fisher Scientific, США), и степень чистоты белка оценивали путем загрузки 5 мкг белка на готовые полиакриламидные гели NUPAGE (Life Technologies, США) в условиях денатурации и восстановления и последующего гель-электрофореза. Белки визуализировали в геле с использованием стандартного окрашивания Кумасси.

Пример 6. Оценка связывания и активности молекул, содержащих домен IgSF со зрелой аффинностью.

А. Связывание с контрструктурами, экспрессируемыми клетками.

В этом примере описаны исследования связывания слитых с Fc белков для того, чтобы показать специфичность и аффинность вариантных иммуномодулирующих белков с доменом ICOSL к когнатным партнерам связывания.

Для получения клеток, экспрессирующих когнатные партнеры связывания, конструкторы на основе полноразмерных последовательностей млекопитающих для поверхностной экспрессии для каждого из CD28 и ICOS человека были спроектированы в экспрессирующем векоре pcDNA3.1 (Life Technologies) и получены с помощью GenScript, США. Исследования связывания проводились с использованием системы для транзиторной трансфекции Expi293F (Life Technologies, США). Определяли количество клеток, необходимых для эксперимента, и выполняли в соответствующем 30 мл масштабе с использованием рекомендованного изготовителем протокола. Для каждой 30 мл трансфекции CD28, ICOS или отрицательного контроля 75 миллионов клеток Expi293F инкубировали с 30 мкг ДНК экспрессирующего конструктора и 1,5 мл разбавленного реактива ExpiFectamine 293 в течение 48 ч, после чего клетки собирали для окрашивания.

Для окрашивания с помощью проточной цитометрии 200 000 клеток соответствующей транзиторной трансфекции или отрицательного контроля высевали в 96-луночные круглодонные планшеты. Клетки центрифугировали и ресуспендировали в буфере для окрашивания (PBS (фосфатно-солевой буферный раствор), 1% BSA (бычий сывороточный альбумин) и 0,1% азида натрия) в течение 20 мин для блокирования неспецифического связывания. Затем клетки снова центрифугировали и ресуспендировали в 50 мкл буфера для окрашивания, содержащем 100 нМ-1 нМ вариантного иммуномодулирующего белка, в зависимости от эксперимента с каждым из кандидатных вариантного CD80 Fc, вариантного ICOSL Fc или стекового вариантного IgSF слитого с Fc белка. Первичное окрашивание проводили на льду в течение 45 мин, перед двухкратной промывкой клеток в буфере для окрашивания. PE-конъюгированные антитела против Fc человека (Jackson ImmunoResearch, США) разбавляли 1: 150 в 50 мкл окрашивающего буфера и добавляли к клеткам и инкубировали еще 30 мин на льду. Вторичное антитело дважды вымывали, клетки фиксировали в 4% формальдегиде/PBS и образцы анализировали на проточном цитометре.

FACScan (Becton Dickinson, США) или проточном цитометре Hypercyt (Intellicyte, США)

Среднюю интенсивность флуоресценции (MFI) рассчитывали для каждого трансфектанта и родительской линии отрицательного контроля с помощью программного обеспечения Cell Quest Pro (Becton Dickinson, США), или проточного цитометра Hypercyt (Intellicyte, США).

В. Характеризация биоактивности.

В этом примере далее описывается характеризация биоактивности вариантного слитого с Fc белка в *in vitro* анализах первичных Т-клеток человека.

1. Реакция смешанных лимфоцитов (MLR).

Биоактивность растворимого rICOSL.Fc тестировали в реакции смешанных лимфоцитов (MLR) человека. Первичные дендритные клетки человека (DC) получали путем культивирования моноцитов, выделенных из PBMC (BenTech Bio, США) *in vitro* в течение 7 дней с 500 Ед./мл rIL-4 (R & D Systems, США) и 250 Ед./мл rGM-CSF (R & D Systems, США) в среде Ex-Vivo 15 (Lonza, Швейцария). 10 000 зрелых DC и 100 000 очищенных аллогенных CD4⁺ Т-клеток (BenTech Bio, США) совместно культивировали со слитым белком ICOSL, слитым белком CF80 Fc или контролем в 96-луночных круглодонных планшетах в 200 мкл конечного объема среды Ex-Vivo 15. На 5-й день анализировали секрецию IFN-гамма в культуральных надосадочных жидкостях с помощью набора ELISA для человеческого IFN-гамма DuoSet (R & D Systems, США). Оптическую плотность измеряли с помощью микропланшетного ридера VMax ELISA (Molecular Devices, США) и определяли по титрованному стандарту rIFN-гамма, включенному в набор набора для IFN-гамма Duo (R & D Systems, США). Второй протокол MLR состоял из человеческих первичных дендритных клеток (DC), полученных при культивировании моноцитов, выделенных из PBMC (BenTech Bio, США) *in vitro* в течение 7 дней с 50 нг/мл rIL-4 (R & D Systems, США) и 80 нг/мл rGM-CSF (R & D Systems, США) в среде Ex-Vivo 15 (Lonza, Швейцария). В дни 3 и 5 половину среды удаляли и заменяли свежей средой, содержащей 50 нг/мл rIL-4 и 80 нг/мл rGM-CSF. Чтобы полностью индуцировать созревание DC, на 6 день добавляли липополисахарид (LPS) (InvivoGen Corp., США) при 100 нг/мл в культурах DC и клетки инкубировали в течение дополнительных 24 ч. Около 10 000 зрелых DC и 100 000 очищенных аллогенных CD3⁺ Т-клеток (BenTech Bio, США) совместно культивировали со слитыми белками IFOSL Fc и контролем в 96-луночных круглодонных планшетах в 200 мкл конечного объема среды Ex-Vivo 15. На 5-й день секрецию IFN-гамма в культуральных надосадочных жидкостях анализировали с использованием набора ELISA для человеческого IFN-гамма DuoSet (R & D Systems, США). Оптическую плотность измеряли на мультирежимного ридере для микропланшетов BioTek Cytation (BioTek Corp., США) и определяли по титрованному стандарту rIFN-гамма, включенному в набор набора для IFN-гамма Duo (R & D Systems, США).

1. Анализ коиммобилизации с анти-CD3.

Костимулирующую биологическую активность слитых вариантов ICOSL определяли в анализах коиммобилизации с анти-CD3. 1 или 10 нМ мышинового анти-CD3 человека (OKT3, Biolegends, США) разводили в PBS с 1 нМ-80 нМ вариантных белков rICOSL.Fc. Эту смесь добавляли к обработанным 96-луночным планшетах с плоским дном для тканевых культур (Corning, США) в течение ночи для облегчения прилипания стимулирующих белков к лункам планшета. На следующий день несвязанный белок смывали с планшета и в каждую лунку добавляли 100000 очищенных человеческих пан Т-клеток (BenTech Bio, США) или клонов Т-клетки человека BC3 (Astarte Biologics, США) в конечном объеме 200 мкл среды Ex-Vivo 15 (Lonza, Швейцария). В некоторых случаях человеческие пан-Т-клетки были помечены 0,25 мкМ карбоксифлуоресцеина сукцинимидилового эфира (CFSE, ThermoFisher Scientific, США). Клетки культивировали за 3 дня до сбора культуральных надосадочных жидкостей и измерения уровней IFN-гамма человека с помощью набора DuoSet ELISA (R & D Systems, США), как упомянуто выше. Клеточную пролиферацию определяли по проценту исходных клеток, которые вошли в деление, путем измерения с помощью разведения CFSE на клетках, окрашенных флуоресцентно-конъюгированными анти-CD4, анти-CD8 антителами (BD, США) или общими Т-клетками посредством проточного цитометрического анализа на LSR II (BD, США).

С. Результаты.

Результаты исследований связывания и активности для примерных протестированных вариантов приведены в табл. 7, в котором указаны аминокислотные замены (замещения) в примерном домене IgSF в ECD из ICOSL, отобранных при скрининге созревшей аффинности относительно соответствующих когнатных структур ICOS и CD28. В таблицах примерные аминокислотные замены обозначаются номером аминокислотного положения, аналогичного соответствующей исходной немодифицированной последовательности ECD, как указано далее. Например, эталонная немодифицированная последовательность ECD в табл. 7 (WT ICOSL) представляет собой немодифицированную последовательность ICOSL ECD, представленную в SEQ ID NO: 32. Положение аминокислоты указывается посередине с соответствующей немодифицированной (например, дикого типа) аминокислотой, указанной перед номером, и идентифицированной аминокислотной заменой, указанной после номера. В столбце 2 указан идентификатор SEQ ID NO для варианта ECD для каждой вариантной слитой молекулы ECD-Fc.

Также показана активность связывания, измеренная по значению средней интенсивности флуоресценции (MFI) для связывания каждой вариантной слитой с Fc молекулы с клетками, сконструированными

ми для экспрессии когнатного контрструктурного лиганда, и соотношение MFI по сравнению со связыванием соответствующей немодифицированной молекулы слитого белка ECD-Fc, не содержащей аминокислотной замены (замен) с тем же самым экспрессируемым в клетке контрструктурным лигандом. Функциональная активность вариантных слитых с Fc молекул в отношении модуляции активности Т-клеток также показана на основе рассчитанных уровней IFN-гамма в культуральных надосадочных жидкостях (пг/мл), получаемых либо i) с указанной вариантной молекулой слитого белка ECD-Fc, коиммобилизованной с анти-CD3 либо ii) с указанной вариантной молекулой слитого белка ECD-Fc в анализе MLR. В таблице также показано соотношение IFN-гамма, продуцируемого каждым вариантным ECD-Fc, по сравнению с соответствующим немодифицированным ECD-Fc (дикого типа) в обоих функциональных анализах.

Как показано, отборы привели к идентификации ряда вариантных доменов ICOSL IgSF, которые были модифицированы по аффинности, демонстрирующих повышенное связывание, по меньшей мере, с одним, а в некоторых случаях и более чем с одним, когнатным контрструктурным лигандом. Кроме того, результаты показали, что модификация аффинности вариантных молекул также демонстрирует улучшенные активности как для увеличения, так и уменьшения иммунологической активности в зависимости от формата молекулы. Например, коиммобилизация лиганда, вероятно, обеспечивает мультвалентное взаимодействие с клеткой для кластеризации или увеличения avidности, что способствует активности агонистов и повышает активацию Т-клеток по сравнению с немодифицированной (например, дикого типа) молекулой ECD-Fc, не содержащей аминокислотную замену(ы). Однако когда молекула представлена в виде двухвалентной молекулы Fc в растворе, те же вариантные домены IgSF проявляют антагонистическую активность в отношении уменьшения активации Т-клеток по сравнению с немодифицированной молекулой ECD-Fv (например, дикого типа), не содержащей аминокислотную замену(ы).

Таблица 7

Варианты ICOSL, выбранные против CD28 или ICOS. Последовательности молекул, данные связывания и данные костимулирующей биоактивности

Мутация(ии) ICOSL	SEQ ID NO (ECD)	Связывание		Коиммобилизация с анти-CD3	MLR
		ICOS OD (исходное соотно- шение)	CD28 MFI (исходное соотно- шение)	IFN-гамма пг/мл (исходное соотношение)	уровни IFN- гамма пг/мл (исходное соотно- шение)
N52S	109	1,33 (1,55)	162 (9,00)	1334 (1,93)	300 (0,44)
N52H	110	1,30 (1,51)	368 (20,44)	1268 (1,83)	39 (0,06)
N52D	111	1,59 (1,85)	130 (7,22)	1943 (2,80)	190 (0,28)
N52Y/N57Y/F138L/ L203P	112	1,02 (1,19)	398 (22,11)	510* (1,47*)	18 (0,03)
N52H/N57Y/Q100P	113	1,57 (1,83)	447 (24,83)	2199 (3,18)	25 (0,04)
N52S/Y146C/Y152C	114	1,26 (1,47)	39 (2,17)	1647 (2,38)	152 (0,22)
N52H/C198R	115	1,16 (1,35)	363 (20,17)	744* (2,15*)	ND (ND)
N52H/C140del/T225 A	372	ND (ND)	154 (8,56)	522* (1,51*)	ND (ND)
N52H/C198R/T225A	117	1,41 (1,64)	344 (19,11)	778* (2,25*)	0 (0)

N52H/K92R	118	1,48 (1,72)	347 (19,28)	288* (0,83*)	89 (0,13)
N52H/S99G	119	0,09 (0,10)	29 (1,61)	184* (0,53*)	421 (0,61)
N52Y	120	0,08 (0,09)	18 (1,00)	184* (0,53*)	568 (0,83)
N57Y	121	1,40 (1,63)	101 (5,61)	580* (1,68*)	176 (0,26)
N57Y/Q100P	122	0,62 (0,72)	285 (15,83)	301* (0,87*)	177 (0,26)
N52S/S130G/Y152C	123	0,16 (0,19)	24 (1,33)	266* (0,77*)	1617 (2,35)
N52S/Y152C	124	0,18 (0,21)	29 (1,61)	238* (0,69*)	363 (0,53)
N52S/C198R	125	1,80 (2,09)	82 (4,56)	1427 (2,06)	201 (0,29)
N52Y/N57Y/Y152C	126	0,08 (0,09)	56 (3,11)	377* (1,09*)	439 (0,64)
N52Y/N57Y/H129P/ C198R	127	ND (ND)	449 (24,94)	1192 (1,72)	ND (ND)
N52H/L161P/C198R	128	0,18 (0,21)	343 (19,05)	643* (1,86*)	447 (0,65)
N52S/T113E	129	1,51 (1,76)	54 (3,00)	451* (1,30*)	345 (0,50)
S54A	130	1,62 (1,88)	48 (2,67)	386* (1,12*)	771 (1,12)
N52D/S54P	368	1,50 (1,74)	38 (2,11)	476* (1,38*)	227 (0,33)
N52K/L208P	132	1,91 (2,22)	291 (16,17)	1509 (2,18)	137 (0,20)
N52S/Y152H	133	0,85 (0,99)	68 (3,78)	2158 (3,12)	221 (0,32)
N52D/V151A	134	0,90 (1,05)	19 (1,06)	341* (0,99*)	450 (0,66)
N52H/I143T	135	1,83 (2,13)	350 (19,44)	2216 (3,20)	112 (0,16)
N52S/L80P	136	0,09 (0,10)	22 (1,22)	192* (0,55*)	340 (0,49)
F120S/Y152H/N201 S	137	0,63 (0,73)	16 (0,89)	351* (1,01*)	712 (1,04)
N52S/R75Q/L203P	138	1,71 (1,99)	12 (0,67)	1996 (2,88)	136 (0,20)
N52S/D158G	139	1,33 (1,55)	39 (2,17)	325* (0,94*)	277 (0,40)
N52D/Q133H	140	1,53 (1,78)	104 (5,78)	365* (1,05*)	178 (0,26)
WT ICOSL	32	0,86 (1,00)	18 (1,00)	692 /346* (1,00)	687 (1,00)

*Исходное соотношение, рассчитанное с помощью IFN-гамма 346 пг/мл для WT ICOSL.

Анализы связывания повторяли, по существу, как описано выше, за исключением того, что связывание также оценивали против клеток, экспрессирующих полноразмерный CTLA4 человека. Варианты слитых белков ICOSL Fc также были дополнительно оценены в анализе коиммобилизации с анти-CD3, как описано выше. Результаты подтвердили идентификацию ряда вариантных доменов ICOSL IgSF, которые проявили повышенную аффинность связывания, по меньшей мере, с одним, а в некоторых случаях и более чем с одним когнатным лигандом. Кроме того, результаты показали, что аффинная модификация вариантных молекул также демонстрирует улучшенные активности в анализе коиммобилизации.

Пример 7. Дополнительные домены IgSF с модифицированной аффинностью.

В этих примерах описываются конструирование, создание и скрининг дополнительных сенсibilизированных модифицированных CD80 (B7-1), CD86 (B7-2) и NKM30 иммуномодулирующих белков, которые являются другими компонентами иммунного синапса (IS), которые продемонстрировали двойную роль как в иммунной активации, так и в ингибировании. Эти примеры демонстрируют, что аффинная модификация доменов IgSF дает белки, которые могут действовать как для повышения, так и для снижения иммунологической активности. В этой работе также описываются различные комбинации таких доменов, слитых парами (то есть сложенных в стек), с вариантным ICOSL с модифицированной аффинностью с образованием иммуномодулирующего белка типа II для получения иммуномодулирующей активности.

Мутантные ДНК-конструкты человеческих CD80, CD86 и NKp30 IgSF доменов для трансляции и экспрессии в виде библиотек для дрожжевого дисплея получали по существу так же, как описано в примере 1. Для библиотек, которые нацелены на конкретные остатки целевого белка, для полной или частичной рандомизации с вырожденными кодонами, кодирующие ДНК для внеклеточных доменов (ECD) человеческих CD80 (SEQ ID NO: 28) и NKp30 (SEQ ID NO: 54) были заказаны у Integrated DNA Tech-

nologies (Коралвилл, Айова) в виде набора перекрывающихся олигонуклеотидов длиной до 80 пар оснований (п.о.). В ином случае остатки мутировали путем сайт-направленного мутагенеза по существу так, как описано в примере 1. В ином случае случайные библиотеки были сконструированы для идентификации вариантов ECD CD80 (SEQ ID NO: 28), CD86 (SEQ ID NO: 29) и NKp30 (SEQ ID NO: 54), по существу, как описано в примере 1.

Целевую ДНК и ДНК случайной библиотеки вводили в дрожжи, по существу так, как описано в примере 2, для получения дрожжевой библиотеки. Библиотеки использовали для отбора дрожжей, экспрессирующих варианты CD80, CD86 и NKp30 с модифицированной аффинностью, по существу так, как описано в примере 3. Клетки обрабатывали для уменьшения количества невзаимодействующих молекул и обогащали варианты CD80, CD86 или NKp30 с возможностью связывания их экзогенных рекомбинантных контрструктурных белков по существу так, как описано в примере 3. Например, дрожжи презентировали целевые или случайные библиотеки CD80 для каждого из CD28, CTL-4 и PD-L1 по отдельности. Затем следовало от двух до трех циклов сортировки проточной цитометрией с использованием окрашивания экзогенными контрструктурными белками для обогащения фракции дрожжевых клеток, презентующих улучшенные связывающие молекулы. Обогащение с помощью магнитных гранул и отбор с помощью проточной цитометрии в основном описаны в Keith D. Miller, 1 Noah B. Pefaur, 2 and Cheryl L. Baird1 *Current Protocols in Cytometry* 4.7.1-4.7.30, July 2008.

С помощью библиотек CD80, CD86, ICOSL и NKp30 в R & D Systems (США) были получены следующие целевые белки-лиганды: человеческий rCD28.Fc (т.е. рекомбинантный слитый белок CD28-Fc), rPDL1.Fc, rCTLA4.Fc и rB7H6.Fc. Двухцветную проточную цитометрию проводили по существу, как описано в примере 3. Дрожжи, полученные в результате проточной цитометрической сортировки анализировали на предмет более высокой удельной аффинности связывания. Полученные в результате отсортированные дрожжи размножали и повторно индуцировали для того, чтобы экспрессировать специфические варианты доменов IgSF с модифицированной аффинностью, которые они кодируют. Затем эту популяцию можно было сравнить с родительским штаммом дрожжей дикого типа или с любыми другими дрожжами, такими как популяция дрожжей, отобранных на гранулах, с помощью проточной цитометрии.

В случае дрожжей с вариантными NKp30, отобранными по связыванию с B7-H6, выходы сортировки F2 дали значения MFI, равные 533 при окраске с помощью 16,6 nM rB7H6. Fc, тогда как родительский штамм NKp30 дал значение MFI, равное 90 при окрашивании той же концентрацией rB7H6.Fc (6-кратное улучшение).

Среди вариантных NKp30, которые были идентифицированы, был вариант, который содержал мутацию L30V/A60V/S64P/S86G относительно положений во внеклеточном домене NKp30, соответствующих положениям, представленным в SEQ ID NO: 54. Среди идентифицированных вариантных CD86 был вариант, который содержал мутации Q35H/H90L/Q102H относительно положений во внеклеточном домене CD86, соответствующих положениям, представленным в SEQ ID NO: 29. Среди идентифицированных вариантных CD80 были варианты, приведенные в табл. 8 и дополнительно описанные ниже.

Важно отметить, что значения MFI для всех выходов F2, описанных выше, при измерении антителом против HA-метки на FL1, не увеличивались и иногда уменьшались по сравнению со штаммами дикого типа, что указывает на то, что увеличенное связывание не было функцией повышенной экспрессии отобранных вариантов на поверхности дрожжей, а валидированных стратегий отбора выше порогового значения только для отбора средних и низких экспрессоров с высоким связыванием лиганда.

Примерные результаты отбора были переформатированы в виде иммуномодулирующих белков, содержащих (вариантный) внеклеточный домен (ECD) с модифицированной аффинностью из CD80, скомбинированный с молекулой Fc (вариантные молекулы слитого белка ECD-Fc) по существу, как описано в примере 4, и слитый с Fc белок экспрессировали и очищали, по существу, как описано в примере 5.

Затем оценивали по существу связывание примерных вариантных слитых белков CD80-Fc с экспрессированными клетками контрструктурами, как описано в примере 6. Для получения клеток, экспрессирующих когнатные партнеры связывания, были созданы конструкторы для поверхностной экспрессии полноразмерных белков млекопитающих для каждого из CD28, CTLA4 и PD-L1 человека, как описано в примере 6. Исследования связывания и проточная цитометрия проводились по существу, как описано в примере 6. Кроме того, биологическая активность вариантного белка Слитого с Fc белка характеризовали либо методом реакции смешанных лимфоцитов (MLR), либо коиммобилизацией с анти-CD3, по существу, как описано в примере 6.

Результаты исследований связывания и активности для примерных протестированных вариантов приведены в табл. 8 и 9. В частности, в табл. 8 приведены примерные аминокислотные замены (замещения) домена IgSF в ECD из CD80, выбранных скринингом для созревания аффинности против соответствующей когнатной структуры CD28. Табл. 9 демонстрирует примерные аминокислотные замены (замещения) домена IgSF в ECD из CD80, выбранных скринингом по созреванию аффинности против соответствующей когнатной структуры PD-L1. Как и выше, для каждой таблицы примерные аминокислотные замены обозначаются номером аминокислотного положения, аналогичного соответствующему в эталонной немодифицированной последовательности ECD. Например, эталонная немодифицированная после-

довательность ECD в табл. 8 и 9 представляет собой немодифицированную последовательность ECD CD80, представленную в SEQ ID NO: 28. Положение аминокислоты указывается посередине с соответствующей немодифицированной (например, дикого типа) аминокислотой, указанной перед номером, и идентифицированной аминокислотной заменой, указанной после номера. В столбце 2 указан идентификатор SEQ ID NO для вариантного ECD для каждой вариантной молекулы слитого белка ECD-Fc.

Также показана активность связывания, измеренная по значению средней интенсивности флуоресценции (MFI) для связывания каждой вариантной слитой с Fc белковой молекулы с клетками, сконструированными для экспрессии когнатного контрструктурного лиганда, и соотношение MFI по сравнению со связыванием соответствующей немодифицированной молекулы слитого белка ECD-Fc, не содержащей аминокислотной замены (замен) к одному и тому же клеточно-экспрессируемому контрструктурному лиганду. Функциональная активность вариантных слитых с Fc молекул для модуляции активности Т-клеток также показана на основе рассчитанных уровней IFN-гамма в культуральных надосадочных жидкостях (пг/мл), получаемых либо i) с указанной вариантной молекулой слитого белка ECD-Fc коиммобилизованной с анти-CD3 либо ii) с указанной вариантной молекулой слитого белка ECD-Fc в анализе MLR. В таблицах также показано соотношение IFN-гамма, полученное с каждым вариантом ECD-Fc, по сравнению с соответствующим немодифицированным ECD-Fc в обоих функциональных анализах.

Как показано, отборы привели к идентификации ряда доменных вариантов CD80 IgSF, модифицированных по аффинности, которые демонстрировали повышенное связывание, по меньшей мере, с одним, а в некоторых случаях и более чем с одним, когнатным контрструктурным лигандом. Кроме того, результаты показали, что модификация аффинности вариантных молекул также демонстрирует улучшенные активности как для увеличения, так и уменьшения иммунологической активности в зависимости от формата молекулы. Например, коиммобилизация лиганда, вероятно, обеспечивает мультивалентное взаимодействие с клеткой для кластеризации или увеличения avidности, что способствует активности агонистов и повышает активацию Т-клеток по сравнению с немодифицированной (например, дикого типа) молекулой ECD-Fc, не содержащей аминокислотную замену(ы). Однако, когда молекула представлена в виде двухвалентной молекулы Fc в растворе, те же варианты доменов IgSF проявляют антагонистическую активность для уменьшения активации Т-клеток по сравнению с немодифицированной (например, дикого типа) молекулой ECD-Fv, не содержащей аминокислотную замену(ы).

Таблица 8

Варианты CD80, отобранные против CD28. Последовательности молекул, данные связывания и данные костимулирующей биоактивности

Мутация(ии) CD80	EQ ID NO (ECD)	Связывание			Коиммобилизация с анти-CD3	MLR
		CD28 MFI (исходное соотношение)	CTLA-4 MFI (исходное соотношение)	PD-L1 MFI (исходное соотношение)		
L70Q/A91G/N144D	508	125 (1,31)	283 (1,36)	6 (0,08)	93 (1,12)	716 (0,83)
L70Q/A91G/T130A	56	96 (1,01)	234 (1,13)	7 (0,10)	99 (1,19)	752 (0,87)
L70Q/A91G/I118A/T120S/T130A/K169E	59	123 (1,29)	226 (1,09)	7 (0,10)	86 (1,03)	741 (0,86)
V4M/L70Q/A91G/I118V/T120S/T130A/K169E	510	89 (0,94)	263 (1,26)	6 (0,09)	139 (1,67)	991 (1,14)
L70Q/A91G/I118V/T120S/T130A/K169E	59	106 (1,12)	263 (1,26)	6 (0,09)	104 (1,25)	741 (0,86)
V20L/L70Q/A91S/I118V/T120S/T130A	513	105 (1,11)	200 (0,96)	9 (0,13)	195 (2,34)	710 (0,82)
S44P/L70Q/A91G/T130A	61	88 (0,92)	134 (0,64)	5 (0,07)	142 (1,71)	854 (0,99)
L70Q/A91G/E117G/I118V/T120S/T130A	514	120 (1,27)	193 (0,93)	6 (0,08)	98 (1,05)	736 (0,85)
A91G/I118V/T120S/T130A	515	84 (0,89)	231 (1,11)	44 (0,62)	276 (3,33)	714 (0,82)

L70R/A91G/I118V/T120S/T130A/T199S	516	125 (1,32)	227 (1,09)	6 (0,09)	105 (1,26)	702 (0,81)
L70Q/E81A/A91G/I118V/T120S/I127T/T130A	517	140 (1,48)	185 (0,89)	18 (0,25)	98 (1,18)	772 (0,89)
L70Q/Y87N/A91G/T130A	66	108 (1,13)	181 (0,87)	6 (0,08)	136 (1,63)	769 (0,89)
T28S/L70Q/A91G/I118V/E95K/T120S/I126V/T130A/K169E	518	32 (0,34)	65 (0,31)	6 (0,08)	120 (1,44)	834 (0,96)
N63S/L70Q/A91G/S114T/I118V/T120S/T130A	519	124 (1,30)	165 (0,79)	6 (0,08)	116 (1,39)	705 (0,81)
K36E/I67T/L70Q/A91G/I118V/T120S/T130A/N152T	520	8 (0,09)	21 (0,10)	5 (0,08)	53 (0,63)	852 (0,98)
E52G/L70Q/A91G/D107N/I118V/T120S/T130A K169E	521	113 (1,19)	245 (1,18)	6 (0,08)	94 (1,13)	874 (1,01)
K37E/F59S/L70Q/A91G/I118V/T120S/T130A/K185E	522	20 (0,21)	74 (0,36)	6 (0,08)	109 (1,31)	863 (1,00)
A91G/S103P	72	39 (0,41)	56 (0,27)	9 (0,13)	124 (1,49)	670 (0,77)
K89E/T130A	73	90 (0,95)	148 (0,71)	75 (1,07)	204 (2,45)	761 (0,88)
A91G	74	96 (1,01)	200 (0,96)	85 (1,21)	220 (2,65)	877 (1,01)
D60V/A91G/I118V/T120S/T130A/K169E	523	111 (1,17)	222 (1,07)	12 (0,18)	120 (1,44)	744 (0,86)
K54M/L70Q/A91G/Y164H	524	68 (0,71)	131 (0,63)	5 (0,08)	152 (1,83)	685 (0,79)
M38T/L70Q/E77G/A91G/I118V/T120S/T130A/N152T	525	61 (0,64)	102 (0,49)	5 (0,07)	119 (1,43)	796 (0,92)
R29H/E52G/L70R/E88G/A91G/T130A	78	100 (1,05)	119 (0,57)	5 (0,08)	200 (2,41)	740 (0,85)
Y31H/T41G/M43L/L70Q/A91G/I118V/T120S/I126V/T130A	526	85 (0,89)	85 (0,41)	6 (0,08)	288 (3,47)	782 (0,90)
V68A/T110A	80	103 (1,08)	233 (1,12)	48 (0,68)	163 (1,96)	861 (0,99)
L65H/D90G/T110A/F116L	527	33 (0,35)	121 (0,58)	11 (0,15)	129 (1,55)	758 (0,88)
R29H/E52G/D90N/I118V/T120S/T130A	82	66 (0,69)	141 (0,68)	11 (0,15)	124 (1,49)	800 (0,92)
A91G/L102S	83	6 (0,06)	6 (0,03)	5 (0,08)	75 (0,90)	698 (0,81)
I67T/L70Q/A91G/I118V T120S	530	98 (1,03)	160 (0,77)	5 (0,08)	1751 (21,1)	794 (0,92)
L70Q/A91G/T110A/I118V/T120S/T130A	531	8 (0,09)	14 (0,07)	5 (0,07)	77 (0,93)	656 (0,76)
M38V/T41D/M43I/W50G/D76G/V83A/K89E/I118V/T120S/I126V/T130A	532	5 (0,06)	8 (0,04)	8 (0,11)	82 (0,99)	671 (0,78)
V22A/L70Q/S121P	87	5 (0,06)	7 (0,04)	5 (0,07)	105 (1,27)	976 (1,13)
A12V/S15F/Y31H/M38L/T41G/M43L/D90N/T130A/P137L/N149D N152T	533	6 (0,06)	6 (0,03)	5 (0,08)	104 (1,25)	711 (0,82)
I67F/L70R/E88G/A91G/I118V/T120S/T130A	534	5 (0,05)	6 (0,03)	6 (0,08)	62 (0,74)	1003 (1,16)
E24G/L25P/L70Q/A91G/I118V/T120S/N152T	535	26 (0,27)	38 (0,18)	8 (0,11)	101 (1,21)	969 (1,12)
A91G/F92L/F108L/I118V/T120S	536	50 (0,53)	128 (0,61)	16 (0,11)	59 (0,71)	665 (0,77)
WT CD80	28	95 (1,00)	208 (1,00)	70 (1,00)	83 (1,00)	866 (1,00)

Таблица 9

Варианты CD80, отобранные против PD-L1. Последовательности молекул, данные связывания и данные костимулирующей биоактивности

Мутация(ии) CD80	EQ ID NO (ECD)	Связывание			Коиммобилизация с анти-CD3	MLR
		CD28 MFI (исходное соотношение)	CTLA-4 MFI (исходное соотношение)	PD-L1 MFI (исходное соотношение)	IFN-гамма пг/мл (исходное соотношение)	уровни IFN-гамма пг/мл (исходное соотношение)
R29D/Y31L/Q33H/ K36G/M38I/ T41A/	92	1071 (0,08)	1089 (0,02)	37245 (2,09)	387 (0,76)	5028 (0,26)
M43R/M47T/E81V/ L85R/K89N/A91T/ F92P/K93V/ R94L/ I118T/N149S						
R29D/Y31L/Q33H/ K36G/M38I/T41A/ M43R/M47T/E81V/ L85R/K89N/A91T/ F92P/K93V/R94L/ N144S/N149S	93	1065 (0,08)	956 (0,02)	30713 (1,72)	400 (0,79)	7943 (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)	47072 (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	1074 (0,08)	1022 (0,02)	1121 (0,06)	406 (0,80)	13146 (0,69)
R29D/Y31L/Q33H/ K36G/M38I/T41A/ M43R/M47T/E81V/ L85R/K89N/A91T/ F92P/K93V/R94L/ N149S	96	1018 (0,08)	974 (0,02)	25434 (1,43)	405 (0,80)	24029 (1,25)
R29V/M43Q/E81R/ L85I/K89R/D90L/ A91E/F92N/K93Q/ R94G	97	1029 (0,08)	996 (0,02)	1575 (0,09)	342 (0,67)	11695 (0,61)
T41I/A91G	98	17890 (1,35)	50624 (1,01)	12562 (0,70)	433 (0,85)	26052 (1,36)
E88D/K89R/D90K/A91 G/ F92Y/K93R/N122S/ N178S	537	41687 (3,15)	49429 (0,99)	20140 (1,13)	773 (1,52)	6345 (0,33)
E88D/K89R/D90K/A91 G/ F92Y/K93R	538	51663 (3,91)	72214 (1,44)	26405 (1,48)	1125 (2,21)	9356 (0,49)
K36G/K37Q/M38I/ L40M/F59L/E81V/L85R /K89N/A91T/F92P/ K93V/R94L/E99G/ T130A/N149S	539	1298 (0,10)	1271 (0,03)	3126 (0,18)	507 (1,00)	3095 (0,16)
AE88D/K89R/D90K/ A91G/F92Y/K93R	102	31535 (2,38)	50868 (1,02)	29077 (1,63)	944 (1,85)	5922 (0,31)
K36G/K37Q/M38I/ L40M	103	1170 (0,09)	1405 (0,03)	959 (0,05)	427 (0,84)	811 (0,04)
K36G/L40M	540	29766 (2,25)	58889 (1,18)	20143 (1,13)	699 (1,37)	30558 (1,59)
WTCD80	28	13224 (1,00)	50101 (1,00)	17846 (1,00)	509 (1,00)	19211 (1,00)

Пример 8. Получение и оценка стекловых молекул, содержащих различные домены с модифицированной аффинностью.

В этом примере дополнительно описаны иммуномодулирующие белки, которые были созданы в виде стекловых конструкций, содержащих, по меньшей мере, два различных домена с модифицированной аффинностью из идентифицированных вариантных полипептидов ICOSL и еще один дополнительный

вариант молекул CD80, CD86, ICOSL и NKp30, связанных между собой и слитых с Fc.

Отобранные варианты молекул, описанные выше, которые были модифицированы по аффинности к одному или нескольким контрструктурным лигандам, использовали для получения "стековой" молекулы (т.е. иммуномодулирующего белка типа II), содержащей два или более доменов IgSF с модифицированной аффинностью. Стековые конструкторы были получены в виде генных блоков (Integrated DNA Technologies, Коралвилл, Айова), которые кодируют стек в формате, который обеспечивает его слияние с Fc с помощью стандартной сборки Gibson с использованием сборочного набора Gibson (New England Biolabs).

Кодирующую молекулу нуклеиновой кислоты всех стеков получали для кодирования белка, сконструированного следующим образом: сигнальный пептид, за которым следует первый вариант IgV, за которым следует 15 аминокислотный линкер, который состоит из трех мотивов GGGGS (G4S) (SEQ ID NO: 228), за которым следует второй IgV, за которым следуют два линкера GGGGS (SEQ ID NO: 229), за которыми следуют три аланина (AAA), за которыми следует человеческий IgG1 Fc, как описано выше. Чтобы максимизировать вероятность правильного сворачивания доменов IgV в каждом стеке, первому IgV предшествовали все остатки, которые обычно встречаются в белке дикого типа между этим IgV и сигнальным пептидом (лидерная последовательность). Аналогичным образом, за первым IgV следовали все остатки, которые обычно связывают его в белке дикого типа, либо со следующим доменом Ig (обычно с доменом IgC), либо если такой второй домен IgV отсутствует, остатки, которые соединяют его с трансмембранным доменом (трейлерная последовательность). Тот же принцип дизайна был применен ко второму домену IgV, за исключением того, что, когда оба домена IgV были получены из одного и того же родительского белка (например, CD80 IgV в стеке с другим CD80 IgV), линкер между ними не дублировался.

В табл. 11 представлен дизайн примерных стековых конструкций. Примерные стековые молекулы, показанные в табл. 10, содержат домены Ig (например, домен IgV), как указано, и дополнительно трейлерные последовательности, как описано выше. В таблице представлены следующие компоненты: сигнальный пептид (SP, SEQ ID NO: 225), домен Ig 1 (например, Ig1), трейлерная последовательность 1 (TS1), линкер 1 (LR1, SEQ ID NO: 228), Ig-домен 2 (Ig2), трейлерная последовательность 2 (TS2), линкер 2 (LR2, SEQ ID NO: 230) и Fc-домен (SEQ ID NO: 226, содержащий аминокислотную замену C5S/R77C/N82G/V87C). В некоторых случаях между сигнальным пептидом и IgV1 присутствует лидерная последовательность 1 (LS1), и в некоторых случаях между линкером и IgV2 присутствует лидерная последовательность 2 (LS2).

Таблица 10

Аминокислотная последовательность (SEQ ID NO) компонентов
примерных стековых конструкций

	S P	Первый домен			LR 1	Второй домен			LR2	Fc
		LS1	Ig1	TS1		LS2	Ig2	TS2		
Домен 1: NKp30 WT	+	-	214	235	+	-	196	233	+	+
Домен 2: ICOSL WT										
Домен 1: NKp30 L30V/A60V/S6 4P/S86G	+	-	215	235	+	-	212	233	+	+
Домен 2: ICOSL N52S/N57Y/H9 4D/L96F/L98F/ Q100R										
Домен 1: NKp30 L30V/A60V/S6 4P/S86G)	+	-	215	235	+	-	199	233	+	+
Домен 2: ICOSL N52D										
Домен 1: NKp30 L30V/A60V/S6 4P/S86G	+	-	215	235	+	-	201	233	+	+
Домен 2: ICOSL N52H/N57Y/Q1 00P										
Домен 1: ICOSL WT	+	-	196	233	+	-	214	235	+	+
Домен 2: Nkp30 WT										
Домен 1: ICOSL N52D	+	-	199	233	+	-	215	235	+	+
Домен 2: NKp30 L30V/A60V/S6										

4P/S86G										
Домен 1: ICOSL N52H/N57Y/Q100P	+	-	201	233	+	-	215	235	+	+
Домен 2: NKp30 L30V/A60V/S64P/S86G										
Домен 1: CD80 WT	+	-	152	471	+	-	196	233	+	+
Домен 2: ICOSL WT										
Домен 1: CD80 E88D/K89R/D90K/A91G/F92Y/K93R										
Домен 2: ICOSL N52S/N57Y/H94D/L96F/L98F/Q100R/G103E/F120S	+	-	189	471	+	-	213	233	+	+
Домен 1: CD80 A12T/H18L/M43V/F59L/E77K/P109S/I118T										
Домен 2: ICOSL N52S/N57Y/H94D/L96F/L98F/Q100R/G103E/F120S	+	-	193	471	+	-	213	233	+	+
Домен 1: CD80 A12T/H18L/M43V/F59L/E77K/P109S/I118T	+	-	193	471	+	-	199	233	+	+
Домен 2: ICOSL N52D										
Домен 1: CD80 E88D/K89R/D90K/A91G/F92Y/K93R										
Домен 2: ICOSL N52H/N57Y/Q100P	+	-	189	471	+	-	201	233	+	+
Домен 1: CD80 A12T/H18L/M43V/F59L/E77K/P109S/I118T	+	-	193	471	+	-	201	233	+	+

Домен 2: ICOSL N52H/N57Y/Q1 00P										
Домен 1: ICOSL WT Домен 2: CD80 WT	+	-	196	233	+	-	152	471	+	+
Домен 1: ICOSL N52S/N57Y/H9 4D/L96F/L98F/ Q100R/G103E/ F120S Домен 2: CD80 E88D/K89R/D9 0K/A91G/F92Y/ K93R	+	-	213	233	+	-	189	471	+	+
Домен 1: ICOSL N52S/N57Y/H9 4D/L96F/L98F/ Q100R/G103E/ F120S Домен 2: CD80 A12T/H18L/M4 3V/F59L/E77K/ P109S/I118T	+	-	213	233	+	-	193	471	+	+
Домен 1: ICOSL N52D Домен 2: CD80 E88D/K89R/D9 0K/A91G/F92Y/ K93R	+	-	199	233	+	-	189	471	+	+
Домен 1: ICOSL N52D Домен 2: CD80 A12T/H18L/M4 3V/F59L/E77K/ P109S/I118T	+	-	199	233	+	-	193	471	+	+
Домен 1: ICOSL N52H/N57Y/Q1 00P Домен 2: CD80 E88D/K89R/D9 0K/A91G/F92Y/ K93R	+	-	201	233	+	-	189	471	+	+
Домен 1: ICOSL	+	-	201	233	+	-	193	471	+	+

N52H/N57Y/Q1 00P Домен 2: CD80 A12T/H18L/M4 3V/F59L/E77K/ P109S/I118T										
Домен 1: CD86 WT Домен 2: ICOSL WT	+	236	220	237	+	-	196	233	+	+
Домен 1: CD80 R29H/Y31H/T4 1G/Y87N/E88G/ K89E/D90N/A9 1G/P109S Домен 2: ICOSL N52S/N57Y/H9 4D/L96F/L98F/ Q100R/G103E/ F120S	+	-	192	471	+	-	213	233	+	+
Домен 1: CD80 I67T/L70Q/A91 G/T120S Домен 2: ICOSL N52S/N57Y/H9 4D/L96F/L98F/ Q100R/G103E/ F120S	+	-	175	471	+	-	213	233	+	+
Домен 1: CD80 R29H/Y31H/T4 1G/Y87N/E88G/ K89E/D90N/A9 1G/P109S Домен 2: ICOSL N52D	+	-	192	471	+	-	199	233	+	+
Домен 1: CD80 I67T/L70Q/A91 G/T120S Домен 2: ICOSL N52D	+	-	175	471	+	-	199	233	+	+
Домен 1: CD80 R29H/Y31H/T4 1G/Y87N/E88G/ K89E/D90N/A9 1G/P109S Домен 2: ICOSL N52H/N57Y/Q1	+	-	192	471	+	-	201	233	+	+

00P										
Домен 1: CD80 I67T/L70Q/A91 G/T120S Домен 2: ICOSL N52H/N57Y/Q1 00P	+	-	175	471	+	-	201	233	+	+
Домен 1: CD86 Q35H/H90L/Q1 02H Домен 2: ICOSL N52S/N57Y/H9 4D/L96F/L98F/ Q100R/G103E/ F120S	+	236	221	237	+	-	213	233	+	+
Домен 1: CD86 Q35H/H90L/Q1 02H Домен 2: ICOSL N52D	+	236	221	237	+	-	199	233	+	+
Домен 1: CD86 Q35H/H90L/Q1 02H Домен 2: ICOSL N52H/N57Y/Q1 00P	+	236	221	237	+	-	201	233	+	+
Домен 1: ICOSL WT Домен 2: CD86 WT	+	-	196	233	+	236	220	237	+	+
Домен 1: ICOSL N52S/N57Y/H9 4D/L96F/L98F/ Q100R/G103E/ F120S Домен 2: CD80 R29H/Y31H/T4 1G/Y87N/E88G/ K89E/D90N/A9 1G/P109S	+	-	213	233	+	-	192	471	+	+
Домен 1: ICOSL N52S/N57Y/H9 4D/L96F/L98F/ Q100R/G103E/ F120S Домен 2: CD80	+	-	213	233	+	-	175	471	+	+

I67T/L70Q/A91 G/T120S										
Домен 1: ICOSL N52D										
Домен 2: CD80 R29H/Y31H/T4 1G/Y87N/E88G/ K89E/D90N/A9 1G/P109S	+	-	199	233	+	-	192	471	+	+
Домен 1: ICOSL N52D										
Домен 2: CD80 I67T/L70Q/A91 G/T120S	+	-	199	233	+	-	175	471	+	+
Домен 1: ICOSL N52H/N57Y/Q1 00P										
Домен 2: CD80 R29H/Y31H/T4 1G/Y87N/E88G/ K89E/D90N/A9 1G/P109S	+	-	201	233	+	-	192	471	+	+
Домен 1: ICOSL N52S/N57Y/H9 4D/L96F/L98F/ Q100R/G103E/ F120S										
Домен 2: CD86 Q35H/H90L/Q1 02H	+	-	213	233	+	236	221	237	+	+
Домен 1: ICOSL N52D										
Домен 2: CD86 Q35H/H90L/Q1 02H	+	-	199	233	+	236	221	237	+	+
Домен 1: ICOSL N52H/N57Y/Q1 00P										
Домен 2: CD86 Q35H/H90L/Q1 02H	+	-	201	233	+	236	221	237	+	+

Крупномасштабную экспрессию и очистку вариантных слитых молекул белков IgV-в стеке-Fc, содержащих различные комбинации вариантных доменов IgV из CD80, CD86, ICOSL или Nkp30, содержащих, по меньшей мере, один домен IgV с модифицированной аффинностью, проводили, как описано в примере 5. Связывание вариантных слитых молекул белков IgV-в стеке-Fc с соответствующими контр-структурами и функциональную активность с помощью анализа коиммобилизации с анти-CD3 также оценивали, как описано в Примере 6. Например, костимулирующую биоактивность слитых стековых белков IgSF Fc определяли в аналогичном анализе с иммобилизованными анти-CD3, как описано выше. В этом случае 4 нМ анти-CD3 (OKT3, Biolegend, США) коиммобилизовали с 4-120 нМ человеческого rB7-H6.Fc (R & D Systems, США) или человеческого rPD-L1.Fc (R & D Systems, США) в течение ночи в 96-луночных обработанных планшетах для тканевых культур (Corning, США). На следующий день несвязанный белок смывали PBS и 100 000 очищенных пан-Т-клеток добавляли в каждую лунку в 100 мкл среды Ex-Vivo 15 (Lonza, Швейцария). Стековые домены IgSF затем добавляли в концентрациях от 8 до 40 нМ в объеме 100 мкл до общего объема 200 мкл. Клетки культивировали за 3 дня до сбора культуральных надосадочных жидкостей и измерения уровней IFN-гамма человека с помощью набора DuoSet ELISA (R & D Systems, США), как упомянуто выше.

Результаты приведены в табл. 11-13. В частности, в табл. 11 приведены результаты связывания и функциональной активности вариантных слитых молекул белков IgV-в стеке Fc, содержащих домен NKp30 IgV и домен ICOSL IgV. В табл. 12 и 13 представлены результаты связывания и функциональной активности для вариантных слитых молекул белков с IgV-в стеке-Fc, содержащих вариантный домен ICOSL IgV и вариантные домены Ig80 IgV или CD86 IgV.

Для каждой из табл. 11-13 в столбце 1 показана структурная организация и ориентация доменов в стеке с модифицированной аффинностью или доменов дикого типа (WT), с аминоконцевым (N-концевым) доменом, за которым следует средний домен WT или домен с модифицированной аффинностью, расположенных перед C-концевыми доменами человеческого IgG1 Fc. Столбец 2 показывает иден-

тификатор SEQ ID NO для последовательности каждого домена IgV, содержащегося в соответствующей молекуле "в стеке". В столбце 3 показаны партнеры по связыванию, против которых были отобраны указанные стековые домены с модифицированной аффинностью из столбца 1.

Также показана активность связывания, измеренная по значению средней интенсивности флуоресценции (MFI) для связывания каждой стековой молекулы, с клетками, сконструированными для экспрессии различных контрструктурных лигандов и соотношение MFI по сравнению со связыванием соответствующей стековой молекулы, содержащей немодифицированные домены IgV, которые не включают аминокислотную замену(ы), с тем же самым контрструктурным лигандом, экспрессируемым клетками. Функциональная активность вариантных стековых молекул для модуляции активности Т-клеток также показана на основе рассчитанных уровней IFN-гамма в культуральных надосадочных жидкостях (пг/мл), полученных с помощью указанной вариантной стековой молекулы и соответствующего лиганда, коиммобилизованного с анти-CD3, как описано в примере 6. В таблицах также отображено соотношение IFN-гамма, продуцируемого каждой вариантной стековой молекулой по сравнению с соответствующей немодифицированной стековой молекулой в анализе коиммобилизации.

Как показано, результаты продемонстрировали, что возможно создание стековых молекул, содержащих, по меньшей мере, одни вариантные домены IgSF, которые обладают активностью с модифицированной аффинностью повышенного связывания, по меньшей мере, с одним когнатным контрструктурным лигандом по сравнению с соответствующей стековой молекулой, содержащей аналогичный немодифицированный домен IgV (например, дикого типа). В некоторых случаях стековая молекула, либо из одного, либо из комбинации обоих вариантных доменов IgSF в молекуле, демонстрирует повышенное связывание более чем с одним когнатным контрструктурным лигандом. Результаты также показали, что порядок доменов IgV в стековых молекулах может в некоторых случаях изменять степень повышенной активности связывания. В некоторых случаях активность функциональных Т-клеток также была изменена при оценке в целевом коиммобилизационном анализе.

Таблица 11

Стековые вариантные слитые белки IgV Fc, включающие домен NKp30 IgV
и домен ICOSL IgV

Структура Домена от N-конца к С-концу: домен 1/домен 2/Fc	SEQ ID NO (домен Ig)	Контр- структу- ра, отоб- ранная против	Активность связывания			Анализ коиммобилиза- ции с анти-CD3 пг/мл IFN-гамма (соотношение IFN-гамма к исходному дикому типу)
			B7H6 MFI (соотно- шение MFI к исход- ному ди- кому типу)	ICOS MFI (соотно- шение MFI к исход- ному дикому типу)	CD28 MFI (соотно- шение MFI к исход- ному дикому типу)	
Домен 1: NKp30 WT Домен 2: ICOSL WT	214 196	-	64538 (1,00)	26235 (1,00)	6337 (1,00)	235 (1,00)
Домен 1: NKp30 L30V/A60V/S64P/S8 6G Домен 2: ICOSL N52S N57Y H94D L96F L98F Q100R	215 212	B7-H6 ICOS- CD28	59684 (0,92)	12762 (0,49)	9775 (1,54)	214 (0,91)
Домен 1: NKp30 L30V/A60V/S64P/S8 6G Домен 2: ICOSL N52D	215 199	B7-H6 ICOS- CD28	65470 (1,01)	30272 (1,15)	9505 (1,50)	219 (0,93)
Домен 1: NKp30 L30V/A60V/S64P/S8 6G Домен 2: ICOSL N52H N57Y Q100P	215 201	B7-H6 ICOS- CD28	38153 (0,59)	27903 (1,06)	11300 (1,78)	189 (0,80)
Домен 1: ICOSL WT Домен 2: Nkp30 WT	196 214	-	117853 (1,0)	70320 (1,0)	7916 (1,0)	231 (1,0)
Домен 1: ICOSL N52D Домен 2: NKp30 L30V/A60V/S64P/S8 6G	199 215	ICOS- CD28 B7-H6	100396 (0,85)	83912 (1,19)	20778 (2,62)	228 (0,98)
Домен 1: ICOSL N52H/N57Y/Q100P Домен 2: NKp30 L30V/A60V/S64P/S8 6G	201 215	ICOS- CD28 B7-H6	82792 (0,70)	68874 (0,98)	72269 (9,12)	561 (2,43)

Таблица 12

Стековые варианты слитые белки IgV Fc, включающие домен CD80 IgV и домен ICOSL IgV

Структура Домена от N-конца к С-концу: домен 1/домен 2/Fc	SEQ ID NO (домен Ig)	Контрст- руктура, отобран- ная против	Активность связывания			Анализ коиммобилиза- ции с анти-CD3 пг/мл IFN-гамма (соотношение IFN-гамма к исходному дикому типу)
			CD28 MFI (соотно- шение MFI к исходно- му дикому типу)	PD-L1 MFI (соотно- шение MFI к исходно- му дикому типу)	ICOS MFI (соотно- шение MFI к исходно- му дикому типу)	
Домен 1: CD80 WT Домен 2: ICOSL WT	152 196		1230 (1,00)	2657 (1,00)	11122 (1,00)	69 (1,00)
Домен 1: CD80 E88D/K89R/D90K/A 91G/F92Y/K93R Домен 2: ICOSL N52S/N57Y/H94D/L9 6F/L98F/Q100R/G103 E/F120S	189 213	PD-L1 ICOS/CD 28	 3383 (2,75)	 4515 (1,70)	 5158 (0,46)	 90 (1,30)
Домен 1: CD80 A12T/H18L/M43V/F5 9L/E77K/P109S/I118 T Домен 2: ICOSL N52S/N57Y/H94D/L9 6F/L98F/Q100R/G103	193 213	PD-L1 ICOS/CD 28	 2230 (1,81)	 2148 (0,81)	 3860 (0,35)	 112 (1,62)

E/F120S						
Домен 1: CD80 A12T/H18L/M43V/F5 9L/E77K/P109S/I118 T	193	PD-L1				
Домен 2: ICOSL N52D	199	ICOS/CD 28	5665 (4,61)	6446 (2,43)	15730 (1,41)	126 (1,83)
Домен 1: CD80 E88D/K89R/D90K/A 91G/F92Y/K93R	189	PD-L1				
Домен 2: ICOSL N52H/N57Y/Q100P	201	ICOS/CD 28	6260 (5,09)	4543 (1,71)	11995 (1,08)	269 (3,90)
Домен 1: CD80 A12T/H18L/M43V/F5 9L/E77K/P109S/I118 T	193	PD-L1				
Домен 2: ICOSL N52H/N57Y/Q100P	201	ICOS/CD 28	3359 (2,73)	3874 (1,46)	8541 (0,77)	97 (1,41)
Домен 1: ICOSL WT	196					
Домен 2: CD80 WT	152		3000 (1,00)	2966 (1,00)	14366 (1,00)	101 (1,00)
Домен 1: ICOSL N52S/N57Y/H94D/L9 6F/L98F/Q100R/G103 E/F120S	213	ICOS/CD 28				
Домен 2: CD80 E88D/K89R/D90K/A 91G/F92Y/K93R	189	PD-L1	3634 (1,21)	4893 (1,65)	6403 (0,45)	123 (1,22)
Домен 1: ICOSL N52S/N57Y/H94D/L9 6F/L98F/Q100R/G103 E/F120S	213	ICOS/CD 28				
Домен 2: CD80 A12T/H18L/M43V/F5 9L/E77K/P109S/I118 T	193	PD-L1	1095 (0,37)	5929 (2,0)	7923 (0,55)	127 (1,26)
Домен 1: ICOSL N52D	199	ICOS/CD 28				
Домен 2: CD80 E88D/K89R/D90K/A 91G/F92Y/K93R	189	PD-L1	2023 (0,67)	5093 (1,72)	16987 (1,18)	125 (1,24)
Домен 1: ICOSL N52D	199	ICOS/CD 28				
Домен 2: CD80 A12T/H18L/M43V/F5 9L/E77K/P109S/I118 T	193	PD-L1	3441 (1,15)	3414 (1,15)	20889 (1,45)	165 (1,63)
Домен 1: ICOSL N52H/N57Y/Q100P	201	ICOS/CD 28				
Домен 2: CD80 E88D/K89R/D90K/A 91G/F92Y/K93R	189	PD-L1	7835 (2,61)	6634 (2,24)	20779 (1,45)	95 (0,94)
Домен 1: ICOSL N52H/N57Y/Q100P	201	ICOS/CD 28				
Домен 2: CD80 A12T/H18L/M43V/F5 9L/E77K/P109S/I118 T	193	PD-L1	8472 (2,82)	3789 (1,28)	13974 (0,97)	106 (1,05)

Таблица 13

Стековые варианты слитые белки IgV Fc, включающие домен CD80
или домен CD86 IgV и домен ICOSL IgV

Структура Домена от N-конца к С-концу: домен 1/домен 2/Fc	SEQ NO (домен Ig)	ID	Контрст- руктура, отобран- ная против	Активность связывания		Функциональная Активность MLR IFN-гамма пг/мл
				PD-L1 MFI (соотношение MFI к исходному дикому типу)	CTLA-4 MFI (соотношение MFI к исходному дикому типу)	
Домен 1: CD80 WT	152			1230	11122	1756
Домен 2: ICOSL WT	196			(1,00)	(1,00)	(1,00)
Домен 1: CD86 WT	220			29343	55193	6305
Домен 2: ICOSL WT	196			(1,00)	(1,00)	(1,00)
Домен 1: CD80 R29H/Y31H/T41G/Y 87N/E88G/K89E/D90 N/A91G/P109S	192		CD28			
Домен 2: ICOSL N52S/N57Y/H94D/L9 6F/L98F/Q100R/G103 E/F120S	213		ICOS/CD 28	2280 (1,85)	3181 (0,29)	2281 (1,30)
Домен 1: CD80 I67T/L70Q/A91G/T12 0S	175		CD28			
Домен 2: ICOSL N52S/N57Y/H94D/L9 6F/L98F/Q100R/G103 E/F120S	213		ICOS/CD 28	2309 (1,88)	26982 (2,43)	1561 (0,89)
Домен 1: CD80 R29H/Y31H/T41G/Y 87N/E88G/K89E/D90 N/A91G/P109S	192		CD28			
Домен 2: ICOSL N52D	199		ICOS/CD 28	4285 (3,48)	22744 (2,04)	1612 (0,92)
Домен 1: CD80 I67T/L70Q/A91G/T12 0S	175		CD28			
Домен 2: ICOSL N52D	199		ICOS/CD 28	3024 (2,46)	16916 (1,52)	3857 (2,20)
Домен 1: CD80 R29H/Y31H/T41G/Y 87N/E88G/K89E/D90 N/A91G/P109S	192		CD28			
Домен 2: ICOSL N52H/N57Y/Q100P	201		ICOS/CD 28	6503 (5,29)	7240 (0,65)	6886 (3,92)

Домен 1: CD80 I67T/L70Q/A91G/T12 0S	175	CD28			
Домен 2: ICOSL N52H/N57Y/Q100P	201	ICOS/CD 28	3110 (2,53)	4848 (0,44)	3393 (1,93)
Домен 1: CD86 Q35H/H90L/Q102H	221	CD28			
Домен 2: ICOSL N52S/N57Y/H94D/L9 6F/L98F/Q100R/G103 E/F120S	213	ICOS/CD 28	11662 (0,40)	21165 (0,38)	880 (0,14)
Домен 1: CD86 Q35H/H90L/Q102H	221	CD28			
Домен 2: ICOSL N52D	199	ICOS/CD 28	24230 (0,83)	73287 (1,33)	1110 (0,18)
Домен 1: CD86 Q35H/H90L/Q102H	221	CD28			
Домен 2: ICOSL N52H/N57Y/Q100P	201	ICOS/CD 28	1962 (0,07)	1630 (0,03)	587 (0,09)
Домен 1: ICOSL WT	196		3000 (1,00)	14366 (1,00)	4113 (1,00)
Домен 2: CD80 WT	152				
Домен 1: ICOSL WT	196		18005 (1,00)	53602 (1,00)	18393 (1,00)
Домен 2: CD86 WT	220				
Домен 1: ICOSL N52S/N57Y/H94D/L9 6F/L98F/Q100R/G103 E/F120S	213	ICOS/CD 28			
Домен 2: CD80 R29H/Y31H/T41G/Y 87N/E88G/K89E/D90 N/A91G/P109S	192	CD28	10426 (3,48)	51286 (3,57)	18680 (4,54)
Домен 1: ICOSL N52S/N57Y/H94D/L9 6F/L98F/Q100R/G103 E/F120S	213	ICOS/CD 28			
Домен 2: CD80 I67T/L70Q/A91G/T12 0S	175	CD28	17751 (5,92)	29790 (2,07)	10637 (2,59)
Домен 1: ICOSL N52D	199	ICOS/CD 28			
Домен 2: CD80 R29H/Y31H/T41G/Y 87N/E88G/K89E/D90 N/A91G/P109S	192	CD28	2788 (0,93)	25870 (1,80)	6205 (1,51)
Домен 1: ICOSL N52D	199	ICOS/CD 28			
Домен 2: CD80 I67T/L70Q/A91G/T12 0S	175	CD28	2522 (0,84)	13569 (0,94)	5447 (1,32)
Домен 1: ICOSL N52H/N57Y/Q100P	201	ICOS/CD 28	9701 (3,23)	9187 (0,64)	5690 (1,38)
Домен 2: CD80 R29H/Y31H/T41G/Y 87N/E88G/K89E/D90 N/A91G/P109S	192				
Домен 1: ICOSL N52S/N57Y/H94D/L9 6F/L98F/Q100R/G103 E/F120S	213	ICOS/CD 28			
Домен 2: CD86 Q35H/H90L/Q102H	221	CD28	27050 (1,50)	21257 (0,40)	8131 (0,44)
Домен 1: ICOSL N52D	199	ICOS/CD 28			
Домен 2: CD86 Q35H/H90L/Q102H	221	CD28	34803 (1,93)	80210 (1,50)	6747 (0,37)
Домен 1: ICOSL N52H/N57Y/Q100P	201	ICOS/CD 28	5948 (0,33)	4268 (0,08)	26219 (1,43)
Домен 2: CD86 Q35H/H90L/Q102H	221	CD28			

Пример 9. Получение и оценка сконструированных клеток, экспрессирующих трансмембранный иммуномодулирующий белок.

Были сконструированы Т-клетки, в которых трансмембранный иммуномодулирующий белок (TIP),

включающий внеклеточный домен (ECD), содержащий либо вариант CD80, как описано выше, либо домен IgSF с модифицированной аффинностью из ICOSL, были совместно экспрессированы с химерным антигенным рецептором (CAR). TIP также содержал трансмембранный домен и цитоплазматический домен соответствующей последовательности трансмембранного белка CD80 или ICOSL дикого типа. Иммуномодулирующую активность сконструированных клеток сравнивали с клетками, которые экспрессировали только CAR или клетки, которые совместно экспрессировали соответствующий трансмембранный белок CD80 или ICOSL дикого типа с CAR.

Примерный CD80-TIP представляет собой вариантный CD80, имеющий домен IgSF с модифицированной аффинностью, содержащий аминокислотные мутации в доменах IgV и IgC, соответствующие I67T/L70Q/A91G/T120S, относительно положений во внеклеточном домене CD80, представленном в SEQ ID NO: 28 и трансмембранном и цитоплазматическом домене, соответствующем остаткам 243-288 в SEQ ID NO: 1. Аминокислотная последовательность примерного CD80-TIP изложена в SEQ ID NO: 241 и кодируется последовательностью нуклеотидов, представленной в SEQ ID NO: 242. Соответствующий трансмембранный белок CD80 дикого типа имел аминокислотную последовательность, представленную как аминокислотные остатки 35-288 в SEQ ID NO: 1 и кодировался аминокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 251.

Примерный ICOSL-TIP представляет собой вариантный ICOSL, имеющий домен IgSF с модифицированной аффинностью, содержащий аминокислотные мутации в домене IgV, соответствующие N52H/I143T, относительно положений во внеклеточном домене ICOSL, указанном в SEQ ID NO: 32, и в трансмембранном и цитоплазматическом домене, соответствующем остаткам 257-302 в SEQ ID NO: 5. Аминокислотная последовательность примерного ICOSL-TIP представлена в SEQ ID NO: 243 и кодируется последовательностью нуклеотидов, представленной в SEQ ID NO: 244. Соответствующий трансмембранный белок ICOSL дикого типа имел аминокислотную последовательность, обозначенную как аминокислотные остатки 19-302 в SEQ ID NO: 5 и кодировался последовательностью аминокислот, представленной в SEQ ID NO: 252.

TIP, содержащий домен с модифицированной аффинностью или трансмембранный белок дикого типа, содержащий соответствующий домен IgSF с немодифицированной аффинностью, был совместно экспрессирован в Т-клетках с химерным антигенным рецептором 1-го поколения (CAR), содержащим внутриклеточный сигнальный домен CD3 дзета. CAR 1-го поколения включал ScFv, специфический для CD19 (SEQ ID NO: 245), шарнирный и трансмембранный домен, полученный из CD8 (SEQ ID NO: 246), и внутриклеточный сигнальный домен, полученный из CD3 дзета (из SEQ ID NO: 47). Нуклеотидная последовательность, кодирующая CD19 scFv-CD3 дзета CAR, представлена в SEQ ID NO: 248, а аминокислотная последовательность CAR19 scFv-CD3 дзета CD19 представлена в SEQ ID NO: 479.

Были получены нуклеотидные молекулы, кодирующие CAR отдельно, или также кодирующие один из примерных TIP или трансмембранные белки дикого типа, отделенных от CAR посредством саморасщепляющейся последовательности T2A (SEQ ID NO: 250 и кодируемые нуклеотидной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 249). Примеры конструкторов содержат нуклеотидные последовательности, приведенные в табл. 14. Также в качестве контроля была создана нуклеотидная конструкция, кодирующая CAR 2-го поколения, дополнительно содержащая костимулирующий домен CD28 (CD19 scFv-CD28-CD3 дзета).

Таблица 14

Нуклеотидные конструкторы

	CAR (SEQ ID NO)	Линкер T2A (SEQ ID NO)	TIP (SEQ ID NO)
CD19 scFv – CD3 дзета	+	-	-
	(248)		
CD19 scFv – CD3 дзета – T2A – B7-1	+	+	CD80 дикого типа
	(248)	(249)	(251)
CD19 scFv – CD3 дзета – T2A – B7-1 TIP	+	+	CD80 TIP
	(248)	(249)	(242)
CD19 scFv – CD3 дзета – T2A – ICOSL	+	+	ICOSL дикого типа
	(248)	(249)	(252)
CD19 scFv – CD3 дзета – T2A – ICOSL TIP	+	+	ICOSL TIP
	(248)	(249)	(244)

Нуклеотидные молекулы индивидуально клонировали в лентивирусный вектор, который использовали для трансдукции Т-клеток, выделенных из образцов PBMC человека, полученных от трех разных здоровых доноров. Лентивирусные частицы, содержащие нуклеотидные последовательности, получали после совместной трансфекции клеток HEK293 с помощью векторов и конструкций для упаковки лентивирусов. Лентивирусные частицы собирали из культуральной среды ультрацентрифугированием и титровали с помощью qRT-PCR. Мононуклеарные клетки периферической крови человека (PBMC) выделяли из трех нормальных доноров крови с использованием осаждения в градиенте плотности. PBMC культивировали в течение ночи с анти-CD3 и анти-CD28 антителами и IL-2, затем трансдуцировали препара-

тами лентивируса при множественности заражения 5:1. Лентивирусные векторы, кодирующие контрольный CAR 2-го поколения, использовали только для трансдуцирования клеток от одного донора.

Через две недели (14 дней) культивирования клетки анализировали на цитотоксичность после совместного культивирования с целевыми антиген-экспрессирующими клетками с использованием анализатора клеток Acea Real-Time Cell Analyzer (RTCA), который измеряет вариации импеданса в культуральной среде 96-луночного микроэлектронного планшета (E-plate), и показывает изменения в количестве клеток и морфологии клеток в графике реального времени. CD19-экспрессирующие клетки-мишени HeLa (HeLa-CD19) высевали в 96-луночный E-планшет, и импеданс каждого монослоя контролировали в течение 24 ч с помощью системы RTCA. Сконструированные Т-клетки добавляли к лункам при соотношении эффектор-мишень 10:1, и отслеживали лунки еще 48 ч. Результаты были отображены и записаны как значение клеточного индекса (CI, Cell Index), полученное из изменения измеренного электрического импеданса, и затем были преобразованы путем деления показаний CI всех лунок во всех временных точках на значение CI индивидуальных лунок в одно и то же время (исходный момент времени) для получения нормализованного значения клеточного индекса, представляющего процент значения в исходный момент времени (см. Zhang et al. "Introduction to the Data Analysis of the Roche xCELLigence® System with RTCA Package." Bioconductor. May, 3, 2016, bioconductor.org/packages/devel/bioc/vignettes/RTCA/inst/doc/aboutRTCA.pdf. Доступно с 9 сентября 2016 г.). В этом анализе уменьшение импеданса монослоя отражает уничтожение клеток-мишеней с помощью трансдуцированных клеток.

Результаты показали, что снижение импеданса наблюдалась в клетках, экспрессирующих CAR 1-го поколения по сравнению с нетрансдуцированными Т-клетками, хотя степень снижения импеданса для клеток, экспрессирующих CAR 1-го поколения, была меньше, чем для клеток, экспрессирующих CAR 2-го поколения. Снижение импеданса в клетках, экспрессирующих CAR 1-го поколения продолжалось вплоть до 8 ч анализа, тогда как импеданс CAR-экспрессирующих клеток 2-го поколения продолжало снижаться и после этого.

Как показано на фиг. 2, у одного донора, каждая из клеток, ко-экспрессирующих TIP или соответствующий трансмембранный белок дикого типа с CAR 1-го поколения, демонстрирует большее уменьшение импеданса, что указывает на большую цитотоксическую активность, по сравнению с клетками, экспрессирующими только CAR 1-го поколения. Кроме того, результаты показали, что цитотоксическая активность была большей в CAR-экспрессирующих клетках, которые совместно экспрессировали CD80-TIP или ICOSL-TIP относительно CAR-экспрессирующих клеток, которые совместно экспрессировали соответствующие трансмембранные белки CD80 или ICOSL дикого типа, содержащие домен IgSF с немодифицированной аффинностью. Наблюдаемые результаты этих сконструированных клеток с TIP показали, что цитотоксическая активность в клетках, коэкспрессирующих CD80-TIP или ICOSL-TIP с CAR, проявляет повышенную активность для модуляции цитотоксического иммунного ответа антигенспецифических Т-клеток, таких как CAR-экспрессирующие Т-клетки.

У двух других доноров клетки экспрессирующие CD80-TIP не приводили к намного более снижению импедансу по сравнению с клетками, экспрессирующими соответствующий трансмембранный белок CD80 дикого типа. У одного донора было недостаточно клеток для трансдукции трансмембранным белковым конструктором дикого типа, хотя у этого донора ICOSL-TIP обеспечивал лучшую цитотоксичность по сравнению с другими тестируемыми конструктами. В другом доноре клетки, экспрессирующие ICOSL-TIP, не приводили к более снижению импедансу по сравнению с клетками, экспрессирующими соответствующий трансмембранный белок ICOSL дикого типа. В тестируемых клетках все клетки, ко-экспрессирующие либо CD80-TIP, ICOSL-TIP, либо соответствующий трансмембранный белок дикого типа с CAR, проявляли большую цитотоксическую активность, чем клетки, экспрессирующие только CAR первого поколения. Различия в результатах, наблюдаемых среди доноров, могут быть связаны с различиями в Т-клетках среди доноров, различиями в уровнях экспрессии различных сконструированных белков на поверхности клеток, конкретными условиями, используемыми в этом примерном анализе для оценки цитолиза клеток (например, при оценке трансформированных клеток 14-го дня, при оценке отношения одиночный эффектор:клетка-мишень) или другими факторами.

Пример 10. Оценка связывания и активности доменных вариантов ICOSL IgSF.

Дополнительные варианты ECD ICOSL идентифицировали с помощью способа селекции дрожжей, по существу, как описано выше, и использовали для получения слитых белков ECD-Fc, как описано в примере 5. Были проведены исследования связывания для оценки специфичности и аффинности иммуномодулирующих белков с доменом ICOSL для когнатных партнеров связывания по существу так, как описано в примере 6.

А. Связывание и функциональная характеристика.

Связывание оценивали с клетками, экспрессирующими полноразмерные когнатные партнеры связывания CD28, ICOS и CTLA-4, по существу, как описано в примере 6. Биоактивность вариантов ECD ICOSL также оценивали в анализе коиммобилизации с анти-CD3 или реакции смешанных лимфоцитов человека (MLR) по существу, как описано в примере 6, за исключением того, что для анализа коиммобилизации костимулирующую активность определяли культурой человеческих Т-клеток со смесью 10 нМ

связанных с планшетом антител против CD3 и 40 нМ ICOSL Fc.

В табл. 15 показаны примерные результаты для дополнительных вариантов домена ICOSL IgSF по связыванию с контрструктурами, экспрессируемыми клетками, и по биоактивности в анализе коиммобилизации с анти-CD3 или MLR-анализе. Примерные аминокислотные замены, изображенные в табл. 15, обозначены номером аминокислотного положения, соответствующего аналогичной эталонной немодифицированной последовательности ICOSL ECD, представленной в SEQ ID NO: 32. Положение аминокислоты указывается посередине с соответствующей немодифицированной (например, дикого типа) аминокислотой, указанной перед номером, и идентифицированной аминокислотной заменой, указанной после номера. В столбце 2 указан идентификатор SEQ ID NO для варианта ECD для каждой вариантной молекулы слитого белка ECD-Fc.

Результаты, представленные в табл. 15, показывают активность связывания, измеренную с помощью значения средней интенсивности флуоресценции (MFI) для связывания каждой вариантной слитой с Fc белковой молекулы с клетками, сконструированными для экспрессии когнатного контрструктурного лиганда и отношение MFI по сравнению со связыванием соответствующей немодифицированной молекулы слитого белка ECD-Fc, не содержащей аминокислотных замен, с тем же контрструктурным лигандом, экспрессируемым клетками. Функциональная активность вариантных слитых с Fc молекул для модуляции активности Т-клеток также показана на основе рассчитанных уровней IFN-гамма в культуральных надосадочных жидкостях (пг/мл), получаемых либо i) с указанной вариантной молекулой слитого белка ECD-Fc, коиммобилизованной с анти-CD3 либо ii) с указанной вариантной молекулой слитого белка ECD-Fc в анализе MLR. В Таблице также показано отношение IFN-гамма, вырабатываемое каждым вариантом ECD-Fc, по сравнению с соответствующим немодифицированным (родительским) ECD-Fc в обоих функциональных анализах.

Результаты показывают, измененную, в том числе увеличенную, аффинность связывания доменных вариантов ICOSL IgSF с модифицированной аффинностью, по меньшей мере, с одним когнатным контрструктурным лигандом, и/или улучшение иммунологической активности. В частности, аналогично исходным полученным вариантам, указанным в примере 6, выбор привел к идентификации ряда дополнительных вариантов домена ICOSL IgSF, которые были модифицированы по аффинности, которые проявляют повышенное связывание, по меньшей мере, с одним, а в некоторых случаях более чем с одним когнатным контрструктурным лигандом. Кроме того, результаты показали, что аффинная модификация вариантных молекул также демонстрирует улучшенные активности как для увеличения, так и для уменьшения иммунологической активности в зависимости от формата молекулы, как описано в примере 6.

Таблица 15

Варианты ICOSL: данные связывания и данные костимулирующей активности

Мутация(ии) ICOSL	SEQ ID NO (ECD)	ICOS tfxn MFI (исходное соотношение)	CD28 tfxn MFI (исходное соотношение)	CTLA-4 tfxn MFI (исходное соотношение)	IFN-гамма Анти-CD3 анализ коиммобилизации и пг/мл (исходное соотношение)	MLR IFN-гамма пг/мл (исходное соотношение)
N52H, F78L, Q100R, C198R	373	9568 (0,12)	1966 (0,24)	1454 (0,12)	130 (0,31)	5927 (1,84)
N52H, N57Y, Q100R, V110D, C198R, S212G	364	9418 (1,16)	136665 (16,55)	115352 (9,59)	944 (2,21)	821 (0,25)
N52H, N57Y, R75Q, Q100P, V110D	374	5558 (0,07)	7465 (0,90)	4689 (0,39)	122 (0,28)	1136 (0,35)
N52H, N57Y, Q100R, C198R	365	9148 (1,13)	134923 (16,33)	83241 (6,92)	1060 (2,48)	375 (0,12)
N52H, N57Y, L74Q,	375	9448	128342	123510	1137	889 (0,28)

V110D, S192G		(1,17)	(15,54)	(10,26)	(2,66)	
N52H, Q100R	285	9478 (1,17)	151977 (18,40)	133929 (11,13)	972 (2,28)	794 (0,25)
N52H, S121G, C198R	376	9128 (1,13)	124732 (15,10)	182607 (15,18)	827 (1,94)	1257 (0,39)
A20V, N52H, N57Y, Q100R, S109G	287	5828 (0,72)	76973 (9,32)	73640 (6,12)	447 (1,05)	2283 (0,71)
N52H, N57Y, Q100P, C198R	461	9548 (1,18)	130676 (15,82)	81966 (6,81)	1125 (2,64)	643 (0,20)
N52H, N57Y, R61S, Q100R, V110D, L173S	289	1018 (0,13)	9129 (1,11)	5790 (0,48)	109 (0,25)	5094 (1,58)
N52H, N57Y, Q100R, V122A	290	9978 (1,23)	137372 (16,63)	70764 (5,88)	1316 (3,08)	473 (0,15)
N52H, N57Y, Q100R, F172S	291	1028 (1,27)	135821 (16,44)	73320 (6,09)	1561 (3,66)	486 (0,15)
N52H, N57Y, Q100R	283	9858 (1,22)	140612 (17,02)	75106 (6,24)	1648 (3,86)	778 (0,24)
N52S, F120S, N227K	377	9438 (1,17)	67796 (8,21)	82370 (6,85)	1157 (2,71)	1626 (0,50)
N52S, N194D	366	9798 (1,21)	59431 (7,19)	74502 (6,19)	1671 (3,91)	1690 (0,52)
N52S, V97A	294	3138 (0,04)	1733 (0,21)	1541 (0,13)	84 (0,20)	3858 (1,20)
N52S, F120S	293	9068 (1,12)	67233 (8,14)	97880 (8,13)	1178 (2,76)	2814 (0,87)
N52S, G72R	295	9288 (1,15)	51638 (6,25)	62339 (5,18)	1161 (2,72)	2947 (0,91)
N52S, A71T, A117T, T190A, C198R	378	8918 (1,10)	44044 (5,33)	56646 (4,71)	1076 (2,52)	4031 (1,25)
N52S, E220G	297	3878 (0,05)	2047 (0,25)	1796 (0,15)	122 (0,29)	1927 (0,60)
Y47H, N52S, V107A, F120S	298	3268 (0,04)	2562 (0,31)	2104 (0,17)	334 (0,78)	4390 (1,36)
WT ICOSL	32	8088 (1,00)	8260 (1,00)	12033 (1,00)	427 (1,00)	3226 (1,00)
T43A, N52H, N57Y, L74Q, D89G, V110D, F172S	379	2821 (0,02)	2180 (0,49)	2051 (0,12)	184 (0,75)	
N52H, N57Y, Q100R,	381	174586	122383	76202	985 (4,01)	1037

V107I, V110D, S132F, I154F, C198R, R221G		(0,97)	(27,24)	(4,31)		(0,36)
E16V, N52H, N57Y, Q100R, V110D, H115R, Y152C, K156M, C198R	300	190765 (1,05)	129070 (28,73)	68488 (3,87)	4288 (17,46)	1225 (0,43)
Q37R, N52H, N57Y, Q100R, V110N, S142F, C198R, D217V, R221G	301	148638 (0,82)	91104 (20,28)	13498 (0,76)	62 (0,25)	7643 (2,68)
N52H, N57Y, Q100R, V110D, C198R	302	179194 (0,99)	123312 (27,45)	84136 (4,76)	762 (3,10)	1342 (0,47)
N52H, N57Y, Q100R, V110D, V116A, L161M, F172S, S192G, C198R	303	5236 (0,03)	4160 (0,93)	3305 (0,19)	49 (0,20)	2039 (0,72)
F27S, N52H, N57Y, V110N	304	20154 (0,11)	8613 (1,92)	3903 (0,22)	83 (0,34)	7522 (2,64)
F27S, N52H, N57Y, V110N	304	5236 (0,03)	4160 (0,93)	2957 (0,17)	40 (0,16)	-
N52S, H94E, L96I, S109N, L166Q,	305	198604 (1,10)	100361 (22,34)	102892 (5,82)	1253 (5,10)	5645 (1,98)
S18R, N52S, F93L, I143V, R221G	306	154561 (0,85)	7625 (1,70)	4254 (0,24)	203 (0,83)	5239 (1,84)
A20T, N52D, Y146C, Q164L	307	149661 (0,83)	9073 (2,02)	6901 (0,39)	287 (1,17)	4829 (1,69)
V11E, N30D, N52H, N57Y, H94E, L96I, L98F, N194D, V210A, I218T	308	180016 (1,00)	120230 (26,76)	62809 (3,55)	2218 (9,03)	7283 (2,56)
N52S, H94E, L96I, V122M	309	198717 (1,10)	88901 (19,79)	94231 (5,33)	590 (2,40)	618 (0,22)
N52H, N57Y, H94E, L96I, F120I, S126T, W153R, I218N	310	87711 (0,48)	42035 (9,36)	31798 (1,80)	67 (0,27)	2500 (0,88)
M10V, S18R, N30D, N52S, S126R, T139S, L203F	311	180665 (1,00)	64929 (14,45)	48362 (2,73)	1193 (4,86)	13647 (4,79)
S25G, N30D, N52S, F120S, N227K	312	178834 (0,99)	66127 (14,72)	46631 (2,64)	1246 (5,07)	2202 (0,77)
N30D, N52S, L67P, Q100K, D217G, R221K, T225S	313	18630 (0,10)	1986 (0,44)	1940 (0,11)	54 (0,22)	2752 (0,97)

WT ICOSL	32	180900 (1,00)	4493 (1,00)	17685 (1,00)	246 (1,00)	2850 (1,00)
N52H, N57Y, Q100R, V110D, A117T, T190S, C198R	314	2831 (0,04)	2881 (0,57)	2464 (0,23)	59 (0,08)	-
N52H, N57Y, Q100R, V110D, F172S, C198R	315	58478 (0,79)	74031 (14,75)	56850 (5,33)	712 (0,96)	1093 (0,23)
S25G, F27C, N52H, N57Y, Q100R, V110D, E135K, L173S, C198R	316	22514 (0,30)	21320 (4,25)	20450 (1,92)	353 (0,48)	5765 (1,21)
N52H, N57Y, V110A, C198R, R221I	317	84236 (1,14)	81842 (16,31)	121519 (11,39)	4593 (6,18)	1137 (0,24)
M10I, S13G, N52H, N57Y, D77G, V110A, H129P, I143V, F172S, V193M, C198R	318	6362 (0,09)	6001 (1,20)	4834 (0,45)	141 (0,19)	4326 (0,91)
N52H, N57Y, R61C, Y62F, Q100R, V110N, F120S, C198R	319	4355 (0,06)	4316 (0,86)	3430 (0,32)	110 (0,15)	6854 (1,44)
N52H, N57Y, Q100R, L102R, V110D, H115R, C198R	367	96736 (1,31)	77881 (15,52)	148012 (13,88)	8765 (11,79)	630 (0,13)
N52H, N57Y, Q100R, V110D, N144D, F172S, C198R	321	67578 (0,91)	64953 (12,94)	95731 (8,98)	1672 (2,52)	1490 (0,31)
N52S, H94E, L98F, Q100R,	322	80690 (1,09)	78750 (15,69)	148160 (13,89)	3564 (4,80)	1497 (0,32)
N52S, E90A	323	108908 (1,47)	31086 (6,19)	108866 (10,21)	4564 (6,14)	3927 (0,83)
N30D, K42E, N52S	324	85726 (1,16)	4293 (0,86)	10755 (1,01)	5211 (7,01)	5656 (1,19)
N52S, F120S, I143V, I224V	325	90862 (1,23)	28443 (5,67)	105229 (9,87)	4803 (6,46)	4357 (0,92)
WT ICOSL	32	73964 (1,00)	5018 (1,00)	10665 (1,00)	743 (1,00)	4748 (1,00)

С. Выработка цитокинов в анализах костимуляции с анти-CD3.

Примерные варианты ECD ICOSL молекулы, слитые с Fc, описанные выше, были дополнительно оценены на предмет стимуляции цитокинов IL-17 в анализе костимулирующей (коиммобилизационной) биоактивности с анти-CD3, описанном выше. Смесь 10 нМ связанных с планшетом анти-CD3 и 40 нМ вариантных полипептидов ICOSL-Fc культивировали с человеческими Т-клетками. Надосадочные жидкости собирали и определяли уровни IL-17 с помощью ELISA. Измеряли количество IL-17 в культуральных надосадочных жидкостях (пг/мл), полученного с помощью указанных вариантных слитых молекул белков ECD-Fc и соответствующим немодифицированным (родительским) ECD-Fc, коиммобилизованным с анти-CD3. Для сравнения, также в этой таблице, показаны результаты по выработке IFN-гамма в том же анализе, что отображено в табл. 15 для примерных вариантов.

Результаты представлены в табл. 16, который отображают пг/мл IL-17, измеренного в надосадочной жидкости, а также соотношения (кратное увеличение) IL-17, продуцируемого с помощью каждого варианта ECD-Fc по сравнению с соответствующим немодифицированным ECD-Fc (дикого типа). Аналогичные результаты показаны для IFN-гамма. Также показан процент общего количества цитокинов IL-17 или IFN-гамма, продуцируемых клетками. Результаты показали, что в анализе костимуляции аффинная модификация вариантных молекул продемонстрировала измененную функциональную активность Т-клеток в отношении увеличения IL-17 в дополнение к IFN-гамма.

Таблица 16

Данные костимулирующей биоактивности для доменных вариантов ICOSL IgSF

Мутация(ии) ICOSL	SEQ ID NO (ECD)	IL-17A [пг/мл]	IL-17A кратность ↑WT	IFN-g [пг/мл]	IFN-g кратность ↑WT	Общая кратность ↑WT	% от общего выработанного цитокина		% Общий IL-17 + IFN-g
							% IL-17	% IFN-g	
N52H, N57Y, Q100R, C198R	365	617	7,93	1060	2,48	10,42	5,51	0,77	6,28
N52H, N57Y, Q100R, V122A	290	647	8,33	1316	3,08	11,41	5,79	0,96	6,75
N52H, N57Y, Q100R, F172S	291	549	7,06	1561	3,66	10,72	4,91	1,14	6,05
N52Y, N57Y, F138L, L203P	112	90	1,05	1999	2,69	3,74	0,81	2,91	3,72
V11E, N30D, N52H, N57Y, H94E, L96I, L98F, N194D, V210A, I218T	308	319	3,16	2218	9,03	12,19	2,85	3,23	6,08
N52H, N57Y, Q100R, L102R, V110D, H115R, C198R	367	510	5,90	8765	11,79	17,70	4,56	12,78	17,33
N52H, N57Y, Q100R	283	473	6,08	1648	3,86	9,94	4,23	1,20	5,43
N52H, Q100R	285	358	4,60	972	7,01	11,62	3,20	0,71	3,91
N52H, N57Y, Q100R, V110D, C198R, S212G	364	124	1,60	944	2,21	3,81	1,11	0,69	1,80
N52H, N57Y, Q100P	113	127	1,47	4922	6,62	8,09	1,14	7,17	8,31
E16V, N52H, N57Y, Q100R, V110D, H115R, Y152C, K156M, C198R	300	22	7,11	130	17,46	24,57	6,41	6,25	12,66
N30D, K42E, N52S	324	349	4,04	5211	7,01	11,05	3,12	7,60	10,71
N52S, F120S, I143V, I224V	325	292	3,39	4803	6,46	9,85	2,61	7,00	9,62
N52S, E90A	323	306	3,54	4564	6,14	9,68	2,73	6,65	9,39
N52H, N57Y, V110A, C198R, R221I	317	290	3,35	4593	6,18	9,53	2,59	6,69	9,28
N52S, N194D	366	428	5,50	1671	3,90	9,4	1,52	5,19	5,40
N52H, I143T	135	84	-	1727	-	3,30	0,75	2,52	3,27
N52D	111	126	-	1447	-	3,41	1,13	2,11	3,23

Пример 11. Получение дополнительной сконструированной Т-клетки, экспрессирующей трансмембранный иммуномодулирующий белок, и оценка пролиферации.

В этом примере описывается получение дополнительных сконструированных Т-клеток, в которых трансмембранный иммуномодулирующий белок (TIP), содержащий внеклеточный домен (ECD), включающий домен ICOSL IgSF с модифицированной аффинностью, был совместно экспрессирован с химерным антигенным рецептором (CAR). В частности, TIP был получен для включения ECD примерного варианта ICOSL, содержащего аминокислотные мутации N52D, N52H/N57Y/Q100P, E16V/N52H/N57Y/Q100R/V110D/H115R/Y152C/K156M/C198R или N52H/N57Y/Q100R относительно положений во внеклеточном домене ICOSL, представленном в SEQ ID NO: 32. TIP также содержал трансмембранный домен и цитоплазматический домен соответствующей последовательности трансмембранного белка ICOSL дикого типа, соответствующего остаткам 257-302 SEQ ID NO: 5. Последовательность TIP с сигнальным пептидом и без него выглядит следующим образом: N52D (SEQ ID NO: 496 и 497); N52H/N57Y/Q100P (SEQ ID NO: 498 и 499); E16V/N52H/N57Y/Q100R/V110D/H115R/Y152C/K156M/C198R (SEQ ID NO: 500 и 501) и N52H/N57Y/Q100R (SEQ ID NO: 502 и 503). Для сравнения полноразмерный трансмембранный ICOSL дикого типа (аминокислотные остатки 19-302 SEQ ID NO: 5) также был экспрессирован в клетках. Последовательность TIP дикого типа с сигнальным пептидом и без него изложена в SEQ ID NO: 494 и 495. Нуклеиновая кислота, кодирующая TIP, также включала последовательность, кодирующую зеленый флуоресцентный белок (GFP), отделенный от TIP с помощью саморасщепляющейся последовательности T2A.

TIP, содержащий домен с модифицированной аффинностью или трансмембранный белок дикого типа, содержащий соответствующий домен IgSF с немодифицированной аффинностью, был совместно экспрессирован в Т-клетках с химерным антигенным рецептором (CAR). Нуклеотидная последовательность, кодирующая CAR, кодирует, по порядку: сигнальную последовательность CD8 (SEQ ID NO: 481), анти-CD19 scFv (SEQ ID NO: 482), шарнирную/трансмембранную область, полученную из CD8 (SEQ ID NO: 483), домен костимулирующей сигнализации, полученный из 4-1BB (SEQ ID NO: 484) и домен сигнализации CD3δзета (SEQ ID NO: 247). Полученный анти-CD19 CAR имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 490. Нуклеиновая кислота, кодирующая CAR, также включала

последовательность, кодирующую синий флуоресцентный белок (BFP, SEQ ID NO: 489), отделенный от CAR с помощью саморасщепляющейся последовательности T2A (приведенной в SEQ ID NO: 488).

По отдельности были получены вирусные векторные конструкторы, в которых были клонированы либо молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая CAR отдельно, либо нуклеотидная молекула, кодирующая один из приведенных в качестве примера TIP или ICOSL дикого типа. Вирусный вектор, кодирующий CAR, и вирусный вектор, кодирующий TIP или ICOSL дикого типа, были совместно трансформированы в Т-клетки. Для трансдукции первичные Т-клетки активировали анти-CD3 и анти-CD28-гранулами (Dyna) при соотношении гранул: 1:1 и инкубировали в присутствии 100 МЕ/мл IL-2 при 37°C в течение 2 дней. Т-клетки затем собирали и трансдуцировали с помощью 400 мкл вирусной надосадочной жидкости CAR и 400 мкл вирусной надосадочной жидкости TIP в присутствии 8 мкг/мл полибрена. Клетки были подвергнуты центрифужной инокуляции при 1000 g в течение 30 мин при 30°C. Затем клетки переносили и инкубировали в течение ночи при 37°C. После инкубации клетки собирали и удаляли вирусную надосадочную жидкость. Клетки ресуспендировали с полной средой и 50 МЕ/мл IL-2. Клетки размножали, пополняли IL-2 и среду каждые два дня в течение 6 дней. Гранулы удаляли из клеток с использованием магнита и подсчитывали перед оценкой в анализе пролиферации. Примерный профиль экспрессии TIP и CAR в примерных трансдуцированных Т-клетках показан на фиг. 2А.

Для оценки пролиферации Т-клеток CAR и CAR-TIP Т-клеток в ответ на антиген, клетки метили с помощью следовых количеств красителя дальнего красного спектра. CD19-экспрессирующие целевые клетки Nalm6 титровали, начиная с соотношения мишени:Т-клетки 1,5: 1 и разведением 1:2 с 8-точечным разбавлением. К клеткам Nalm6 добавляли меченные клетки CAR Т или Т-клетки CAR-TIP, и культуру инкубировали в течение 4 дней до того, как клетки были проанализированы с помощью проточной цитометрии. Надосадочную жидкость собирали и дополнительно оценивали в анализе высвобождения цитокинов.

Как показано на фиг. 2В, CAR+ первичные Т-клетки пролиферируют дозозависимым образом в клетки CD19+ NALM6. По сравнению с Т-клетками только с CAR, Т-клетки, коэкспрессирующие CAR и ICOSL дикого типа, или один из примерных ICOSL TIP, демонстрировали повышенную пролиферацию по сравнению с Т-клетками, экспрессирующими только CAR. Совместная экспрессия CAR и TIP, содержащих либо варианты N52H/N57Y/Q100P, E16V/N52H/N57Y/Q100P/V110D/H115R/Y152C/K156M/C198R, либо вариант N52H/N57Y/Q100R ICOSLECD, демонстрировала большую пролиферацию, чем Т-клетки коэкспрессирующие CAR и ICOSL дикого типа, что указывает на то, что TIP, экспрессированные на первичных Т-клетках, обеспечивают улучшенный стимулирующий сигнал для усиления пролиферации Т-клеток.

Пример 12. Очистка и оценка очищенных вариантов домена ICOSL IgSF.

Стратегия очистки была использована для примерных отобранных кандидатов, описанных в примерах 6 и 10. Человеческие клетки, полученные из клеточной линии 293 (Expi293), транзитивно трансфицировали экспрессирующим конструктором, и в клетках экспрессировалась молекула слитого белка ECD ICOSL Fc. Затем слитые белки Fc очищали из надосадочных жидкостей с помощью протеина А с помощью аффинной хроматографии (MabSelect SuRe). За этой начальной стадией очистки проводилась эксклюзионная хроматография (SEC) для дополнительной очистки белков (Superdex200 16×60). Образцы после обеих стадий очистки сохраняли и сравнивали с помощью аналитической SEC. Концентрация белка была определена после очистки протеина А. Полученные очищенные белки также анализировали аналитической SEC на высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) для оценки чистоты.

Процент основного пика в очищенных образцах определяли и по сравнению с белком, очищенным изначально на стадии с протеином А (% основного пика пула прот. А) по сравнению с белком, очищенным с помощью протеина А с последующей препаративной SEC (% основного пика пула SEC T=D0). Как показано в табл. 17, дополнительная стадия SEC значительно увеличивает чистоту белка очищенных белков. Для дальнейшей оценки стабильности белков, белки, очищенные препаративной SEC, оставляли при комнатной температуре в течение 24 ч, а затем оценивали и сравнивали по основному пику с помощью ВЭЖХ (% основного пика пула SEC T=D24) и сравнивали с образцом D0. Было определено изменение в % основного пика в D0 по сравнению с D24 (А% основного пика пула SEC). Как показано в табл. 17, большая часть протестированных примерных вариантных слитых молекул белков ECD ICOSL Fc демонстрировали незначительное изменение в % основного пика, что указывает на минимальную агрегацию вариантов белка.

Таблица 17

Очистка вариантов белков ICOSL

Мутация(ии) ICOSL	SEQ ID NO (ECD)	Expri293 прод. Прот. А мг/л	% основного пика пула Прот. А	% основного пика пула SEC T=D0	% основного пика пула SEC T=D24	▲% основного пика пула SEC
N52S, N194D	366	120	87,9	93,5	92	1,5
N52H, N57Y, Q100R, F172S	291	217	86,9	97,4	95,6	1,8
N52S, E90A	323	128	86,5	89,5	88,3	1,2
N52H, Q100R	285	176	85,9	97,5	96,1	1,4
N52H, N57Y, Q100R	283	186	85,1	97,6	95,7	1,9
N52S, F120S, I143V, I224V	325	87	83,2	88,9	88,3	0,6
N52H, N57Y, Q100R, C198R	365	204	82,9	95,8	92,3	3,5
N52H, N57Y, Q100P	113	63	80,5	94,5	88,5	6
N30D, K42E, N52S	324	81	80	95,4	91,3	4,1
N52H, N57Y, Q100R, L102R, V110D, H115R, C198R	367	141	78,9	96	92,9	3,1
N52H, N57Y, Q100R, V122A	290	260	77,6	96,4	95,2	1,2
N52Y/N57Y/F138L/L203P	112	40	75,6	96,8	94,8	2
E16V, N52H, N57Y, Q100R, V110D, H115R, Y152C, K156M, C198R	300	60	73,8	97,1	95,8	1,3
N52H, N57Y, V110A, C198R, R221I	317	95	65,4	90,9	86	4,9
N52H, N57Y, Q100R, V110D, C198R, S212G	364	73	50,6	87,9	78,6	9,3
V11E, N30D, N52H, N57Y, H94E, L96I, L98F, N194D, V210A, I218T	308	58	-	-	-	-
N52H, I143T	135	134	93,2	96	92,7	3,3
N52D	111	136	90,4	95,5	93,3	2,2

Пример 13. Оценка костимулирующей биоактивности очищенных отобранных вариантов доменов ICOSL IgSF.

Примерные молекулы слитого белка ECD ICOSL Fc, очищенные, как описано в Примере 12, оценивали по их биоактивности с помощью MLR, по существу, как описано в Примере 6. Смесь из 10 нМ или 40 нМ вариантных ICOSL Fc-белков связывали в течение ночи в 96-луночных планшетах в присутствии 10 нМ анти-CD3. Планшеты промывали и в течение 96 ч добавляли 100 000 меченых CFSE пан Т-клеток. Надосадочные жидкости собирали, и уровни IFN-гамма и IL-17 измеряли с помощью ELISA.

Результаты по секреции цитокинов, индуцированной костимуляцией анти-CD3 с примерными тестируемыми вариантами (10 и 40 нМ ICOSL Fc), показаны на фиг. 3А и 3В, где представлены примерные аминокислотные замены (замещения) доменов IgSF в ECD из ICOSL. Гистограммы на фиг. 3А и 3В демонстрируют количество секретируемого IFN-гамма и IL-17, соответственно, с помощью ELISA в надосадочных жидкостях (пг/мл). Уровень высвобождения цитокинов, индуцированного костимуляцией анти-CD3 с тестируемыми вариантами по сравнению с уровнем, индуцированным костимуляцией анти-CD3 с WT ICOSL, обозначен горизонтальной линией. Результаты показали, что аффинная модификация вариантных молекул проявляет активность в отношении модуляции функциональной активности Т-клеток, в том числе в отношении существенного увеличения секреции IFN-гамма и IL-17 в анализе костимуляции. Повышенная иммунологическая активность наблюдалась с некоторыми вариантами.

Пример 14. Оценка пролиферации очищенных отобранных вариантов домена ICOSL IgSF.

Примерные варианты слитых молекул белков ECD ICOSL Fc, очищенных, как описано в Примере 12, были оценены по способности костимулировать анти-CD3-индуцированную пролиферацию Т-клеток. Первичные Т-клетки метили карбоксифлуоресцеин сукцинимидиловым эфиром (CFSE). Смесь 10 нМ или 40 нМ вариантного белка ECD ICOSL Fc или белка ICOSL дикого типа связывали в течение ночи с 96-луночными планшетами в присутствии 10 нМ анти-CD3 и затем помещали Т-клетки и инкубировали в течение 3 дней. В качестве контроля пролиферация также оценивалась в присутствии связанных анти-CD3 и IgG или IgG отдельно. Клетки окрашивали на поверхностные маркеры CD4 или CD8, а пролиферацию Т-клеток, CD4+ Т-клеток или CD8+ Т-клеток определяли путем оценки CFSE-разбавления с помощью проточной цитометрии.

Результаты приведены на фиг. 4А и 4В для примерных вариантов, протестированных при 40 нМ и 10 нМ ICOSL, соответственно. Как показано на фиг. 4А, почти все протестированные вариантные молекулы слитого белка ECD ICOSL Fc индуцировали пролиферацию, превышающую пролиферацию для контрольного WT. Как показано на фиг. 4В, различия в пролиферации были более очевидными при 10 нМ с некоторыми вариантами, обеспечивающими максимальную пролиферацию даже при этой более низкой концентрации.

Пример 15. Оценка связывания и активности очищенных отобранных доменных вариантов ICOSL IgSF.

Примерные варианты молекулы слитого белка ECD ICOSL Fc, очищенные, как описано в примере 12, оценивали на предмет связывания и функциональные активности с использованием способов, по существу, как описано в примере 6 или примере 10.

А. Проточные цитометрические анализы связывания.

Клетки человека, полученные из клеточной линии 293 (Expi293) трансфицировали CD28, CTLA-4, ICOS или ложно трансфицировали. Затем клетки инкубировали с молекулами слитого белка ECD ICOSL Fc или ECD ICOSL-Fc дикого типа, которые титровали от 100000 до 46 пМ, и связывание наблюдали с использованием PE-конъюгированного антитела против Fc человека, как описано в Примере 6. Связывание оценивали с помощью проточной цитометрии и средней интенсивности флуоресценции (MFI), а процент (%) клеток, положительных для сигнала, определяли с использованием программного обеспечения Cell Quest Pro (Becton Dickinson, США). Определяли концентрацию ICOSL-Fc, которая давала полу-максимальный ответ MFI (MFI EC₅₀) или % положительных клеток (% (+) EC₅₀).

В табл. 18 представлены результаты. Замены аминокислот ICOSL, отображенные в табл. 18, обозначены номером аминокислотного положения, соответствующего аналогичной немодифицированной последовательности ICOSL ECD, представленной в SEQ ID NO: 32. Для некоторых значений (например, связывание WT с CD28) невозможно получить EC₅₀, поэтому значение 1000000 пМ было произвольно выбрано для целей форматирования данных. Подобно результатам, полученным в предыдущих анализах связывания, описанных в примере 10 выше, наблюдалась измененная аффинность связывания вариантной слитой молекулы белка ICOSL ECD-Fc, по меньшей мере, для одного когнатного контрструктурного лиганда.

Таблица 18

EC₅₀ по данным проточной цитометрии для вариантов ICOSL

Мутация(ии) ICOSL	SEQ ID NO (ECD)	CD28	CD28	CTLA-4	CTLA-4	ICOSMFI	ICOS
		MFI EC ₅₀ [пМ]	% (+) EC ₅₀ [пМ]	MFI EC ₅₀ [пМ]	% (+) EC ₅₀ [пМ]	EC ₅₀ [пМ]	% (+) EC ₅₀ [пМ]
WT ICOSL	32	1000000	1000000	1000000	1000000	10543	762
N52H, I143T	135	19147	567	20259	1891	2666	286
N52H, N57Y, Q100R, C198R	365	950	159	73548	422	1032	179
N52H, N57Y, Q100R, V122A	290	29701	152	1008	293	302	64
N52H, N57Y, Q100R, F172S	291	1006	231	1332	396	779	130
N52Y/N57Y/F138L/L203P	112	7844	386	7457	994	3104	408
V11E, N30D, N52H, N57Y, H94E, L96I, L98F, N194D, V210A, I218T	308	5961	595	6909	1026	5514	852
N52H, N57Y, Q100R, L102R, V110D, H115R, C198R	367	1034	307	23328	579	3172	347
N52H, N57Y, Q100R	283	1665	238	11002	533	383	131
N52H, Q100R	285	1305	274	8593	1997	702	167
N52H, N57Y, Q100R, V110D, C198R, S212G	364	4987	594	30382	922	50219	814
N52H, N57Y, Q100P	113	21137	402	22651	758	4090	320
E16V, N52H, N57Y, Q100R, V110D, H115R, Y152C, K156M, C198R	300	2508	387	5399	806	2381	421
N30D, K42E, N52S	324	-	3683800	8593	1997	3251	558
N52S, F120S, I143V, I224V	325	902400	9060	28126	2948	4366	245
N52S, E90A	323	1339700	31302	31419	5828	5225	473
N52H, N57Y, V110A, C198R, R221I	317	1809	426	7201	841	1293	433
N52S, N194D	366	944669	11876	1254880	5170	473	206
N52D	111	288617	17793	396841	3891	2642	137

В. Анализ связывания ForteBio.

Белок-белковые взаимодействия между рецепторами и иммуномодулирующими белками с вариантным доменом ICOSL дополнительно оценивали с использованием анализов связывания ForteBio. ICOS, CD28 и CTLA-4 загружали индивидуально на античеловеческие датчики захвата (ForteBio Octet АНС) и немодифицированную молекулу ICOSL ECD-Fc дикого типа, молекулу слитого белка PD-L2 ED-Fc дикого типа или варианты молекулы слитого белка ICOSL Fc связывали с рецепторами в 4-точечных титрованиях. Каждое титрование было глобально подогнано для вычисления ассоциации (k_{on}) и диссоциации (K_{dis}) каждого белка. Определяли ответ античеловеческих датчиков захвата каждого тестируемого рецептора на вариантную слитую молекулу белка ICOSL ECD-Fc. Константу диссоциации (KD) рассчитывали и сравнивали с диким типом, чтобы определить кратное значение улучшения (кратное улучш.).

Результаты связывания с ICOS приведены в табл. 19, с CD28 - в табл. 20, а с CTLA-4 - в табл. 21. Примерные аминокислотные замены, изображенные в табл. 19-21, обозначены номером аминокислотного положения, соответствующего аналогичной исходной немодифицированной последовательности ICOSL ECD, представленной в SEQ ID NO: 32.

Таблица 19

Анализ ForteBio связывания с ICOS

Мутация(ии) ICOSL	SEQ ID NO (ECD)	Ответ	KD (M)	K _{on} (1/Mc)	K _{dis} (1/c)	полный R ²	Кратное улучш.
WT ICOSL	32	0,73	8,83E-10	1,78E+05	1,58E-04	0,9908	-
N52H, I143T	135	0,87	3,32E-10	3,13E+05	1,04E-04	0,9683	2,7
N52H, N57Y, Q100R, C198R	365	0,74	4,92E-10	3,85E+05	1,89E-04	0,9882	1,8
N52H, N57Y, Q100R, V122A	290	0,67	4,72E-10	3,77E+05	1,78E-04	0,9775	1,9
N52H, N57Y, Q100R, F172S	291	0,68	4,20E-10	4,34E+05	1,82E-04	0,9545	2,1
N52Y/N57Y/F138L/L203P	112	0,64	7,69E-10	2,22E+05	1,71E-04	0,9782	1,1
V11E, N30D, N52H, N57Y, H94E, L96I, L98F, N194D, V210A, I218T	308	0,67	3,62E-10	3,55E+05	1,29E-04	0,9687	2,4
N52H, N57Y, Q100R, L102R, V110D, H115R, C198R	367	0,76	4,77E-10	3,29E+05	1,57E-04	0,9616	1,9
N52H, N57Y, Q100R	283	0,74	3,69E-10	2,87E+05	1,06E-04	0,9817	2,4
N52H, Q100R	285	0,79	3,73E-10	4,45E+05	1,66E-04	0,968	2,4
N52H, N57Y, Q100R, V110D, C198R, S212G	364	0,60	1,29E-09	1,66E+05	2,15E-04	0,9846	0,7
N52H, N57Y, Q100P	113	0,73	3,82E-10	3,71 E+05	1,42E-04	0,9729	2,3
E16V, N52H, N57Y, Q100R, V110D, H115R, Y152C, K156M, C198R	300	0,75	5,43E-10	2,65E+05	1,44E-04	0,9848	1,6
N30D, K42E, N52S	324	0,80	3,71E-10	4,48E+05	1,66E-04	0,9651	2,4
N52S, F120S, I143V, I224V	325	0,80	3,11E-10	5,03E+05	1,56E-04	0,9673	2,8
N52S, E90A	323	0,88	3,40E-10	4,85E+05	1,65E-04	0,9792	2,6
N52H, N57Y, V110A, C198R, R221I	317	0,68	4,77E-10	3,15E+05	1,50E-04	0,976	1,9
N52S, N194D	366	0,88	3,37E-10	3,38E+05	1,14E-04	0,9723	2,6
N52D	111	0,87	3,38E-10	3,91E+ 05	1,32E-04	0,9792	2,6
Wildtype PD-L2 ED-Fc	-	0,03					

Таблица 20

Анализ ForteBio связывания с CD28

Мутация(ии) ICOSL	SEQ ID NO (ECD)	Ответ	KD (M)	K _{on} (1/Mc)	K _{dis} (1/c)	полный R ²	Кратное улучш.
WT ICOSL	32	0,33	1,39E-08	6,69E+04	9,29E-04	0,9715	-
N52H, I143T	135	0,95	5,25E-10	4,27E+05	2,24E-04	0,9877	26,5
N52H, N57Y, Q100R, C198R	365	1,14	4,47E-10	4,12E+05	1,84E-04	0,9877	31,0
N52H, N57Y, Q100R, V122A	290	1,04	3,90E-10	4,07E+05	1,59E-04	0,9878	35,6
N52H, N57Y, Q100R, F172S	291	1,06	2,93E-10	4,26E+05	1,25E-04	0,9836	47,3
N52Y/N57Y/F138L/L203P	112	0,86	7,83E-10	1,79E+05	1,40E-04	0,993	17,7
V11E, N30D, N52H, N57Y, H94E, L96I, L98F, N194D, V210A, I218T	308	0,92	5,53E-10	2,54E+05	1,40E-04	0,9906	25,1
N52H, N57Y, Q100R, L102R, V110D, H115R, C198R	367	1,10	3,66E-10	3,41 E+05	1,25E-04	0,986	37,9
N52H, N57Y, Q100R	283	1,04	3,68E-10	3,72E+05	1,37E-04	0,983	37,7
N52H, Q100R	285	1,09	4,01E-10	5,05E+05	2,02E-04	0,9938	34,7
N52H, N57Y, Q100R, V110D, C198R, S212G	364	0,94	8,96E-10	1,78E+05	1,60E-04	0,9961	15,5
N52H, N57Y, Q100P	113	0,99	4,36E-10	3,29E+05	1,43E-04	0,9835	31,8
E16V, N52H, N57Y, Q100R, V110D, H115R, Y152C, K156M, C198R	300	1,06	5,03E-10	3,06E+05	1,54E-04	0,9872	27,6
N30D, K42E, N52S	324	0,54	1,95E-09	2,74E+05	5,33E-04	0,9772	7,1
N52S, F120S, I143V, I224V	325	0,84	9,10E-10	4,51 E+05	4,10E-04	0,9742	15,3
N52S, E90A	323	0,94	9,69E-10	4,74E+05	4,59E-04	0,978	14,3

N52H, N57Y, V110A, C198R, R221I	317	0,94	5,63E-10	2,63E+05	1,48E-04	0,9781	24,7
N52S, N194D	366	0,82	1,04E-09	3,53E+05	3,68E-04	0,9887	13,3
N52D	111	0,86	1,16E-09	3,36E+05	3,90E-04	0,989	11,9
wildtype PD-L2 ED-Fc	-	-0,04					

Таблица 21

Анализ ForteBio связывания с CTLA-4

Мутация(ии) ICOSL	SEQ ID NO (ECD)	Ответ	KD (M)	K _{on} (1/Mc)	K _{dis} (1/c)	Полный R ²	Кратное улучш.
WT ICOSL	32	0,21	7,71E-08	1,92E+04	1,48E-03	0,8919	-
N52H, I143T	135	0,96	6,78E-10	7,26E+05	4,92E-04	0,9641	113,8
N52H, N57Y, Q100R, C198R	365	1,57	6,45E-10	4,79E+05	3,09E-04	0,9875	119,6
N52H, N57Y, Q100R, V122A	290	1,43	5,76E-10	4,73E+05	2,72E-04	0,9926	133,9
N52H, N57Y, Q100R, F172S	291	1,47	5,36E-10	5,13E+05	2,75E-04	0,9924	144,0
N52Y/N57Y/F138L/L203P	112	1,33	8,33E-10	3,45E+05	2,87E-04	0,9943	92,6
V11E, N30D, N52H, N57Y, H94E, L96I, L98F, N194D, V210A, I218T	308	1,50	6,48E-10	3,12E+05	2,02E-04	0,9943	119,0
N52H, N57Y, Q100R, L102R, V110D, H115R, C198R	367	1,60	8,64E-10	4,79E+05	4,14E-04	0,9825	89,2
N52H, N57Y, Q100R	283	1,65	7,19E-10	4,28E+05	3,08E-04	0,9895	107,2
N52H, Q100R	285	1,17	5,92E-10	8,37E+05	4,96E-04	0,9629	130,3
N52H, N57Y, Q100R, V110D, C198R, S212G	364	1,32	1,47E-09	2,34E+05	3,44E-04	0,9937	52,6
N52H, N57Y, Q100P	113	1,51	6,47E-10	3,61 E+05	2,33E-04	0,9911	119,2
E16V, N52H, N57Y, Q100R, V110D, H115R, Y152C, K156M, C198R	300	1,58	1,06E-09	4,24E+05	4,49E-04	0,9779	72,8
N30D, K42E, N52S	324	0,42	2,81E-09	2,42E+05	6,81E-04	0,9676	27,4
N52S, F120S, I143V, I224V	325	0,58	1,20E-09	3,10E+05	3,72E-04	0,9283	64,3
N52S, E90A	323	0,64	1,12E-09	3,28E+05	3,68E-04	0,9184	68,7
N52H, N57Y, V110A, C198R, R221I	317	1,44	1,07E-09	4,05E+05	4,32E-04	0,9811	72,3
N52S, N194D	366	0,59	2,52E-09	2,66E+05	6,69E-04	0,9643	30,6
N52D	111	0,62	1,52E-09	4,16E+05	6,32E-04	0,9234	50,7
wildtype PD-L2 ED-Fc	-	0,00					

D. Анализ коиммобилизации.

Костимулирующую биоактивность вариантов слитых белков ICOSL определяли в анализах коиммобилизации с анти-CD3, по существу, как описано в примере 6. Примерно 0,37, 1,3 или 10 нМ мышиного антитела против CD3 человека (OKT3, Biolegends, США) разводили в PBS с помощью 10 или 40 нМ вариантного ICOSL ECD Fc или ICOSL ECD-Fc дикого типа. Эту смесь добавляли к обработанным 96-луночным планшетам с плоским дном для тканевых культур, в течение ночи для облегчения прилипания стимулирующих белков к лункам планшета. На следующий день несвязанный белок промывали с планшета и в каждую лунку добавляли 100000 очищенных пан Т-клеток человека. Клетки культивировали за 3 дня до сбора культуральных надосадочных жидкостей и измерения уровней IFN-гамма человека с помощью набора ELISA.

В табл. 22 представлено количество IFN-гамма (пг/мл), продуцируемого клетками при различных условиях в анализе коиммобилизации с анти-CD3. В табл. представлены аминокислотные замены примерных вариантных слитых белков ICOSL-Fc, которые обозначены номером положения аминокислоты, соответствующим немодифицированной последовательности ICOSL ECD, представленной в SEQ ID NO: 32, и соответствующим идентификатором SEQ ID NO для вариантного ECD для каждой вариантной слитой молекулы белка ICOSL ECD-Fc. Показано соотношение IFN-гамма, полученное в присутствии каждого варианта ICOSL ECD-Fc в функциональном анализе по сравнению с присутствием соответствующего немодифицированного ECD-Fc (дикого типа) (кратность ↑ WT). Как показано, костимулирующая сигнализация вариантных молекул ICOSL-ECD-Fc была значительно выше по сравнению с ICOSL дикого типа.

Таблица 22

Оценка ответов IFN-гамма в анализе костимуляции

Мутация(ии) ICOSL	SEQ ID NO (ECD)	IFN-гамма [пг/мл]						
		40 нМ лиганд		10 нМ лиганд		40 нМ лиганд		
		10 мМ ОКТ3	Кратное ↑WT	10 мМ ОКТ3	Кратное ↑WT	10 мМ ОКТ3	1,1 нМ ОКТ3	0,37 нМ ОКТ3
E16V, N52H, N57Y, Q100R, V110D, H115R, Y152C, K156M, C198R	300	14372	17,3	4903	29,9	8379,2	7422,8	2893,7
N52H, N57Y, Q100R, V122A	290	10640	12,8	6456	39,4	5636,2	4724,2	2246,3
N52H, N57Y, Q100R, F172S	291	10379	12,5	3741	22,8	3979,7	4067,7	1415,5
N52H, N57Y, Q100R, C198R	365	9590	11,5	4048	24,7	4215,8	2787,1	1072,4
N52H, N57Y, Q100R	283	9568	11,5	3270	19,9	4412,3	3862,0	1820,0
N52H, N57Y, Q100R, L102R, V110D, H115R, C198R	367	6939	8,4	3234	19,7	5495,2	4081,6	1442,8
N52S, F120S, I143V, I224V	325	6567	7,9	717	4,4	2145,4	2185,7	646,1
N52S, N194D	366	5690	6,8	272	1,7	2315,1	1485,0	1140,6
V11E, N30D, N52H, N57Y, H94E, L96I, L98F, N194D, V210A, I218T	308	5345	6,4	1152	7,0	2747,0	3383,4	1701,2
N52S, E90A	323	5097	6,1	706	4,3	5019,8	3036,4	1482,4
N52H, N57Y, V110A, C198R, R221I	317	4737	5,7	520	3,2	2501,5	1632,1	937,5
N52H, Q100R	285	4122	5,0	1466	8,9	5782,1	2861,4	967,5
N30D, K42E, N52S	324	4080	4,9	273	1,7	1336,8	1260,7	541,1
N52H, N57Y, Q100P	113	3344	4,0	229	1,4	2525,4	2439,5	1233,9
N52H, N57Y, Q100R, V110D, C198R, S212G	364	3064	3,7	1471	9,0	2699,5	2629,9	678,2
N52Y, N57Y, F138L, L203P	112	2177	2,6	200	1,2	1889,5	1757,9	808,8
N52H, I143T	135	1906	2,3	138	0,8	1417,1	1367,9	275,2
WT ICOSL	32	831	1,0	164	1,0	558,8	377,7	152,0
N52D	111	88	0,1	231	1,4	1288,9	1737,9	289,0

Е. Реакция смешанных лимфоцитов для оценки супрессии биореактивности.

Модуляция активности Т-клеток вариантами слитого белка определяли в реакции смешанных лимфоцитов (MLR), по существу, как описано в Примере 6. Человеческие моноциты инкубировали в течение 6 дней в присутствии IL-4 и GM-CSF и созревали в дендритные клетки при добавлении LPS в течение последних 24 ч. 1×10^4 дендритных клеток и 1×10^5 человеческих Т-клеток, меченных CFSE, высевали на лунку и инкубировали в течение 4 дней в присутствии трех различных концентраций (40, 13,3 или 4,4 нМ) дикого типа или рекомбинантной вариантной молекулы ICOSL ECD-Fc, разведенных в PBS. В качестве контролей использовали те же концентрации человеческого IgG, PD-L2-Fc или белатацепта (CTLA4-Fc, содержащий мутации L104E и A29Y). Надосадочные жидкости собирали, и ответы IFN-гамма описывали с помощью ELISA.

На фиг. 5 изображена выработка IFN-гамма при различных условиях. Уровни IFN-гамма, продуцируемые клетками в присутствии ICOSL дикого типа представлены горизонтальной линией. Не наблюдалось подавления образования IFN-гамма в присутствии белка отрицательного контроля PD-L2-Fc. Напротив, большинство тестируемых вариантов ICOSL проявили некоторую степень ингибирования продуцирования IFN-гамма в MLR. В некоторых воплощениях наблюдалось значительное ингибирование IFN-гамма от очень низкой до необнаруживаемой выработки IFN-гамма, полученной в культурах, даже при самой низкой протестированной концентрации 4,4 нМ. Процент супрессии MLR в присутствии 4,4 нМ варианта ECD ICOSL-Fc, приведен в табл. 23. В таблице отрицательные значения указывают на воспалительный эффект в анализе.

Таблица 23

Данные костимулирующей биоактивности для ICOSL в MLR

Мутация(ии) ICOSL	SEQ ID NO (ECD)	% супрессии MLR (4.4 нМ)
N52H, N57Y, Q100R, C198R	365	93,6
N52H, N57Y, Q100R, V122A	290	94,4
N52H, N57Y, Q100R, F172S	291	100,0
N52Y/N57Y/F138L/L203P	112	100,0
V11E, N30D, N52H, N57Y, H94E, L96I, L98F, N194D, V210A, I218T	308	100,0
N52H, N57Y, Q100R, L102R, V110D, H115R, C198R	367	100,0
N52H, N57Y, Q100R	283	98,2
N52H, Q100R	285	97,5
N52H, N57Y, Q100R, V110D, C198R, S212G	364	90,4
N52H, N57Y, Q100P	113	100,0
E16V, N52H, N57Y, Q100R, V110D, H115R, Y152C, K156M, C198R	300	100,0
N30D, K42E, N52S	324	-38,8
N52S, F120S, I143V, I224V	325	-44,2
N52S, E90A	323	-30,4
N52H, N57Y, V110A, C198R, R221I	317	100,0
N52S, N194D	366	-22,3
N52H, I143T	135	-78,0
N52D	111	0,5

Ф. Оценка пролиферации и внутриклеточных цитокиновых маркеров проточной цитометрией.

Меченные карбоксифлуоресцеин сукцинимидиловым эфиром (CFSE) пан Т-клетки из исследований MLR, как описано выше, которые инкубировали в течение 4 дней в присутствии молекул ICOSL ECD-Fc дикого типа или рекомбинантных вариантных молекул ICOSL ECD-Fc, были дополнительно протестированы на предмет уровней цитокинов с помощью рестимуляции форболацетатмиристатином (PMA)/иономицином в течение 6 ч в присутствии ингибитора Гольджи (Golgi/Block/Plug). Т-клетки из исследования MLR, которые были инкубированы с человеческим IgG, анти-CD28, анти-ICOSL, PD-L2-Fc или белатацептом (CTLA4-Fc, содержащим мутации L104E и A29Y), также были рестимулированы. Т-клетки окрашивали для поверхностных маркеров CD4 или CD8, фиксировали, пермеабилizировали и внутриклеточно окрашивали по различным цитокинам, как указано в табл. 24 и 25.

Процент (%) CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток, которые были положительными в отношении специфических внутриклеточных цитокинов, представлены в табл. 24 соответственно. Результаты показали, что ряд вариантных молекул ICOSL ECD-Fc способен подавлять один или несколько цитокинов, в том числе в некоторых случаях большинство цитокинов. Суммарная оценка и средняя оценка рассчитывались для оценки суммарных эффектов отдельных молекул, проверенных по параметрам, рассмотренным в этом анализе. Также оценивали пролиферацию и процент клеток, которые вошли в деление, что определялось по разбавлению CFSE, что также показано в табл. 24 и 25. Из представленных результатов результаты видно, что определенные варианты демонстрируют сравнимую или лучшую активность, чем белатацепт, особенно на клетках CD8⁺.

Таблица 24

Оценка пролиферации и внутриклеточных уровней цитокинов в CD4+ Т-клетках

Вариант- ный SEQ ID NO (ECD) или Белок	% цитокина +									Об- щий балл	Сред- ний балл
	Про- лиф	% IFNg +	%IL4 +	% IL21 +	% IL22 +	%TNF +	%IL2 +	%IL10 +	% IL17A +		
308	3,0	9,9	3,0	1,0	1,3	34,9	31,3	0,1	0,2	41,0	4,6
300	2,7	11,1	3,4	1,1	1,4	38,0	35,0	0,0	0,1	63,0	7,0
317	2,9	10,9	3,3	1,1	1,5	37,3	34,1	0,1	0,2	65,0	7,2
291	3,2	8,1	2,5	0,6	1,1	27,9	24,1	0,9	1,3	66,0	7,3
283	3,3	9,2	3,0	0,8	1,4	31,1	26,3	0,8	1,3	70,0	7,8
364	3,4	10,9	3,3	1,0	1,6	36,5	32,3	0,5	0,9	89,0	9,9
390	3,6	9,5	3,1	0,9	1,5	33,8	29,4	0,8	1,4	92,0	10,2
367	2,8	12,0	3,5	1,1	1,6	40,9	38,5	0,1	0,3	92,0	10,2
CTLA-4- Ig: L104E, A29Y (Белата- цепт)	10,7	10,5	2,7	2,4	2,0	24,5	19,6	0,6	1,4	99,0	11,0
112	3,5	12,0	3,8	1,3	1,6	41,3	36,7	0,2	0,4	109,0	12,1
285	4,4	9,8	3,2	1,2	1,7	32,7	29,3	0,9	1,4	114,0	12,7
113	3,0	13,2	4,1	1,2	1,8	43,2	39,8	0,1	0,2	115,0	12,8
365	3,6	11,3	3,9	1,0	2,0	39,1	34,6	0,8	1,3	118,0	13,1
WT ICOSL	12,7	16,7	5,8	4,9	4,7	36,2	29,2	0,2	0,4	127,0	14,1
113	3,5	12,3	3,9	1,1	1,8	39,2	37,5	0,4	0,6	127,0	14,1
366	10,9	16,0	7,2	4,9	5,4	40,6	33,0	0,1	0,2	135,0	15,0
321	10,6	16,7	6,0	4,3	5,0	41,3	37,3	0,2	0,3	146,0	16,2
mlgG ctl	15,5	15,6	5,9	5,2	4,6	31,7	26,0	0,4	1,7	146,0	16,2
PDL2	12,3	17,9	5,7	4,7	5,2	41,4	36,0	0,3	0,6	163,0	18,1
323	11,9	17,7	6,2	5,2	5,3	42,4	37,5	0,2	0,4	167,0	18,6
WT ICOSL	12,8	17,4	6,3	5,4	5,6	38,9	32,1	0,3	0,6	167,0	18,6
Анти- ICOSL	15,5	16,3	6,5	5,2	5,5	35,1	29,1	0,7	2,0	168,0	18,7
135	12,6	17,4	6,5	5,4	4,9	44,3	37,2	0,4	0,5	179,0	19,9
HulG	12,7	17,1	6,3	5,9	4,9	41,1	32,4	0,7	1,3	181,0	20,1
Анти- CD28	88,2	42,9	5,0	5,8	5,4	43,5	25,5	0,4	1,4	183,0	20,3
325	12,7	18,7	6,5	5,4	5,6	44,2	40,0	0,1	0,3	186,0	20,7
111	13,7	18,3	6,8	5,9	6,1	42,1	35,2	0,3	0,5	194,0	21,6

Таблица 25

Оценка пролиферации и внутриклеточных уровней цитокинов в CD8+ Т-клетках

Вариант- ный SEQ ID NO (ECD) или Белок	% Цитокина +									Об- щий балл	Сред- ний балл
	Про- лиф	% IFNg +	%IL4 +	% IL21 +	% IL22 +	%TNF +	%IL2 +	%IL10 +	% IL17A +		
308	4,2	8,4	1,6	2,2	47,2	7,6	8,0	0,2	0,1	67,0	7,4

300	3,8	8,5	2,0	2,2	47,2	8,1	9,1	0,1	0,0	69,0	7,7
317	3,9	8,8	2,0	1,7	45,6	8,4	9,0	0,1	0,1	64,0	7,1
291	3,8	7,0	1,4	1,8	46,6	5,9	5,9	1,1	1,1	78,0	8,7
283	4,3	8,4	1,9	1,7	50,2	7,1	6,6	1,1	1,1	98,0	10,9
364	4,1	9,0	1,8	1,8	46,4	8,2	8,5	0,7	0,8	87,0	9,7
390	4,1	7,9	1,8	1,8	49,8	7,3	7,2	1,0	1,2	93,0	10,3
367	3,5	9,0	1,7	2,0	47,3	8,6	10,4	0,2	0,2	78,0	8,7
CTLA-4-Ig: L104E, A29Y (Белата- цепт)	12,3	14,5	2,0	3,2	38,1	11,2	8,8	0,9	1,6	121,0	13,4
112	4,2	9,6	1,9	1,8	40,4	9,4	9,9	0,3	0,3	81,0	9,0
285	5,4	9,5	2,0	2,7	44,2	7,8	8,4	1,2	1,3	112,0	12,4
113	3,7	9,5	1,9	1,3	44,4	9,4	10,5	0,1	0,1	62,0	6,9
365	4,1	9,6	2,3	1,8	46,8	9,0	9,3	0,9	1,0	122,0	13,6
ICOSL	17,2	22,3	4,9	6,4	46,4	22,0	15,7	0,4	0,7	181,0	20,1
113	4,2	9,5	2,0	2,1	45,6	8,9	10,7	0,5	0,5	110,0	12,2
366	14,5	19,4	5,6	4,8	48,4	19,2	13,8	0,1	0,2	142,0	15,8
321	13,4	18,9	4,3	5,0	46,3	18,4	15,4	0,3	0,6	138,0	15,3
mlgG ctl	20,2	25,0	4,4	4,1	35,5	24,6	15,8	0,7	1,8	174,0	19,3
PDL2	15,6	21,2	4,1	4,8	44,1	20,7	15,6	0,5	0,8	147,0	16,3
323	15,4	20,8	4,7	5,6	44,9	20,6	17,1	0,2	0,5	149,0	16,6
WT ICOSL	17,5	22,1	5,5	4,6	45,0	21,0	12,8	0,2	0,4	148,0	16,4
Анти- ICOSL	21,5	26,4	4,8	5,3	33,4	26,9	19,0	1,0	2,3	198,0	22,0
135	17,2	22,2	4,7	6,7	39,4	22,5	18,1	0,8	0,9	178,0	19,8
HulgG	15,9	21,5	4,4	6,4	41,6	21,4	15,1	1,4	1,7	179,0	19,9
Анти- CD28	60,6	44,3	3,5	2,1	38,6	32,5	16,0	1,2	1,6	182,0	20,2
325	16,5	22,0	4,9	5,4	44,0	21,9	18,5	0,2	0,6	161,0	17,9
111	17,7	22,8	5,3	6,1	45,4	22,9	16,7	0,4	0,6	183,0	20,3

Пример 16. Оценка выработки цитокинов в совместной культуре В-Т-клеток.

В-клетки и CD4+ Т-клетки очищали из одного донора, метили с помощью CSFE и высевали в 96-луночные планшеты при соотношении клеток 1:1 при 5×10^4 клеток на лунку каждые. Добавляли молекулы слитого белка ICOSL ECD-Fc или белатацепта при конечной концентрации 40 нМ на лунку. Клетки либо не стимулировались, либо инкубировались со 100 нг/мл энтеротоксина В стафилококка (SEB), 100 мкг/мл митогена фитолакки (PWM) или обоими в течение 7 дней при 37°C в конечном объеме 200 мкг/лунку.

Клетки собирали и окрашивали их поверхность следующими маркерами В- и Т-клеточных линий (IgM, IgD, CD38, CD138, CD27, CD19, CD4, CD3). Проллиферацию оценивали с помощью проточной цитометрии и культуральные надосадочные жидкости анализировали на цитокины IL-5, IL-13 или IL-21 с использованием набора для обнаружения цитокинов человека LEGENDplex (Biolegend, США).

Как показано на фиг. 6А, количество делящихся В-клеток было уменьшено в совместных культурах В/Т-клеток при инкубации в присутствии вариантных слитых молекул белков ICOSL ECD Fc по сравнению с контролем без белка. Степень антагонистического эффекта для протестированных примерных вариантов была аналогична эффекту CTLA-4-Ig белатацепта (L104E, A29Y). Аналогично, как показано на фиг. 6В-Д, вариантные молекулы слитого белка ICOSL ECD Fc ингибировали продукцию цитокинов в совместных культурах первичных В/Т клеток человека *in vitro* в сравнении с контролем без белка, а также с культурами, содержащими контрольный ICOSL дикого типа. По сравнению с белатацептом, примерные протестированные вариантные молекулы слитого белка ICOSL ECD Fc были более эффективными при блокировании выработки цитокинов в некоторых случаях.

Пример 17. Оценка активности выживания и заболевания в модели реакции трансплантат против хозяина (GvHD).

Примерный вариантный белок ICOSL ECD-Fc, оценивали на предмет активности в модели реакции трансплантат против хозяина (GVHD). Самок мышей NGS (n=10 на группу) облучали (100 рад) и вводили 10 мг гамма-глобулина подкожно в день -1. В день 0 мыши получали 10 миллионов человеческих мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC) и внутривенную инъекцию либо 100 мкг WT-ICOSL ECD Fc, вариантной молекулы ICOSL ECD Fc N52H/1143T (ECD представлен в SEQ ID NO: 135), вариантной молекулы ICOSL ECD Fc N52H/N57Y/Q100P (ECD представлен в SEQ ID NO: 113), 75 мкг белатацепта (CTLA-4-Ig L104E/A29Y, публикация патентной заявки США № US 20160271218) или физиологического раствора в качестве контроля. На 15-й день привитые человеческие клетки CD45 + были фенотипированы проточной цитометрией. После окончания исследования на 35-й день были оценены конечные показатели выживаемости, потери массы тела и активность заболевания.

На фиг. 7А показана выживаемость мышей GVHD, обработанных физиологическим раствором, WT ICOSL-ECD Fc, вариантной молекулой ICOSL ECD-Fc или белатацептом. Наблюдали существенное раз-

личие в выживаемости мышей, которым вводили вариантный ICOSL ECD-Fc N52H/N57Y/Q100P (ECD, представленный в SEQ ID NO: 113), по сравнению с мышами, которым вводили физиологический раствор или WT ICOSL ECD-Fc ($p < 0,0001$ по критерию Кокса-Мантеля и критерию Гехана-Бреслоу-Вилкоксона). На фиг. 7B показаны сходные различия между потерей массы тела мышей, обработанных физиологическим раствором, WT ICOSL ECD-Fc, вариантными молекулами ICOSL ECD-Fc или белатацептом в ходе исследования.

Индекс активности заболевания (DAI) определяли три раза в неделю в течение исследования и оценивали на предмет потери массы, позы, активности, внешнего вида шерстного покрова и кожи мышей. Градация заболевания в течение исследования показана на фиг. 7C. Группы обработки, которые получали вариантный ICOSL Fc N52H/N57Y/Q100P (ECD, изложенный в SEQ ID NO: 113) или белатацепт, показали значительно улучшенные баллы DAI. Процент человеческих Т-клеток в периферической крови на 14-й день исследования также оценивали с помощью проточной цитометрии. Измерения усреднялись по группам обработки, а планки погрешностей представляли стандартную ошибку среднего (SEM). Фиг. 7D показывает процент живых CD3+/CD4+ или CD3+/CD8+ клеток в крови. Группы обработки, которые получали вариантный ICOSL ECD Fc с N52H/N57Y/Q100P (ECD, изложенный в SEQ ID NO: 113) или белатацепт, показали значимо разные уровни CD4+ Т-клеток по сравнению с группой обработки физраствором ($p = 0,008$ и $0,006$, соответственно, непарный критерий Стьюдента). Это исследование демонстрирует терапевтический эффект вариантного белка ICOSL Fc на первичных Т-клетках человека и GVHD на модели *in vivo*.

Пример 18. Оценка активации стековыми молекулами.

Вариантные слитые белки со стеком IGV Fc, содержащие домен NKp30 IGV в качестве локализирующего домена (обозначенный "L") и домен ICOSL IgV в качестве костимулирующего домена (обозначенный "C") получали и оценивали, по существу так, как описано в примере 8. В частности, конструкторы, протестированные в этом эксперименте, включают: (1) стековый конструктор с вариантным слитым белком IgV Fc (vIgD CL), содержащим NKp30, состоящий из Ig с консенсусного варианта NKp30 (SEQ ID NO: 493) и домена IgV вариантного ICOSL N52H/N57Y/Q100P (ECD, представленный в SEQ ID NO: 113 и IgV, представленный в SEQ ID NO: 201); (2) стековый конструктор с доменом Ig домена NKp30 дикого типа (SEQ ID NO: 214) и V-доменом ICOSL дикого типа (WT CL) (SEQ ID NO: 196); (3) конструктор с доменом ICOSL IgV дикого типа (домен WT C, SEQ ID NO: 196) и (3) конструктор с доменом NKp30 дикого типа (домен WT L, SEQ ID NO: 214).

Клетки CD32+ K562 были сконструированы для стабильного экспрессии B7-H6 на поверхности клетки. Затем клетки обрабатывали митомицином и рассевали с пан Т-клетками в присутствии/отсутствии 10 нМ анти-CD3 и стековых вариантов или контрольных доменов при 100, 33, 11 или 3,7 нМ. Клетки культивировали за 3 дня до сбора культуральных надосадочных жидкостей и измерения уровней IFN-гамма человека с использованием ELISA.

Как показано на фиг. 8, костимулирующие-локализирующие доменные стеки, как вариантные, так и дикого типа, были способны локализоваться на сконструированных клетках K562 и доставлять костимулирующий сигнал в пан-Т-клетки, чтобы индуцировать секрецию IFN-гамма. Стековая конструкция с вариантным слитым белком IgV Fc (vIgD C-L) показала результат с повышенной функциональной активностью во всех тестируемых концентрациях, в то время как индивидуальные доменные компоненты не оказывали воздействия, когда они не были объединены друг с другом.

Пример 19. Оценка гиперчувствительности замедленного типа *in vivo*.

Вариантные молекулы слитого белка ICOSL ECD-Fc оценивали на противовоспалительную активность *in vivo* в мышинной модели гиперчувствительности замедленного типа (DTH). Иммунные реакции гиперчувствительности замедленного типа выявляли у мышей, сенситизованных овальбумином (OVA), и оценивали ответ после провокационной пробы. Протестированные вариантные молекулы слитого белка ICOSL ECD-Fc, содержали вариант ECD со следующими аминокислотными заменами: N52H/N57Y/Q100P (ECD, представленный в SEQ ID NO: 113), N52H/Q100R (ECD, представленный в SEQ ID NO: 285), или N52H/N57Y/Q100R/F172S (ECD, представленный в SEQ ID NO: 291). Варианты были слиты либо с каркасом Fc, содержащим мутации C220S/L234A/L235E/G237A по нумерации EU (обозначенным Fc # 1), который представлен в SEQ ID NO: 477), либо с каркасом Fc, содержащим мутации C220S/E233P/L234V/L235A/G236del/S267K по нумерации EU (обозначенным Fc # 2), который представлен в SEQ ID NO: 478), либо с линкером G4S (GGGGS), либо без него. В табл. 26 приведены протестированные конструкторы.

Таблица 26

Слитые конструкторы ICOSL ECD-Fc

	ICOSL ECD (SEQ ID NO)	Линкер G4S	Fc (SEQ ID NO)
N52H/N57Y/Q100P (G4S)- Fc #1	113	+	477
N52H/Q100R (G4S)-Fc #1	285	+	477
N52H/N57Y/Q100R/F172S (G4S)-Fc	291	+	478
N52H/N57Y/Q100R/F172S (G4S)-Fc	291	+	477
N52H/N57Y/Q100R/F172S- Fc	291	-	477

Для сенсибилизации 8-недельным самкам мышей линии BALB/C вводили подкожно 100 мкг OVA, эмульгированного в адьюванте Sigma (100 мкл; каталожный № S6322-1VL) в основание хвоста на 0-й день. В дни 1 и 4 мышам вводили варианты слитые белки ICOSL ECD-Fc, 75 мкг CTLA-4 Fc (абатацепт) или PBS в качестве отрицательного контроля путем внутрибрюшинной инъекции. На 7-й день за два-три часа перед провокационной дозой OVA мышам путем внутрибрюшинной инъекции дополнительно вводили PBS в качестве контроля, 75 мкг CTLA-4 Fc (абатацепт из Orencia) или указанный вариант полипептид ICOSL. Абатацепт и различные молекулы слитого белка ICOSL-Fc дозировали в молярных эквивалентах.

Для провокационной дозы OVA проводили внутрикожную инъекцию 10 мкг OVA в левой ушной раковине в объеме 10 мкл PBS под газовой изофлурановой анестезией за 2-3 ч перед терапевтической обработкой. Исходное значение толщины ушей измеряли перед провокационной дозой OVA.

На 8-й день толщину уха измеряли под изофлурановой анестезией с помощью штангенциркуля Mitutoyo, и определили изменение толщины уха до и после провокационной дозы OVA. Как показано на фиг. 9, мыши, обработанные указанными вариантными молекулами слитого белка ICOSL ECD-Fc, показали значительно меньшее OVA-индуцированное набухание уха по сравнению с контролем PBS (<0,0001 по однофакторному дисперсионному анализу). Не было обнаружено существенных различий между толщиной ушей для мышей, обработанных абатацептом, по сравнению с любым из указанных вариантных слитых молекул белков ICOSL ECD-Fc или между обработками вариантными ICOSL. Эти результаты показывают, что варианты молекул ICOSL могут снижать иммунные ответы *in vivo*.

Пример 20. Получение и оценка связывания и активности вариантных ICOSL IgSF-доменсодержащих молекул.

Дополнительные варианты ICOSL IgSF (например, ECD) доменсодержащие молекулы, были получены, как описано ниже. В каждой из таблиц ниже в таблице указаны аминокислотные замены в ECD варианта ICOSL, обозначенные номером аминокислотного положения, соответствующим положениям аминокислот в соответствующей исходной немодифицированной последовательности внеклеточного домена ICOSL (ECD), представленной в SEQ ID NO: 32. В некоторых случаях удаление линкерной последовательности AAA варианта ICOSL ECD-Fc, обозначенной как "AAAA". В столбце 2 указан идентификатор SEQ ID NO для каждого вариантного домена ECD, содержащегося в вариантной молекуле слитого белка ECD-Fc.

А. Получение дополнительных вариантов 1.

Варианты растворимости.

Из коллекции мутантов, содержащих представленные ниже мутации, включающие E16V, N30D, K42E, N52H, N52Y, N52S, N57Y, E90A, Q100R, Q100P, L102R, V110D, H115R, F120S, V122A, F138L, I143V, I143T, H152C, K156M, F172S, N194D, C198R, L203P, R221I, I224V, мутации H115R, F172S и C198R были идентифицированы как мутации, которые могут потенциально повысить растворимость белка или усилить экспрессию белка ("мутации растворимости"). Эти три мутации (H115R, F172S и C198R) случайным образом вводили сайт-направленным мутагенезом в один и тот же набор клонов для получения набора производных, которые содержат одну или несколько из этих мутаций растворимости. Поскольку реакция направленного мутагенеза была проведена с объединенными мутагенными олигонуклеотидами, которые реагировали с объединенными родительскими клонами в одной реакции, некоторые из клонов также содержат некоторые мутации из других родительских клонов. Полученные варианты содержат от 3 до 10 различных аминокислотных мутаций в различных комбинациях, описанных в табл. 27А.

Таблица 27А

Примерные вариантные полипептиды ICOSL

Мутация(ии)	ECD SEQ ID NO
Дикий тип	32
N52H/N57Y/Q100R/H115R/C198R	435
N52H/N57Y/Q100R/F172S/C198R	436
N52H/N57Y/Q100R/H115R/F172S/C198R	437
N52H/N57Y/Q100R/H115R/I143V/F172S/C198R	438
N52H/N57Y/Q100R/L102R/H115R/F172S/C198R	439
N52H/V122A/F172S/C198R	440
N52H/N57Y/Q100R/H115R/F172S/N194D	441
N52H/N57Y/H115R/F172S/C198R	442
N52H/N57Y/Q100R/H115R/C198R	443
N52H/N57Y/H115R	444
N52H/N57Y/Q100R/H115R	445
N52H/N57Y/Q100R/H115R/F172S/I224V	446
N52H/N57Y/Q100R/H115R/F172S	447
N52H/N57Y/Q100R/F172S	448
N52H/Q100R/H115R/I143T/F172S	449
N52H/N57Y/Q100P/H115R/F172S	450
N52Y/N57Y/Q100P/F172S	451
E16V/N52H/N57Y/Q100R/V110D/H115R/C198R	452
E16V/N52H/N57Y/Q100R/V110D/H115R/Y152C/K156M/F172S/C198R	453
N52S/E90A/H115R	454
N30D/K42E N52S/H115R	455
N30D/K42E/N52S/H115R/C198R/R221I	456
N30D/K42E/N52S/H115R/C198R	457
N30D/K42E/N52S/H115R/F172S/N194D	458
N52S/H115R/F120S/I143V/C198R	459
N52S/H115R/F172S/C198R	460
N52H/N57Y/Q100P/C198R	461
N52H/N57Y/Q100P H115R/F172S/C198R	462
N52H/N57Y/Q100P/F172S/C198R	463
N52H/N57Y/Q100P/H115R	464
N52H/N57Y/Q100P/H115R/C198R	465
N52H/Q100R/C198R	466
N52H/Q100R/H115R/F172S	467
N52H/Q100R/H115X/F172S/C198R	468
N52H/Q100R/H115R/F172S/C198R	469
N52H/N57Y/Q100R /F172S/C198R	470

2. Обратные варианты.

Конкретные примеры мутаций, включая N52H, N52Y, N57Y, Q100R, Q100P, F138L, C198R, L203P, идентифицированные в отобранных вариантах, описанных в примере 6, были дополнительно объединены в каркасе ECD ICOSL дикого типа относительно положений, представленных в SEQ ID NO: 32 для создания дополнительных комбинированных вариантов. Полученные варианты, содержащие от 1 до 3 различных аминокислотных мутаций в различных комбинациях, представлены в табл. 27В.

Таблица 27В

Примерные вариантные полипептиды ICOSL

Мутация(ии)	ECD SEQ ID NO: ID NO
Дикий тип	32
Q100R	427
F138L/L203P	428
N52Y/F138L/L203P	429
N57Y/Q100R/C198R	430
N57Y/F138L/L203P	431
N52H	110
N57Y	121
N57Y/Q100P	122
Q100R/F138L	432
L203P	433

3. Варианты гликозилирования.

Примерные мутации гликозилирования, выбранные из N52H, N52Q, N84Q, N119Q, N155H, N155Q, N168Q, N207Q были объединены в различных комбинациях в каркасе ECD ICOSL дикого типа относительно положений, представленных в SEQ ID NO: 32, для получения дополнительных комбинированных вариантов. Полученные варианты содержат от 1 до 5 различных аминокислотных мутаций в различных комбинациях, представленных в табл. 27С. Мутации, обозначенные символом "X", обозначают либо N,

либо Q в указанном положении.

Таблица 27С (глик.)

Примерные варианты полипептиды ICOSL

Мутация(ии)	ECD SEQ ID NO
Дикий тип	32
N84Q	387
N119Q	388
N168Q	389
N207Q	390
N52Q/N207X	391
N168X/N207X	392
N52Q/N168Q	393
N84Q/N207Q	394
N155Q/N207Q	395
N119Q/N168Q	396
N119Q/N207Q	397
N119Q/N155X	398
N52Q/N84Q	399
N52Q/N119Q	400
N84Q/N119Q	401
N52Q/N84Q/N168Q	402
N52Q/N84Q/N207Q	403
N84Q/N155Q/N168Q	404
N84Q/N168Q/N207Q	405
N84Q/N155H/N207Q	406
N155Q/N168Q/N207Q	407
N119Q N155Q/N168Q	408
	409
N119Q/N168Q/N207Q	
N84Q/N119Q/N207Q	410
N119Q/N155H/N207Q	411
N84Q/N119Q/N155Q	412
N52Q/N119Q/N155Q	413
N52H/N84Q/N119Q	414
N52H/N84Q/N168X/N207X	415
N52Q/N84Q/N155X/N168X	416
N52Q/N84Q/N119Q/N168Q	417
N84Q/N119Q/N155Q/N168Q	418
N84Q/N155Q/N168Q/N207Q	419
N84Q/N119Q/N155Q/N207Q	420
N52Q/N84Q/N119Q/N207Q	421
N52Q/N84Q/N119Q/N155Q	422
N52Q/N84Q/N119Q/N155Q/N207Q	423
N84Q/N119Q/N155Q/N168Q/N207Q	424

В. Связывание с контрструктурами, экспрессируемыми клетками.

Дополнительные варианты были отформатированы как слитые с Fc белки, описанные в примере 4. Вариантные слитые с Fc молекулы оценивали в исследованиях связывания для оценки специфичности и аффинности вариантных иммуномодулирующих белков с доменом ICOSL к когнатным партнерам связывания. В исследованиях связывания, описанных в примере 6, использовали клетки Expi293, трансфицированные когнатными партнерами связывания CD28, ICOS и CTLA4 человека. MFI определяли для каждого трансфектанта и сравнивали с соответствующим немодифицированным (родительским) ECD-Fc.

Результаты по связыванию для примерных вариантных слитых молекул белков ICOSL ECD-Fc приведены в табл. 28А-С. Как показано в табл. 28А-С, варианты доменов ICOSL IgSF (например, ECD), полученные с различными комбинациями специфических мутаций, демонстрируют повышенное связывание, по меньшей мере, с одним, а в некоторых случаях более чем с одним, когнатным контрструктурным лигандом.

С. Характеризация биоактивности с помощью анализа коиммобилизации с анти-CD3.

Костимулирующую биоактивность полученных вариантных слитых с Fc молекул также оценивали в анализах коиммобилизации с анти-CD3, описанном в примере 6. В табл. 28А-С показано отношение IFN-гамма, продуцируемое каждым вариантом ECD-Fc в анализе, по сравнению с соответствующим немодифицированным ICOSL ECD-Fc (дикого типа). Мутации, обозначенные буквой "X", указывают на Q или остаток дикого типа, соответствующий указанному положению SEQ ID NO: 32 в указанном положении. Как показано, полученные вариантные слитые с Fc молекулы демонстрируют улучшенные активности в отношении увеличения иммунологической активности.

Таблица 28А

Последовательности молекул, данные связывания и данные костимулирующей биоактивности вариантных молекул ICOSLECD-Fc, включающих отобранные мутации

Мутации ICOSL	SEQ ID NO (ECD)	Связывание			Коиммобилизация с анти-CD3
		ICOS MFI (исходное соотношение)	CD28 MFI (исходное соотношение)	CTLA-4 MFI (исходное соотношение)	IFN-гамма пг/мл (исходное соотношение)
N52H, N57Y, Q100R, F172S, C198R	436	118145 (1,33)	59651 (29,60)	178790 (41,12)	5059 (37,90)
N52H, N57Y, Q100R, H115R, F172S, C198R	437	125341 (1,41)	51604 (25,60)	211000 (48,53)	8218 (61,57)
N52Y, N57Y,	451	121280 (1,37)	63663 (31,59)	174224 (40,07)	8123 (60,86)
Q100P, F172S					
E16V, N52H, N57Y, Q100R, V110D, H115R, Y152C, K156M, F172S, C198R	453	107819 (1,22)	68883 (34,18)	170080 (39,12)	8936 (66,95)
N52S, H115R, F120S, I143V, C198R	459	116235 (1,31)	25582 (12,69)	22483 (5,17)	125 (0,93)
N52H, N57Y, Q100P, C198R	461	107164 (1,21)	56103 (27,84)	172319 (39,63)	1258 (9,43)
N52H, N57Y, Q100P, H115R, F172S, C198R	462	120864 (1,36)	54586 (27,08)	176637 (40,63)	5507 (41,26)
N52H, N57Y, Q100P, F172S, C198R	463	117954 (1,33)	59376 (29,46)	151265 (34,79)	3884 (29,10)
N52H, N57Y, Q100P, H115R	464	126221 (1,42)	53321 (26,46)	178812 (41,13)	4154 (31,13)
N52H, N57Y, Q100P, H115R, C198R	465	137004 (1,55)	55454 (27,51)	148417 (34,14)	5069 (37,98)
N52H, Q100R, C198R	466	111428 (1,26)	58608 (29,08)	116111 (26,71)	3729 (27,94)
N52H, Q100R, H115R, F172S	467	105532 (1,19)	58287 (28,92)	106295 (24,45)	5294 (39,67)
N52H, Q100R, H115X, F172S,	468	106555 (1,20)	73397 (36,42)	171815 (39,52)	6961 (52,16)

C198R					
N52H, Q100R, H115R, F172S, C198R	469	114223 (1,29)	66686 (33,09)	157154 (36,15)	7592 (56,88)
N52H, N57Y, Q100R, F172S, C198R	470	99350 (1,12)	61292 (30,41)	182288 (41,93)	9167 (68,68)
N52H, N57Y, Q100R, H115R, F172S, C198R	437	114057 (1,29)	52011 (25,81)	146471 (33,69)	6545 (49,04)
N52H, N57Y, Q100R, H115R, F172S	447	136143 (1,54)	66516 (33,00)	177376 (40,80)	8527 (63,89)
N52H, N57Y, Q100R, H115R, F172S, C198R	437	132970 (1,50)	59633 (29,59)	133247 (30,65)	5999 (44,95)
Q100R	427	62064 (8,31)	16740 (8,31)	29654 (8,31)	35 (0,26)
Q100R ΔAAA	427	1594 (8,20)	16535 (8,20)	33457 (8,20)	87 (0,65)
F138L L203P	428	53804 (0,75)	1510 (0,75)	2151 (0,75)	35 (0,26)
F138L L203P ΔAAA	428	53044 (0,93)	1882 (0,93)	1623 (0,93)	35 (0,26)
N52Y F138L L203P	429	99761 (23,50)	47369 (23,50)	67300 (23,50)	1489 (11,16)
N52Y F138L L203P ΔAAA	429	59576 (26,23)	52865 (26,23)	66553 (26,23)	997 (7,47)
N57Y Q100R C198R	430	58706 (28,65)	57739 (28,65)	99426 (28,65)	9962 (74,64)
N57Y Q100R C198R ΔAAA	430	98514 (28,63)	57694 (28,63)	131458 (28,63)	6763 (50,67)
N57Y F138L	431	109472 (20,98)	42276 (20,98)	64477 (20,98)	4979 (37,30)
L203P					
N57Y F138L L203P ΔAAA	431	97777 (22,29)	44924 (22,29)	64742 (22,29)	6507 (48,75)
N52H	110	91598 (28,91)	58264 (28,91)	103025 (28,91)	3393 (25,42)
N57Y	121	109031 (21,71)	43754 (21,71)	50683 (21,71)	4881 (36,57)
N57Y, Q100P	122	72480 (29,85)	60161 (29,85)	109522 (29,85)	2797 (20,95)
Q100R, F138L	432	65974 (2,23)	4485 (2,23)	8136 (2,23)	685 (5,13)
L203P	433	61554 (0,76)	1533 (0,76)	2031 (0,76)	2434 (18,24)
ICOSL дикого типа ECD	32	88625 (1,00)	2015 (1,00)	4348 (1,00)	133 (1,00)

Таблица 28В

Последовательности молекул, данные связывания и данные костимулирующей биоактивности вариантных молекул ICOSLECD-Fc, включающих отобранные мутации

Мутации ICOSL	SEQ ID NO (ECD)	Связывание			Коиммобилизация с анти-CD3
		ICOS MFI (исходное соотношение)	CD28 MFI (исходное соотношение)	CTLA-4 MFI (исходное соотношение)	IFN-гамма пг/мл (исходное соотношение)
N52H, N57Y, Q100R, H115R	445	165027 (1,97)	51666 (9,89)	287581 (60,27)	5858 (20,36)
N52H, N57Y, Q100R, F172S	448	184449 (2,20)	51394 (9,84)	182109 (38,16)	3449 (11,99)
N52H, N57Y, Q100R, H115R, F172S, I224V	446	165120 (1,97)	46636 (8,93)	274026 (57,43)	2053 (7,13)
N52H, N57Y, Q100R, H115R, F172S	447	164750 (1,97)	40046 (7,67)	259351 (54,35)	3722 (12,93)
N52H, N57Y, Q100R, H115R, C198R	435	186017 (2,22)	39073 (7,48)	200505 (42,02)	3909 (13,58)
N52H, N57Y, Q100R, F172S, C198R	436	181118 (2,16)	38233 (7,32)	210709 (44,16)	1199 (4,17)
N52H, N57Y, Q100R, H115R, F172S, C198R	437	155392 (1,85)	28828 (5,52)	169736 (35,57)	3449 (11,99)

N52H, N57Y, Q100R, H115R, I143V, F172S, C198R	438	139977 (1,67)	31459 (6,02)	179089 (37,53)	1620 (5,63)
N52H, N57Y, Q100R, L102R H115R, F172S, C198R	439	146799 (1,75)	29636 (5,68)	200000 (41,91)	2712 (9,43)
N52H, N57Y, Q100R, H115R F172S, N194D	441	150863 (1,80)	31304 (5,99)	167783 (35,16)	15607 (54,24)
N52H, N57Y, H115R, F172S, C198R	442	126909 (1,51)	35803 (6,86)	152858 (32,03)	5374 (18,67)
N52H, N57Y, Q100R, H115R, C198R	443	131730 (1,57)	37595 (7,20)	139041 (29,14)	9306 (32,34)
N52H, N57Y, H115R	444	162632 (1,94)	49847 (9,55)	266878 (55,93)	2918 (10,14)
N52H, Q100R, H115R, I143T F172S	449	132873 (1,59)	52058 (9,97)	186366 (39,06)	3086 (10,72)
N52H, N57Y, Q100P, H115R, F172S	450	148160 (1,77)	46851 (8,97)	246636 (51,69)	4987 (17,33)
E16V, N52H, N57Y, Q100R, V110D, H115R, C198R	452	154036 (1,84)	48674 (9,32)	212905 (44,62)	5095 (17,71)
N52S, E90A, H115R	454	142963 (1,71)	3597 (0,69)	3772 (0,79)	2241 (7,79)
N30D, K42E, N52S, H115R, C198R R22II	456	124095 (1,48)	8066 (1,54)	7751 (1,62)	417 (1,45)
N30D, K42E, N52S, H115R, C198R	457	161734 (1,93)	2791 (0,53)	2919 (0,61)	841 (2,92)
N30D, K42E, N52S, H115R, F172S, N194D	458	117880 (1,41)	4395 (0,84)	4941 (1,04)	2904 (10,09)
N30D, K42E, N52S, H115R,	455	114107 (1,36)	2935 (0,56)	2748 (0,58)	549 (1,91)
N52S, E90A, H115R,	454	120450 (1,44)	12768 (2,45)	23282 (4,88)	2890 (10,04)
N30D, K42E, N52S, H115R	455	115273 (1,38)	11964 (2,29)	22779 (4,77)	2241 (7,79)
N52S, H115R, F172S, C198R	460	95537 (1,14)	7614 (1,46)	21701 (4,55)	1458 (5,07)
Дикий тип	32	83813 (1,00)	5222 (1,00)	4772 (1,00)	288 (1,00)

Таблица 28С

Последовательности молекул, данные связывания и данные костимулирующей биоактивности вариантных молекул ICOSLECD-Fc, включающих мутации гликозилирования

Мутация(ии) ICOSL	SSEQ ID NO (ECD)	Связывание			Коиммобилизация с анти-CD3 IFN-гамма пг/мл (исходное соотношение)
		ICOS MFI (исходное соотношение)	CD28 MFI (исходное соотношение)	CTLA-4 MFI (исходное соотношение)	
N84Q	387	34426 (0,94)	1755 (1,16)	5757 (1,51)	100 (2,03)
N119Q	388	30806 (0,84)	4102 (2,70)	19836 (5,21)	81 (1,66)
N168Q	389	27041 (0,74)	1410 (0,93)	18641 (4,90)	67 (1,36)
N207Q	390	36516 (1,00)	11923 (7,86)	25701 (6,76)	206 (4,20)
N52Q, N207X	391	30216 (0,83)	12086 (7,97)	27952 (7,35)	77 (1,56)
N168X, N207X	392	37191 (1,02)	5787 (3,81)	12280 (3,23)	104 (2,12)
N52Q, N168Q	393	32576 (0,89)	12638 (8,33)	27167 (7,14)	101 (2,06)
N84Q, N207Q	394	37176 (1,02)	5292 (3,49)	3153 (0,83)	31 (0,63)
N155Q, N207Q	395	34884 (0,95)	1489 (0,98)	987 (0,26)	73 (1,48)
N119Q, N168Q	396	29099 (0,80)	2534 (1,67)	11289 (2,97)	51 (1,05)
N119Q, N207Q	397	32603 (0,89)	1861 (1,23)	6795 (1,79)	153 (3,12)
N119Q N155X	398	38516 (1,05)	15318 (10,10)	27498 (7,23)	173 (3,52)
N52Q, N84Q	399	33988 (0,93)	1675 (1,10)	3525 (0,93)	39 (0,80)
N52Q, N119Q	400	35729 (0,98)	11040 (7,28)	26139 (6,87)	51 (1,03)
N84Q, N119Q	401	34777 (0,95)	1493 (0,98)	2877 (0,76)	39 (0,80)
N52Q, N84Q, N168Q	402	27021 (0,74)	1584 (1,04)	958 (0,25)	38 (0,78)
N52Q, N84Q, N207Q	403	39942 (1,09)	13396 (8,83)	26360 (6,93)	37 (0,76)
N84Q, N155Q, N168Q	404	27812 (0,76)	357 (0,24)	466 (0,12)	30 (0,61)
N84Q, N168Q, N207Q	405	30659 (0,84)	737 (0,49)	861 (0,23)	25 (0,52)
N84Q, N155H, N207Q	406	13557 (0,37)	685 (0,45)	607 (0,16)	29 (0,59)
N155Q, N168Q,	407	13999 (0,38)	277 (0,18)	317 (0,08)	40 (0,82)

N207Q					
N119Q, N155Q, N168Q	408	36896 (1,01)	4094 (2,70)	2179 (0,57)	50 (1,02)
N119Q, N168Q, N207Q	409	29543 (0,81)	921 (0,61)	3744 (0,98)	72 (1,47)
N84Q, N119Q, N207Q	410	21357 (0,58)	569 (0,38)	640 (0,17)	59 (1,20)
N119Q, N155H, N207Q	411	37310 (1,02)	614 (0,40)	931 (0,24)	86 (1,75)
N84Q, N119Q, N155Q	412	2675 (0,07)	262 (0,17)	291 (0,08)	34 (0,70)
N52Q, N119Q, N155Q	413	27853 (0,76)	552 (0,36)	772 (0,20)	42 (0,87)
N52H, N84Q, N119Q	414	40700 (1,11)	4580 (3,02)	4601 (1,21)	39 (0,80)
N52H, N84Q, N168X, N207X	415	8796 (0,24)	587 (0,39)	481 (0,13)	32 (0,66)
N52Q, N84Q, N155X, N168X	416	43521 (1,19)	6605 (4,35)	4811 (1,26)	32 (0,66)
N52Q, N84Q, N119Q, N168Q	417	39342 (1,07)	4519 (2,98)	3300 (0,87)	37 (0,76)
N52Q, N84Q, N119Q, N207Q	421	7011 (0,19)	602 (0,40)	433 (0,11)	37 (0,75)
ICOSL дикого типа ECD	32	36602 (1,00)	1517 (1,00)	3804 (1,00)	49 (1,00)

Пример 21. Получение и оценка слитых молекул белков с помощью антитела, нацеленного на HER2.

Этот пример описывает получение и оценку вариантных слитых молекул белков ICOSL ECD-Fc, конъюгированных с нацеливающим на опухоль агентом, для образования конъюгата ("конъюгат vIgD").

V-домен только из ICOSL vIgD (N52H/N57Y/Q100P, представленный в SEQ ID NO: 201) был объединен с амино- и карбоксильными концами легкой цепи (фиг. 10A) и тяжелой цепи (фиг. 10B) антитела, нацеленного на HER2, с промежуточными линкерами GGGSGGGS. Примерные конфигурации конъюгатов vIgD показаны на фиг. 10C.

Для оценки связывания с HER2, трансфектанты Expi293 с ДНК HER2 или пустого контроля окрашивали титруемыми количествами антитела, нацеленного на HER2, которое содержит конъюгат вариантного ICOSL (конъюгат vIgD N52H/N57Y/Q100P) в концентрациях от 100 пМ до 100 нМ. Были также протестированы контрольные белки, включая слитый белок ICOSL ECD-Fc дикого типа, слитый белок PD-L2 IgV-Fc дикого типа, и вариантную слитую молекулу белка ICOSL ECD-Fc с мутациями в N52H/N57Y/Q100P. Для каждого трансфектанта определяли среднюю интенсивность флуоресценции (MFI) или процент положительных клеток, как описано в Примере 6. Все конъюгаты IgSF, полученные, как показано на фиг. 11A, B, сохраняли связывание с HER2 по сравнению с эндогенным уровнем экспрессии HER2, наблюдаемым в клетках Expi293. Аналогично, конъюгаты vIgD также демонстрировали связывание с когнатыми партнерами связывания ICOSL, включая CD28, CTLA-4 и ICOS.

Биологическую активность белка и пролиферацию человеческих первичных Т-клеток в анализах *in vitro* также характеризовали, как описано в примере 6. Конъюгаты vIgD связывали в течение ночи с 96-луночными планшетами при 30-0,1 нМ в присутствии 10 нМ анти-CD3. Планшеты промывали и 100 000 меченых CFSE пан Т-клеток добавляли к планшетам и инкубировали в течение 72 ч. Уровни IFN-гамма в надосадочной жидкости анализировали с помощью ELISA. Как показано на фиг. 12, конъюгаты vIgD с указанными конфигурациями показали большую секрецию IFN-гамма и пролиферацию по сравнению с конъюгатом родительской слитой молекулы белка ICOSL ECD-Fc дикого типа.

Пример 22. Транскрипционная сигнатура "Nanostring" первичных Т-клеток человека.

Культуральные планшеты ткани покрывали 10 нМ анти-CD3 с 40 нМ контрольного белка Fc, ICOSL-Fc дикого типа, CD80-Fc дикого типа, обоими этими белками, или вариантными слитыми белками ICOSL-Fc с указанными мутациями. Очищенные человеческие Т-клетки затем высевали на планшеты, покрытые белком, и инкубировали при 37°C. Культуры из каждой обрабатываемой группы, описанной выше, собирали через 24, 48 и 72 ч, и выделяли общую РНК из каждого образца клеток. РНК переносили на Nanostring и чип Cancer Immune использовали для количественного определения транскриптов 750

генов в каждом образце. Значения транскриптов были нормализованы с использованием проприетарного программного обеспечения Nanostring, позволяющего сравнивать уровни транскрипции между группами обработки и в течение различных временных периодов. Как показано на фиг. 18 и 19, протестированные варианты полипептиды ICOSL ECD-Fc продемонстрировали измененную воспалительную активность по сравнению с CD80 ECD-Fc дикого типа, ICOSL ECD-Fc дикого типа или их комбинации.

Пример 23. Получение и оценка слитых молекул белков с помощью антитела, нацеленного на HER2.

Пролиферация человеческих Т-клеток, культивируемых совместно с VmAb и целевыми клетками, экспрессирующими HER2, также была охарактеризована. CFSE-меченые пан-Т-клетки стимулировали в течение 72 ч с помощью искусственных клеток-мишеней, полученных из клеток K562, презентующих анти-CD3 одноцепочечную Fv (OKT3) клеточной поверхности и HER2 в присутствии VmAb или контрольных белков. Пролиферацию измеряли с помощью проточного цитометрического анализа CFSE-разведения на окрашенных CD4⁺ или CD8⁺ Т-клетках. Vmab анализировали, изменяя либо количество клеток-мишеней, либо концентрацию используемого VmAb. В первом анализе клетки-мишени K562 титровали от 2500 до 78 клеток/лунку и добавляли к 100000 Т-клеток для диапазона эффектор: мишень (Е:Т) от 40 до 1280:1. VmAb, родительский домен IgSF или WT ICOSL добавляли в концентрации 1000 пМ. Во втором анализе клетки-мишени K562 добавляли в количестве от 625 клеток/лунку до 100 000 Т-клеток для соотношения эффектор:мишень 160:1. VmAb или контрольные белки титровали и добавляли при температуре от 3000 до 37 пМ. Как показано на фиг. 20А и 20В, обе конфигурации анализа демонстрируют, что VmAb, содержащие конъюгат vIgD, обеспечивают превосходную пролиферацию по сравнению с родительским антителом, родительским доменом IgSF или WT ICOSL. Кроме того, vIgD-конъюгаты опосредуют пролиферацию при низких соотношениях Е:Т (1280:1) или при низких концентрациях белка (37 пМ).

Настоящее изобретение не должно быть ограничено в объеме конкретными раскрытыми воплощениями, которые предоставляются, например, для иллюстрации различных аспектов настоящего изобретения. Различные модификации описанных композиций и способов станут очевидными из описания и положений настоящего изобретения. Такие вариации могут быть осуществлены на практике без отхода от истинного объема и духа изобретения и предназначены для того, чтобы подпадать под объем настоящего изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Вариантный полипептид ICOSL, включающий домен IgV:

где вариантный полипептид ICOSL содержит аминокислотную замену N52H в немодифицированном ICOSL с отсылкой на SEQ ID NO: 32 или ее часть, содержащую домен IgV, где домен IgV представлен аминокислотами 19-129 в SEQ ID NO: 5, где:

вариантный полипептид ICOSL содержит последовательность аминокислот, которая проявляет по меньшей мере 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 32 или частью SEQ ID NO: 32, содержащей указанный домен IgV; и

вариантный полипептид ICOSL специфически связывается с эктодоменом человеческого CD28 с увеличенной аффинностью по сравнению с немодифицированным ICOSL.

2. Вариантный полипептид ICOSL по п.1, отличающийся тем, что вариантный ICOSL включает до 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 аминокислотных замен.

3. Вариантный ICOSL по п.1 или 2, в котором вариантный ICOSL включает аминокислотную последовательность, которая имеет, по меньшей мере, 96, 97, 98 или 99% идентичности с последовательностью SEQ ID NO: 32 или ее частью, содержащей домен IgV.

4. Вариантный полипептид ICOSL по любому из пп.1-3, отличающийся тем, что вариантный ICOSL содержит аминокислотные замены, выбранные из N52H/N57Y/Q100P, N52H/C198R, N52H/C140del/T225A, N52H/C198R/T225A, N52H/K92R, N52H/S99G, N52H/L161P/C198R, N52H/I143T, N52H/N57Y/Q100R, N52H/Q100R, N52H/N57Y/Q100R/V122A, N52H/N57Y/Q100R/F172S, E16V/N52H/N57Y/Q100R/V110D/H115R/Y152C/K156M/C198R, N52H/N57Y/Q100R/V110D/C198R, N52H/N57Y/V110A/C198R/R221I, M10I/S13G/N52H/N57Y/D77G/V110A/H129P/I143V/F172S/V193M/C198R, N52H/N57Y/Q100R/V110D/C198R/S212G, N52H/N57Y/Q100R/L102R/V110D/H115R/C198R, N52H/N57Y/Q100R/C198R, N52H/N57Y/L74Q/V110D/S192G, N52H/S121G/C198R, N52H/N84Q/N119Q, N52H/N57Y/Q100R/H115R/C198R, N52H/N57Y/Q100R/H115R/F172S/C198R, N52H/N57Y/Q100R/H115R/I143V/F172S/C198R, N52H/N57Y/Q100R/L102R/H115R/F172S/C198R, N52H/N57Y/Q100R/H115R/F172S/N194D, N52H/N57Y/H115R/F172S/C198R, N52H/N57Y/H115R, N52H/N57Y/Q100R/H115R/F172S/I224V, N52H/N57Y/Q100R/H115R/F172S, N52H/Q100R/H115R/I143T/F172S, N52H/N57Y/Q100P/H115R/F172S, E16V/N52H/N57Y/Q100R/V110D/H115R/C198R, E16V/N52H/N57Y/Q100R/V110D/H115R/Y152C/K156M/F172S/C198R, N52H/N57Y/Q100P/C198R,

N52H/N57Y/Q100P/F172S/C198R, N52H/N57Y/Q100P/H115R, N52H/N57Y/Q100P/H115R/C198R,
 N52H/Q100R/C198R, N52H/Q100R/H115R/F172S, N52H/Q100R/H115R/F172S/C198R,
 N52H/N57Y/Q100R/F172S/C198R, N52H/N57Y/Q100P/H115R/F172S/C198R,
 N52H/Q100R/H115X/F172S/C198R, N52H/N57Y/Q100R/V107I/V110D/S132F/I154F/C198R/R221G,
 Q37R/N52H/N57Y/Q100R/V110N/S142F/C198R/D217V/R221G, F27S/N52H/N57Y/V110N,
 V11E/N30D/N52H/N57Y/H94E/L96I/L98F/N194D/V210A/I218T,
 N52H/N57Y/H94E/L96I/F120I/S126TAV153R/I218N, N52H/N57Y/Q100R/V110D/F172S/C198R,
 S25G/F27C/N52H/N57Y/Q100R/V110D/E135K/L173S/C198R,
 N52H/N57Y/Q100R/V110D/N144D/F172S/C198R, A20V/N52H/N57Y/Q100R/S109G,
 N52H/N57Y/R61S/Q100R/V110D/L173S, N52H/S121G, N52H/N84Q, N52H/F78L/Q100R,
 N52H/N57Y/Q100R/V110D/S132F/M175T, N52H/N57Y/Q100R/V107I/V110D/I154F/C198R/R221G,
 N52H/Q100R/F172S/C198R.

5. Вариантный полипептид ICOSL по любому из пп.1-4, где вариантный ICOSL содержит аминокислотные замены N52H/N57Y/Q100R.

6. Вариантный полипептид ICOSL по любому из пп.1-5, включающий аминокислотную последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO: 110, 113, 115, 117-119, 128, 135, 280, 283, 285, 287, 289-292, 300-302, 304, 308, 310, 315-318, 321, 364, 365, 367, 372, 375, 376, 381, 435-439, 441-450, 452, 453, 461-470 или аминокислотную последовательность, которая имеет, по меньшей мере, 95% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 110, 113, 115, 117-119, 128, 135, 280, 283, 285, 287, 289-292, 300-302, 304, 308, 310, 315-318, 321, 364, 365, 367, 372, 375, 376, 381, 435-439, 441-450, 452, 453, 461-470.

7. Вариантный полипептид ICOSL по любому из пп.1-6, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO: 110, 113, 115, 117-119, 128, 135, 280, 283, 285, 287, 289-292, 300-302, 304, 308, 310, 315-318, 321, 364, 365, 367, 372, 375, 376, 381, 435-439, 441-450, 452, 453, 461-470.

8. Вариантный полипептид ICOSL по любому из пп.1-7, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO: 198, 201-203, 326-334, 337, 386.

9. Вариантный полипептид ICOSL по любому из пп.1-8, отличающийся тем, что домен IgV является единственным доменом суперсемейства иммуноглобулинов вариантного полипептида ICOSL.

10. Вариантный полипептид ICOSL по любому из пп.1-9, включающий аминокислотную последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO: 198, 201-203, 326-334, 337, 386, или аминокислотную последовательность, которая имеет, по меньшей мере, 95% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 198, 201-203, 326-334, 337, 386 или ее специфическим связывающим фрагментом, и включает одну или несколько аминокислотных замен.

11. Вариантный полипептид ICOSL по любому из пп.1-10, отличающийся тем, что вариантный полипептид ICOSL специфически связывается с каждым из эктодомена человеческого ICOS и эктодомена человеческого CD28 с повышенной аффинностью по сравнению со связыванием немодифицированного ICOSL с эктодоменом человеческого ICOS и человеческого CD28.

12. Вариантный полипептид ICOSL по любому из пп.1-11, отличающийся тем, что повышенная аффинность к эктодомену CD28 увеличивается более чем в 1,2, в 1,5, в 2, в 3, в 4, в 5, в 6, в 7, в 8, в 9, в 10, в 20, в 30, в 40, в 50 или в 60 раз по сравнению с немодифицированным ICOSL.

13. Вариантный полипептид ICOSL по п.11, отличающийся тем, что повышенная аффинность к эктодомену ICOS увеличивается более чем в 1,2, в 1,5, в 2, в 3, в 4, в 5, в 6, в 7, в 8, в 9, в 10, в 20, в 30, в 40, в 50, в 60 или в 70 раз по сравнению с немодифицированным ICOSL.

14. Вариантный полипептид ICOSL по любому из пп.1-13, который является растворимым белком.

15. Вариантный полипептид ICOSL по любому из пп.1-14, который связан с доменом мультимеризации.

16. Вариантный полипептид ICOSL по любому из пп.1-15, где вариантный полипептид ICOSL является трансмембранным иммуномодулирующим белком, содержащим трансмембранный домен, связанный с внеклеточным доменом (ECD) вариантного полипептида ICOSL, и также содержит цитоплазматический сигнальный домен, связанный с трансмембранным доменом.

17. Вариантный слитый белок ICOSL-Fc, содержащий вариантный полипептид ICOSL по любому из пп.1-16 и домен Fc.

18. Вариантный слитый белок ICOSL-Fc по п.17, где Fc домен является вариантным доменом Fc с уменьшенной эффекторной функцией.

19. Вариантный слитый белок ICOSL-Fc, содержащий вариантный полипептид ICOSL, слитый посредством линкера с Fc доменом, где:

(i) вариантный полипептид ICOSL содержит аминокислотные замены N52H/N57Y/Q100P в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:32 или в ее части, содержащей домен IgV, где домен IgV представлен аминокислотами 19-129 в SEQ ID NO:5; и

(ii) домен Fc является вариантным человеческим IgG1 Fc со сниженной эффекторной функцией.

20. Вариантный слитый белок ICOSL-Fc, содержащий вариантный полипептид ICOSL, слитый посредством линкера с Fc доменом, где:

(i) вариантный полипептид ICOSL содержит аминокислотные замены N52H/N57Y/Q100R в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:32 или в ее части, содержащей домен IgV, где домен IgV представлен аминокислотами 19-129 в SEQ ID NO: 5; и

(ii) домен Fc является вариантным человеческим IgG1 Fc со сниженной эффекторной функцией.

21. Вариантный слитый белок ICOSL-Fc, содержащий вариантный полипептид ICOSL, слитый посредством линкера с Fc доменом, где:

(i) вариантный полипептид ICOSL содержит аминокислотные замены N52H/Q100R в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:32 или в ее части, содержащей домен IgV, где домен IgV представлен аминокислотами 19-129 в SEQ ID NO: 5; и

(ii) домен Fc является вариантным человеческим IgG1 Fc со сниженной эффекторной функцией.

22. Вариантный слитый белок ICOSL-Fc по любому из пп.16-21, где домен Fc содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO:226 или SEQ ID NO: 227, или аминокислотную последовательность, которая демонстрирует по меньшей мере 85% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 226 или SEQ ID NO: 227.

23. Вариантный слитый белок ICOSL-Fc по любому из пп.17-22, где домен Fc содержит одну или несколько аминокислотных модификаций, выбранных среди E233P, L234A, L234V, L235A, L235E, G236del, G237A, S267K, R292C, N297G и V302C, каждая из которых в соответствии с нумерацией EU.

24. Вариантный слитый белок ICOSL-Fc по любому из пп.17-23, где домен Fc содержит аминокислотную модификацию C220S согласно нумерации EU.

25. Вариантный слитый белок ICOSL-Fc по любому из пп.17-24, где домен Fc содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 474, 476, 477, 478 или аминокислотную последовательность, которая демонстрирует по меньшей мере 85% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 474, 476, 477, 478 и проявляет сниженную эффекторную функцию.

26. Вариантный слитый белок ICOSL-Fc по любому из пп.17-25, где вариантный полипептид ICOSL связан с доменом Fc через линкер G4S.

27. Вариантный слитый белок ICOSL-Fc по любому из пп.17-26, который является димером.

28. Вариантный слитый белок ICOSL-Fc по п.27, который является гомодимером.

29. Конъюгат, содержащий вариантный полипептид ICOSL по любому из пп.1-16, связанный с фрагментом, где фрагмент представляет собой нацеливающий фрагмент, который специфически связывается с молекулой на поверхности клетки.

30. Конъюгат, содержащий слитый белок вариантного ICOSL-Fc по любому из пп.17-28, связанный с фрагментом, где фрагмент представляет собой нацеливающий фрагмент, который специфически связывается с молекулой на поверхности клетки.

31. Конъюгат по п.29 или 30, отличающийся тем, что нацеливающий фрагмент специфически связывается с молекулой на поверхности иммунной клетки.

32. Конъюгат по п.29 или 30, отличающийся тем, что нацеливающий фрагмент представляет собой фрагмент, локализуемый опухоль, который связывается с молекулой на поверхности опухоли.

33. Конъюгат по любому из пп.29-32, отличающийся тем, что фрагмент представляет собой антителило или антигенсвязывающий фрагмент.

34. Конъюгат по любому из пп.29-33, который представляет собой слитый белок.

35. Молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая вариантный полипептид ICOSL по любому из пп.1-16.

36. Молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая вариантный слитый полипептид ICOSL-Fc по любому из пп.17-28.

37. Вектор, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты по п.35.

38. Вектор, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты по п.36.

39. Вектор по п.37 или 38, который является экспрессирующим вектором.

40. Вектор по любому из пп.37-39, отличающийся тем, что вектор представляет собой экспрессирующий вектор млекопитающих или вирусный вектор.

41. Клетка, включающая молекулу нуклеиновой кислоты по п.35 или 36.

42. Клетка, включающая вектор по любому из пп.37-40.

43. Клетка по п.41 или 42, которая является клеткой млекопитающего.

44. Клетка по любому из пп.41-43, которая является клеткой человека.

45. Способ получения вариантного полипептида ICOSL, включающий введение молекулы нуклеиновой кислоты по п.35 или 36 или вектора по любому из пп.37-40 в клетку-хозяина в условиях для экспрессии белка в клетке.

46. Способ получения вариантного слитого белка ICOSL-Fc, включающий введение молекулы нуклеиновой кислоты по п.35 или 36 или вектора по любому из пп.37-40 в клетку-хозяина в условиях для экспрессии белка в клетке.

47. Способ по п.45 или 46, дополнительно включающий выделение или очистку вариантного полипептида ICOSL или вариантного слитого белка ICOSL-Fc из клетки.

48. Способ конструирования клетки *in vitro*, экспрессирующей вариантный полипептид ICOSL,

включающий введение молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей вариантный полипептид ICOSL по любому из пп.1-16 в клетку-хозяина в условиях, в которых полипептид экспрессируется в клетке.

49. Способ конструирования клетки *in vitro*, экспрессирующей вариантный слитый белок ICOSL-Fc, включающий введение молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей вариантный слитый белок ICOSL-Fc по любому из пп.17-28 в клетку-хозяина в условиях, в которых полипептид экспрессируется в клетке.

50. Сконструированная клетка, включающая вариантный полипептид ICOSL по любому из пп.1-16, или слитый белок ICOSL-Fc по любому из пп.17-28, молекулу нуклеиновой кислоты по п.35 или 36 или вектор по любому из пп.37-40.

51. Сконструированная клетка по п.50, отличающаяся тем, что клетка представляет собой иммунную клетку.

52. Сконструированная клетка по п.50 или 51, дополнительно включающая химерный антигенный рецептор (CAR) или сконструированный Т-клеточный рецептор.

53. Инфекционный агент, содержащий нуклеотидную молекулу, кодирующую вариантный полипептид ICOSL по любому из пп.1-16 или вариантный слитый белок ICOSL-Fc по любому из пп.17-28, где инфекционный агент представляет собой бактерию или вирус.

54. Фармацевтическая композиция, включающая вариантный полипептид ICOSL по любому из пп.1-16 и фармацевтически приемлемый эксципиент.

55. Фармацевтическая композиция, включающая вариантный слитый белок ICOSL-Fc по любому из пп.17-28 и фармацевтически приемлемый эксципиент.

56. Фармацевтическая композиция, включающая конъюгат по любому из пп.29-34 и фармацевтически приемлемый эксципиент.

57. Фармацевтическая композиция, включающая сконструированную клетку по любому из пп.50-52 и фармацевтически приемлемый эксципиент.

58. Фармацевтическая композиция, включающая инфекционный агент по п.53 и фармацевтически приемлемый эксципиент.

59. Флакон, включающий фармацевтическую композицию по любому из пп.54-58.

60. Набор для использования в лечении аутоиммунного или воспалительного заболевания у субъекта, включающий фармацевтическую композицию по любому из пп.54-58 или флакон по п.59 и инструкции по применению.

61. Применение фармацевтической композиции по любому из пп.54-58 для получения лекарства для применения в целях модулирования иммунного ответа у млекопитающего, где модулирование иммунного ответа лечит аутоиммунное или воспалительное заболевание у млекопитающего.

62. Применение фармацевтической композиции по любому из пп.54-58 для модулирования иммунного ответа у млекопитающего, где модулирование иммунного ответа лечит аутоиммунное или воспалительное заболевание у млекопитающего.

63. Способ модулирования иммунного ответа у субъекта, включающий введение фармацевтической композиции по любому из пп.54-58 субъекту.

64. Способ по п.58, отличающийся тем, что модуляция иммунного ответа лечит заболевание или состояние у субъекта.

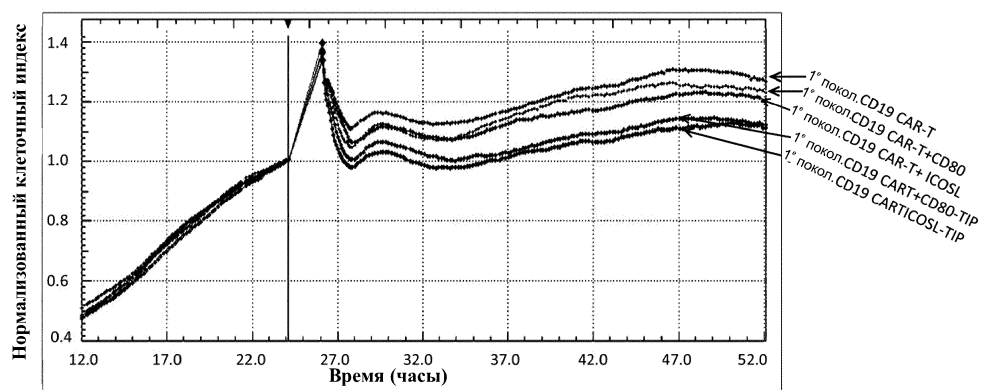
65. Способ по п.63 или 64, отличающийся тем, что иммунный ответ снижен.

66. Способ лечения заболевания или состояния у субъекта, включающий введение фармацевтической композиции по любому из пп.54-58 субъекту.

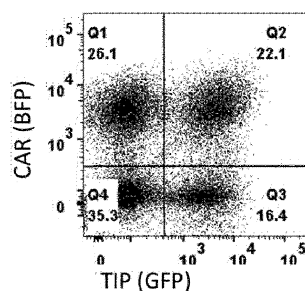
67. Способ по любому из пп.64-66, отличающийся тем, что заболевание или состояние являются воспалительным или аутоиммунным заболеванием или состоянием.

68. Способ по любому из пп.64-67, отличающийся тем, что заболевание или состояние представляют собой васкулит, ассоциированный с антинейтрофильными цитоплазматическими антителами (ANCA), васкулит, аутоиммунное заболевание кожи, трансплантацию, ревматическую болезнь, воспалительное желудочно-кишечное заболевание, воспалительное заболевание глаз, воспалительное неврологическое заболевание, воспалительное заболевание легкого, воспалительное эндокринное заболевание или аутоиммунное гематологическое заболевание.

69. Способ по любому из пп.64-68, отличающийся тем, что заболевание или состояние выбрано из воспалительного заболевания кишечника, трансплантации, болезни Крона, язвенного колита, рассеянного склероза, астмы, ревматоидного артрита, псориаза, болезни трансплантат против хозяина (GVHD) или системной красной волчанки (SLE).

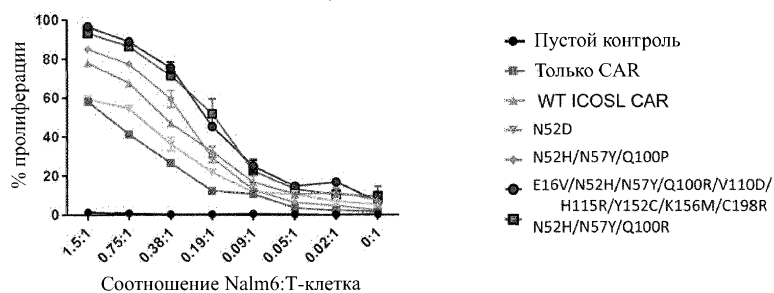


Фиг. 1

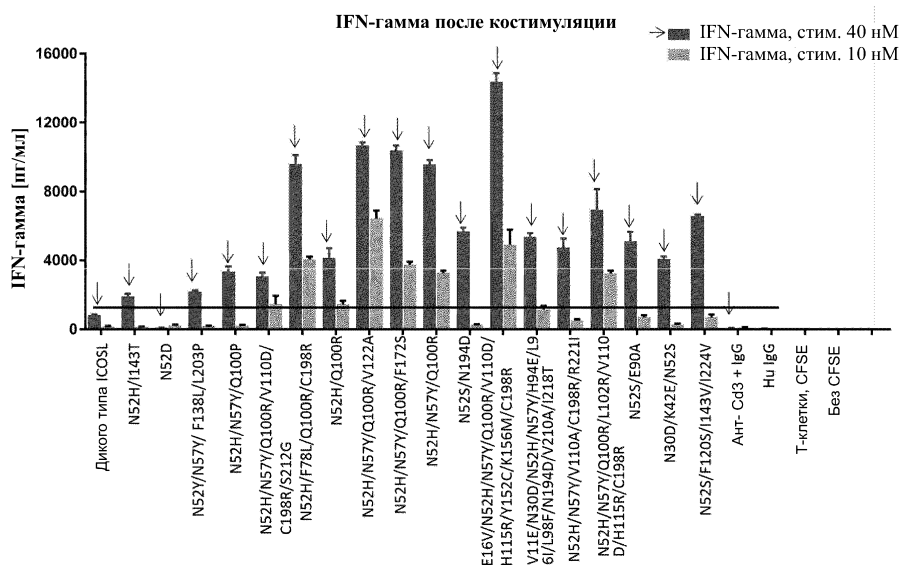


Фиг. 2А

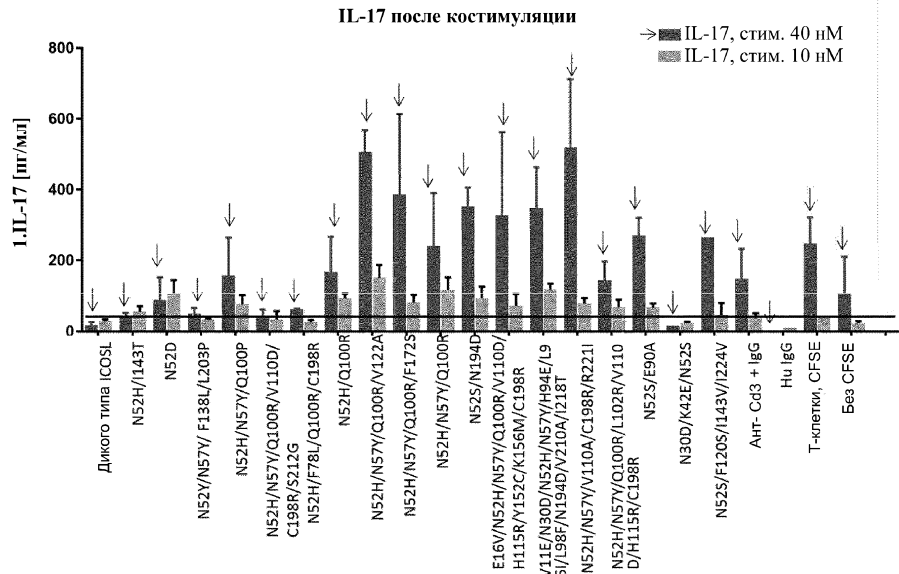
Пролиферация: отбор по сигналу выше порогового значения на общих CAR+ T-клетках



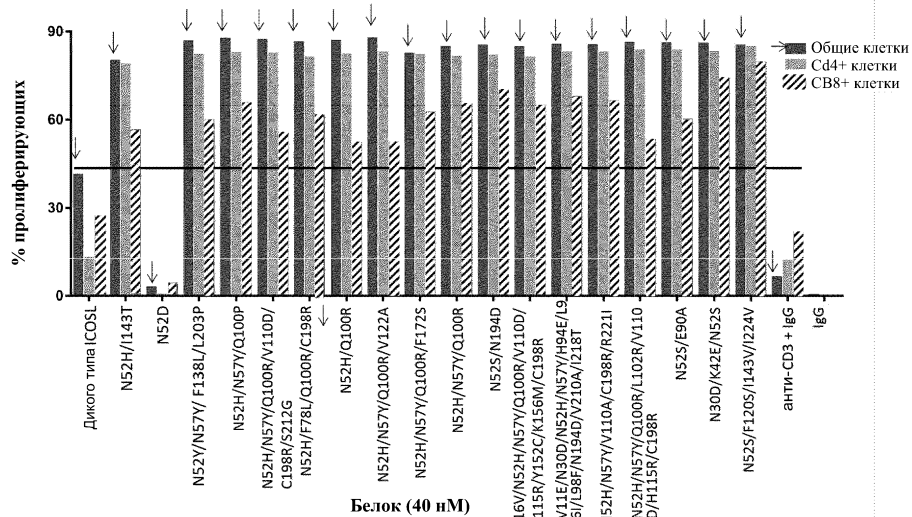
Фиг. 2В



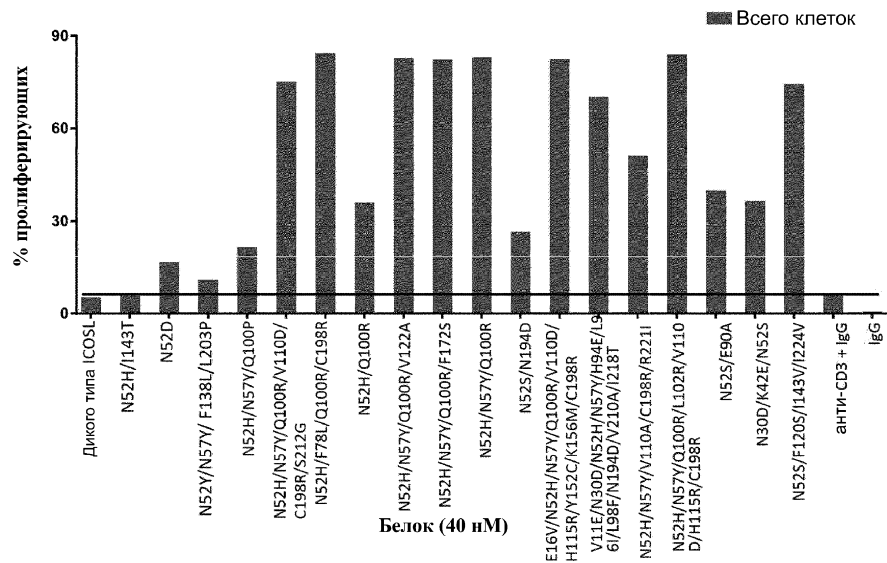
Фиг. 3А



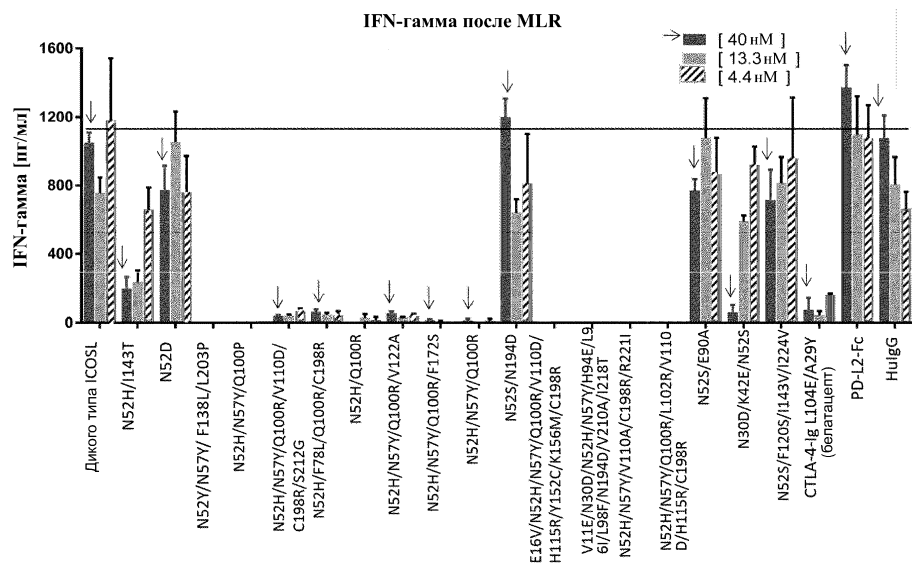
Фиг. 3В



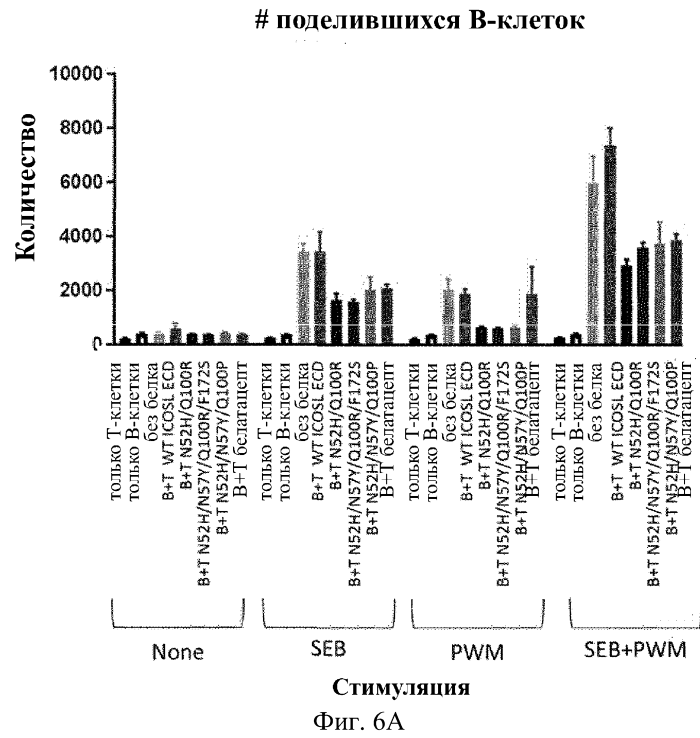
Фиг. 4А



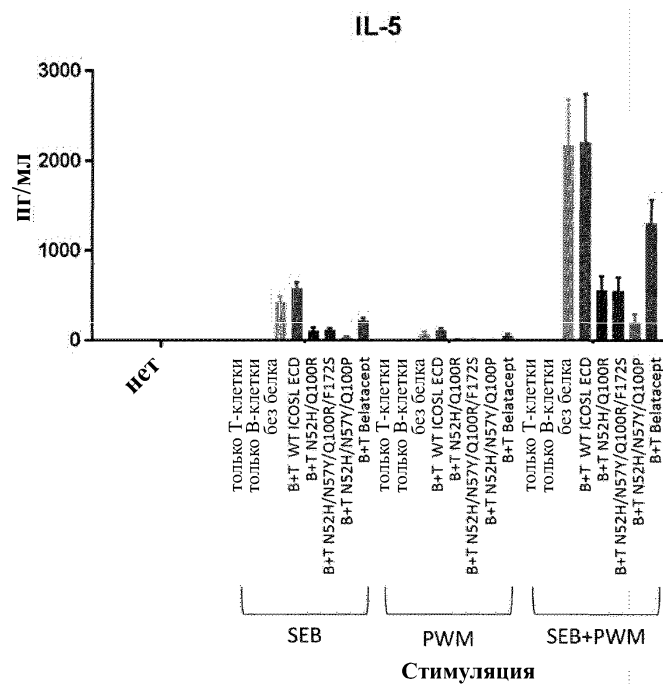
Фиг. 4В



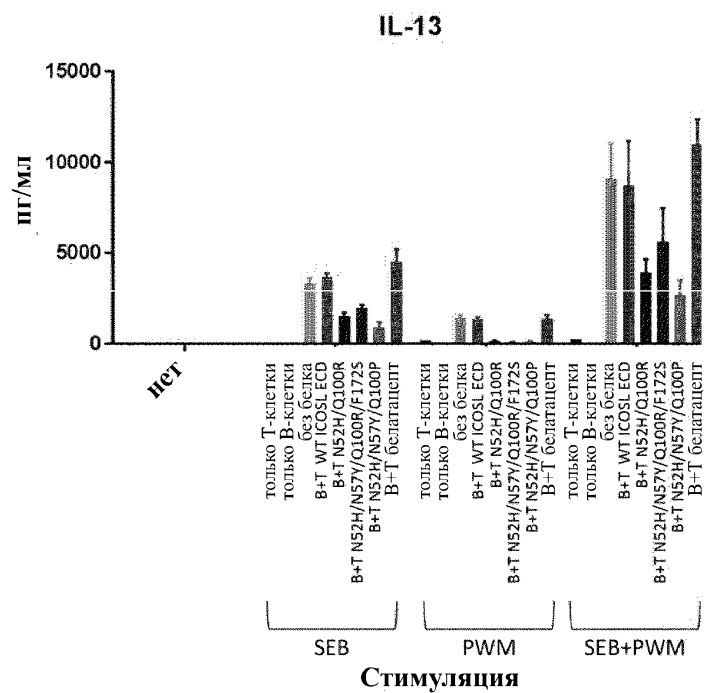
Фиг. 5



Фиг. 6А

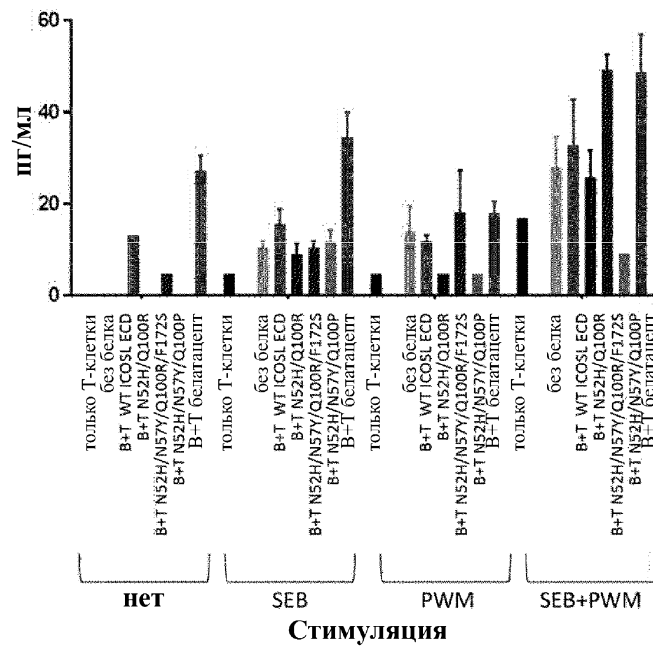


Фиг. 6В

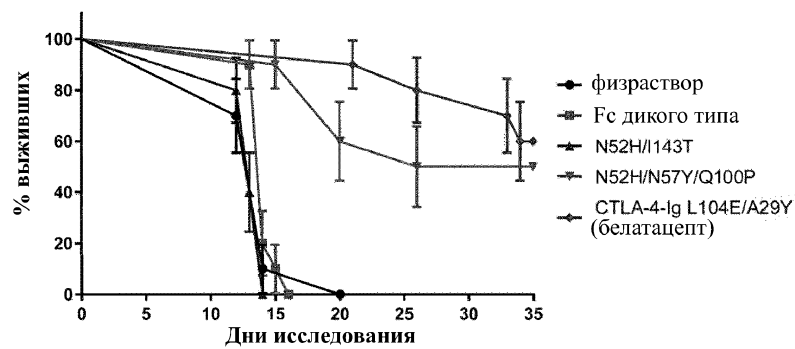


Фиг. 6С

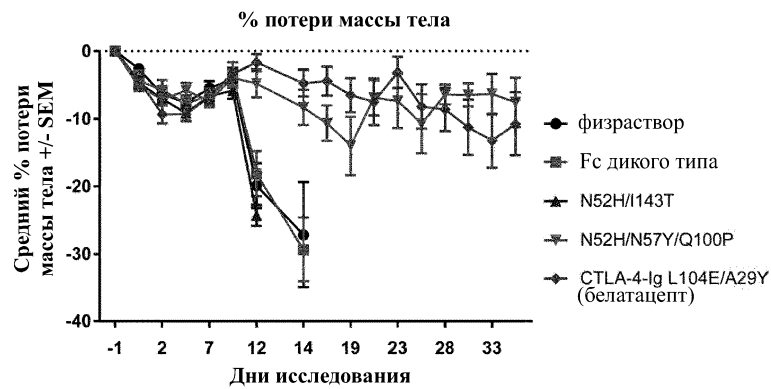
IL-21



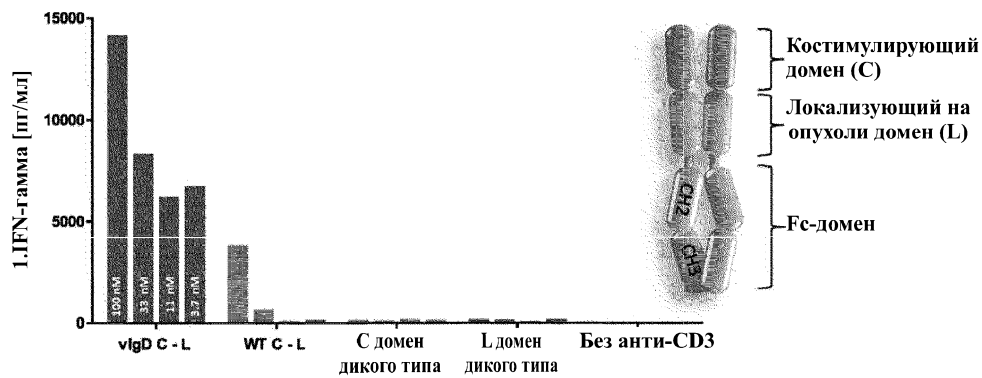
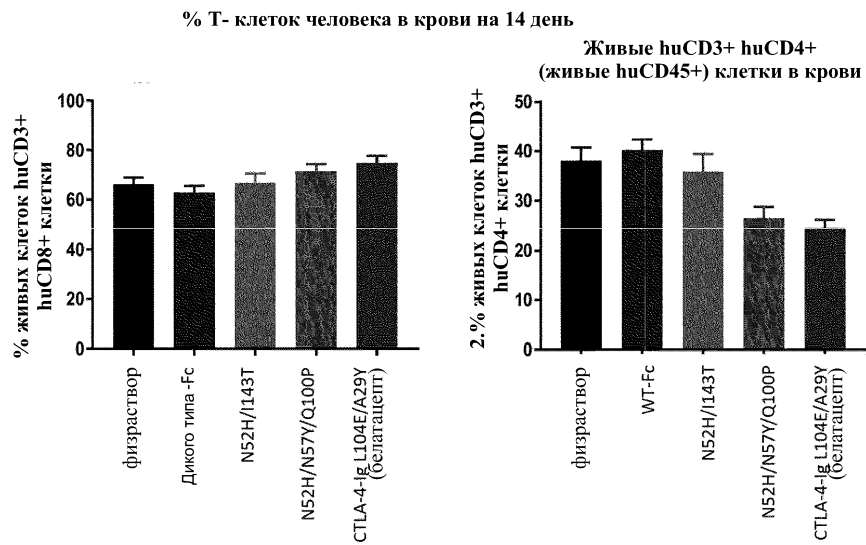
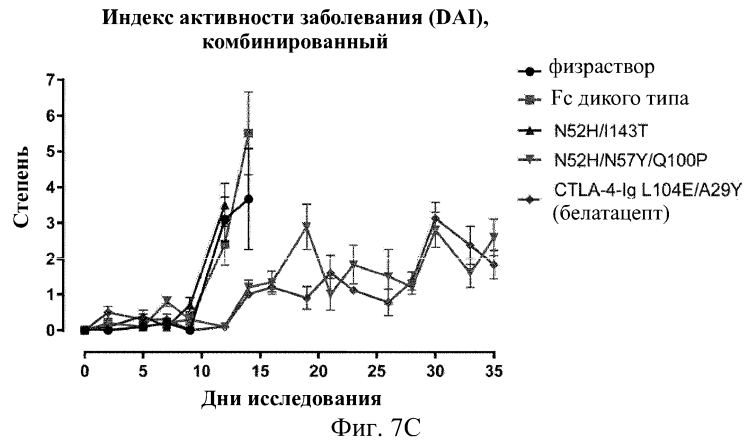
Фиг. 6D

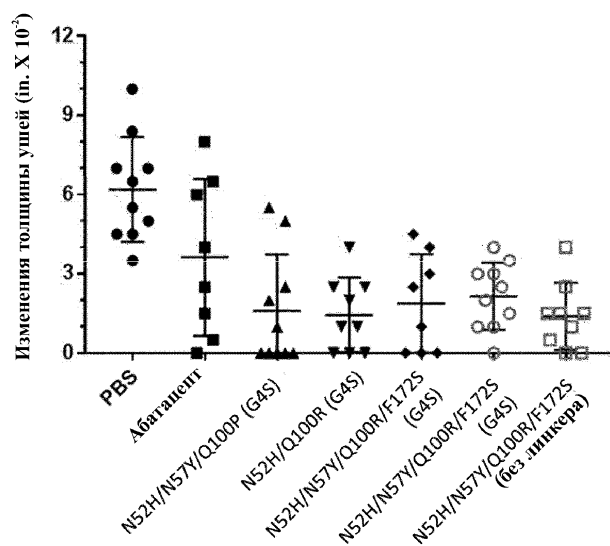
Выживание в Nu-PBMC-NSG™ $\varnothing$ GvHD

Фиг. 7A

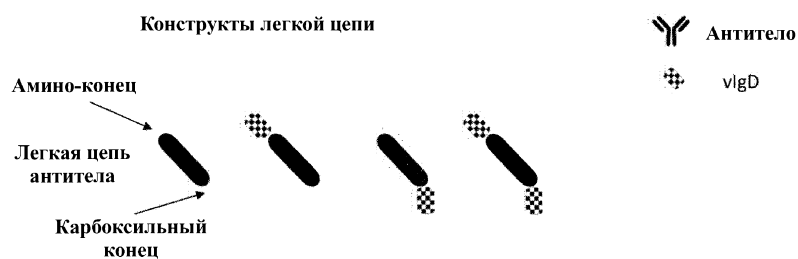


Фиг. 7B





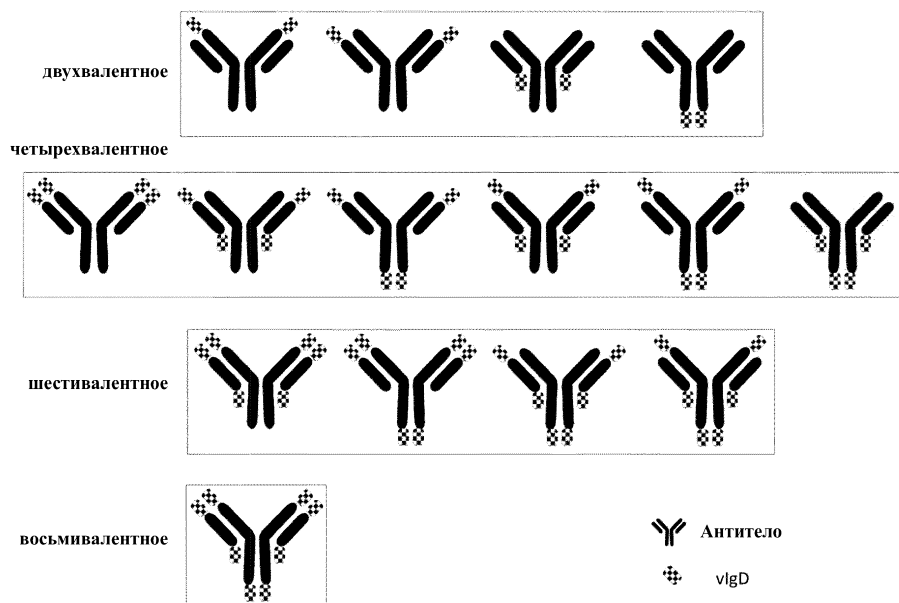
Фиг. 9



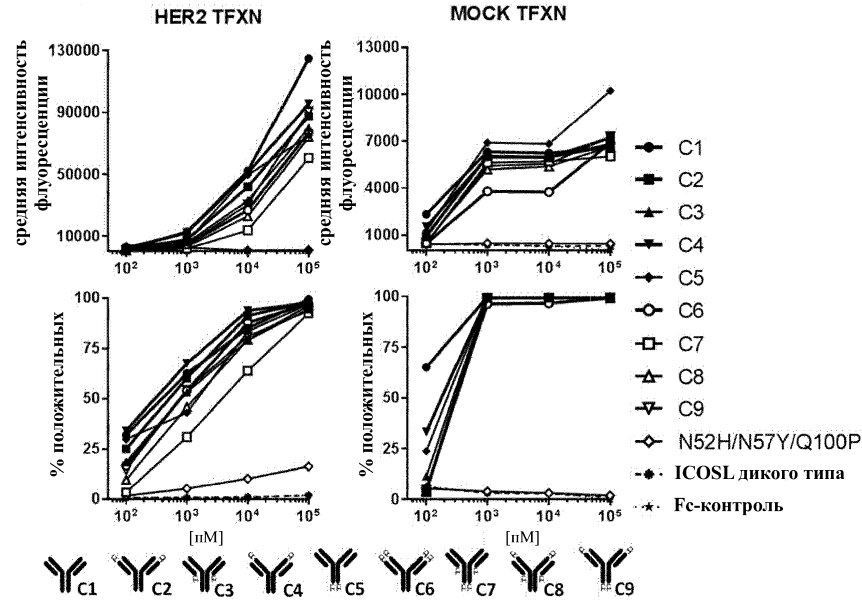
Фиг. 10А



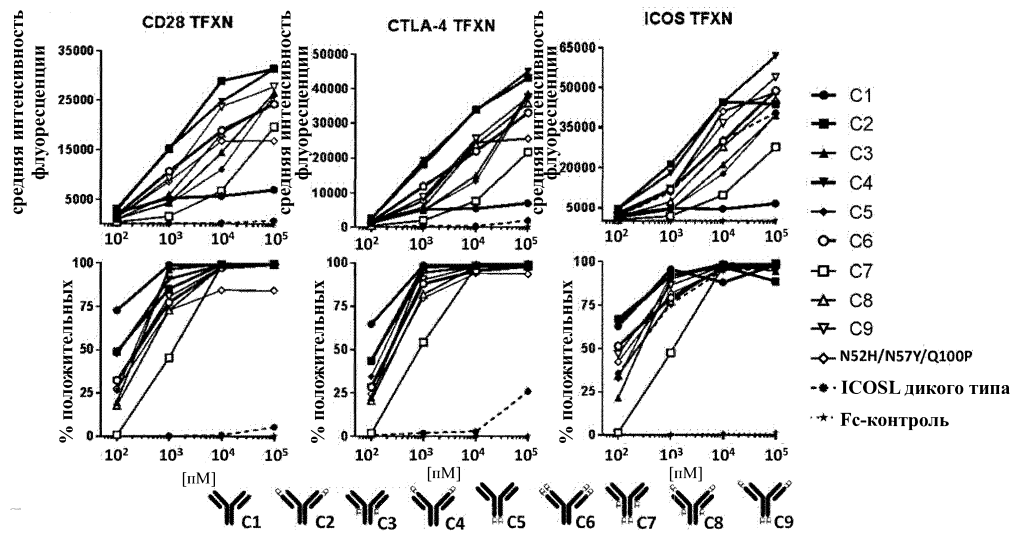
Фиг. 10В



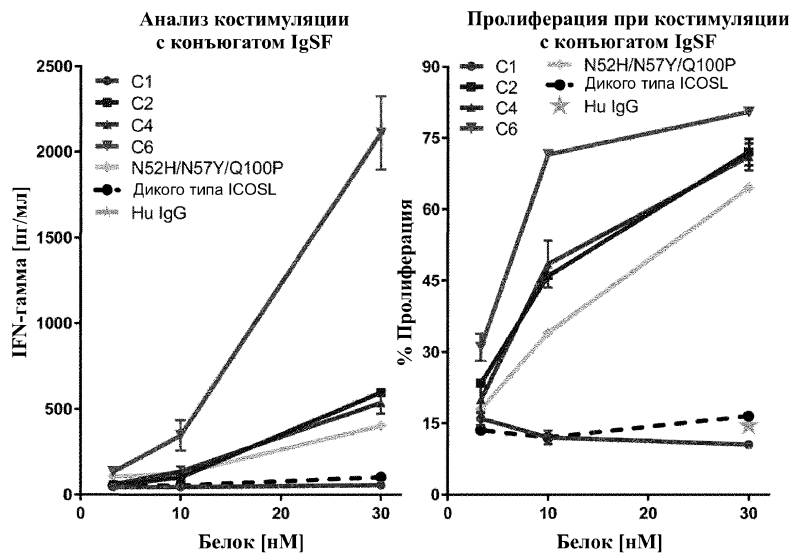
Фиг. 10С



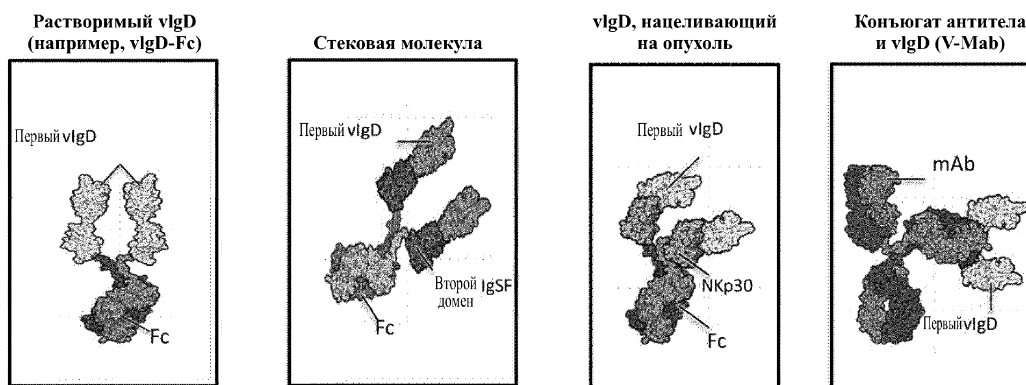
Фиг. 11А



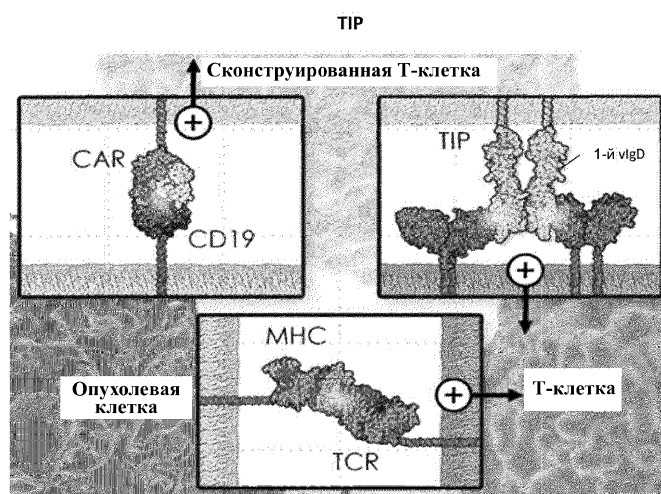
Фиг. 11В



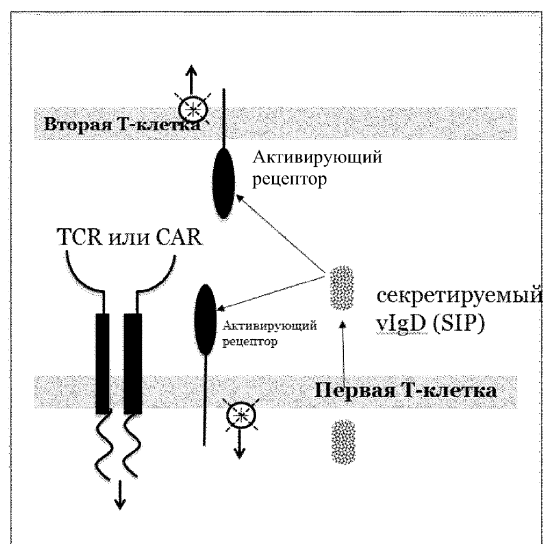
Фиг. 12



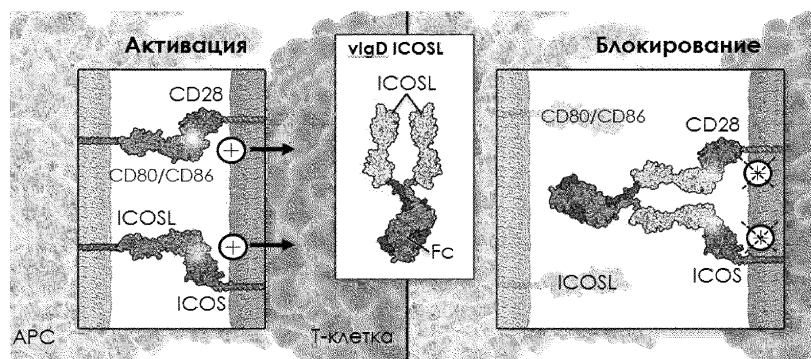
Фиг. 13А



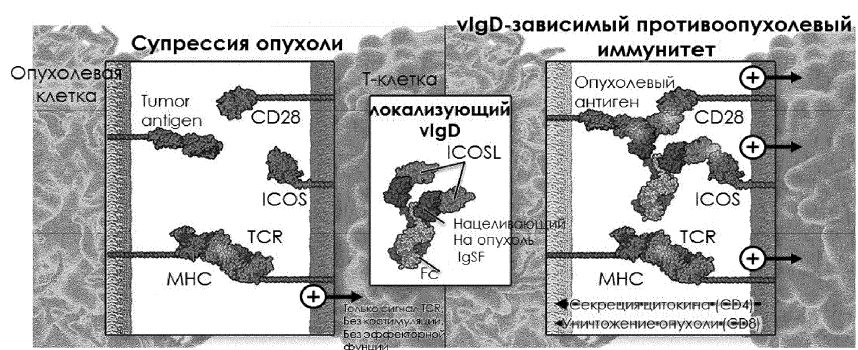
Фиг. 13В



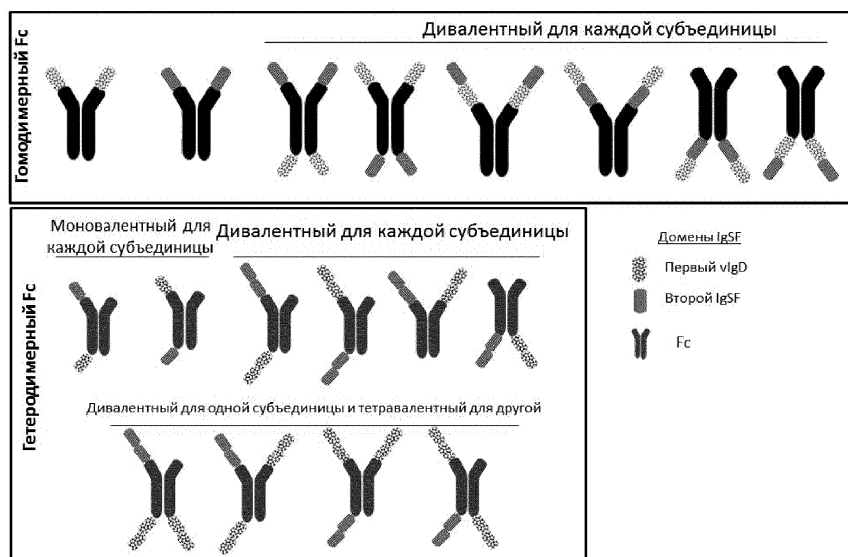
Фиг. 13С



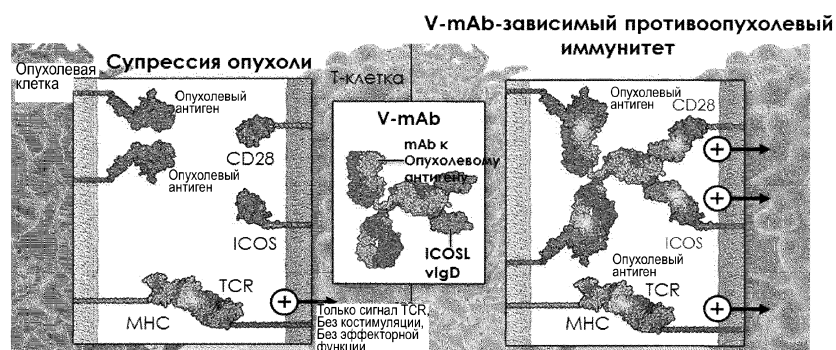
Фиг. 14



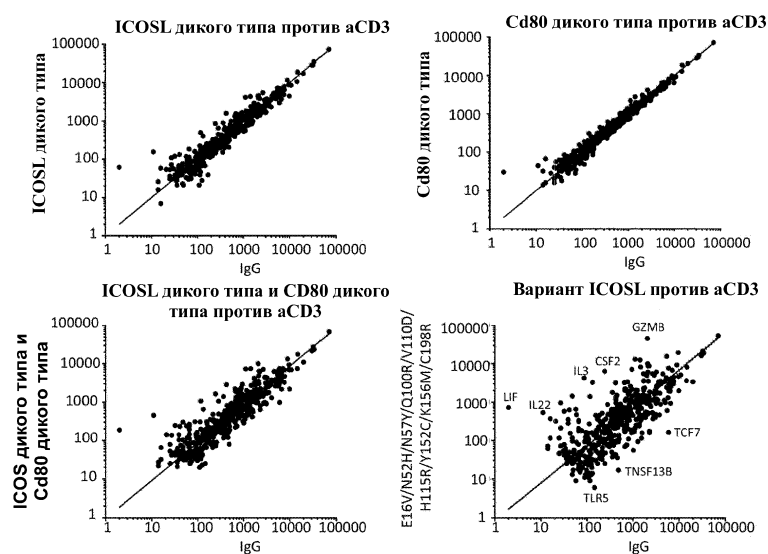
Фиг. 15



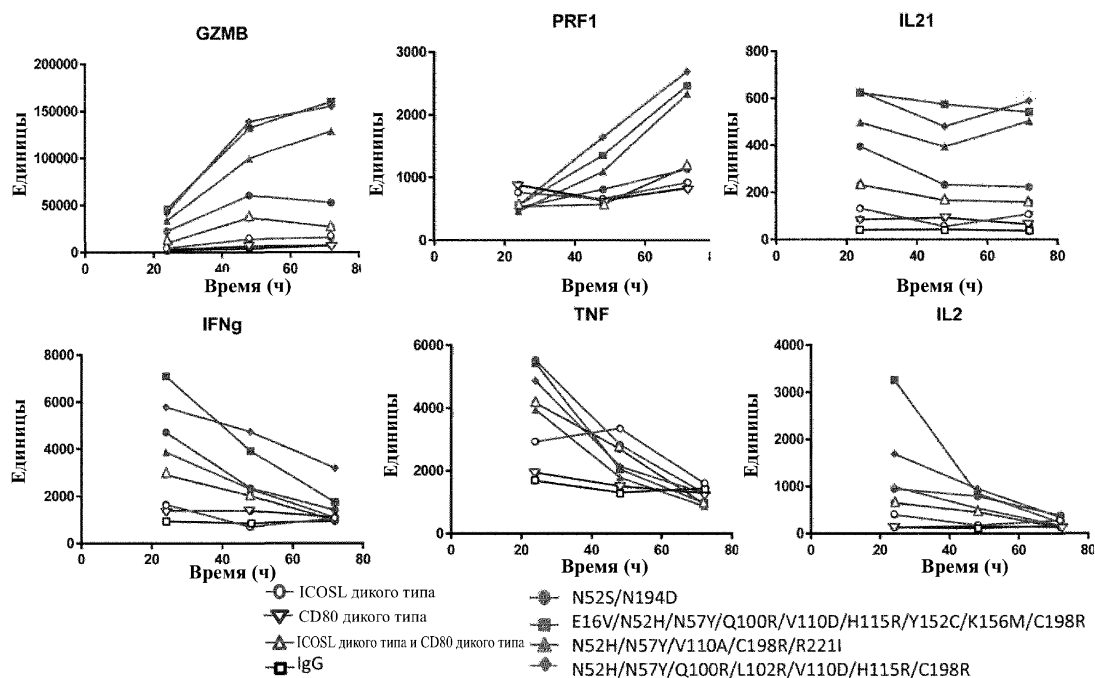
Фиг. 16



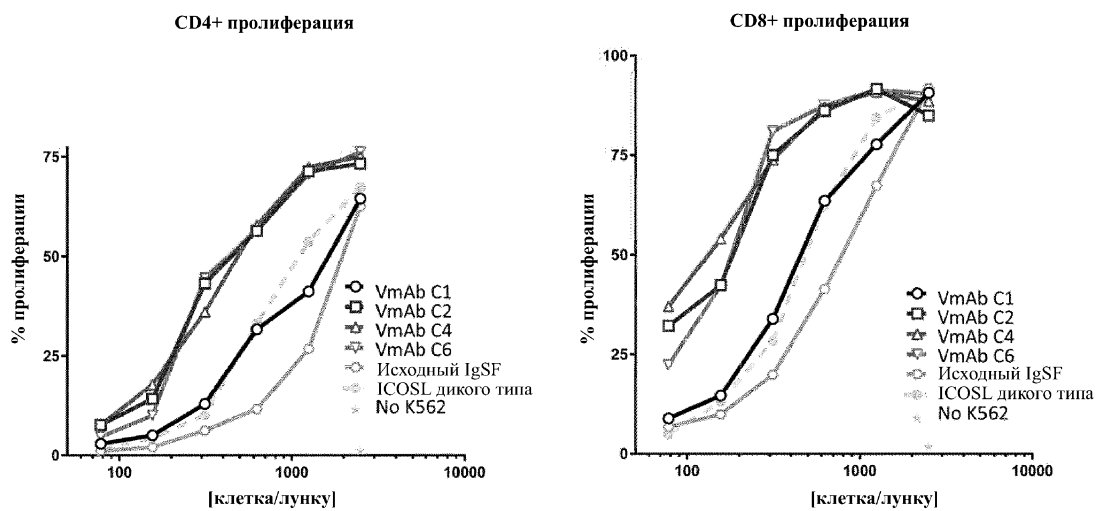
Фиг. 17



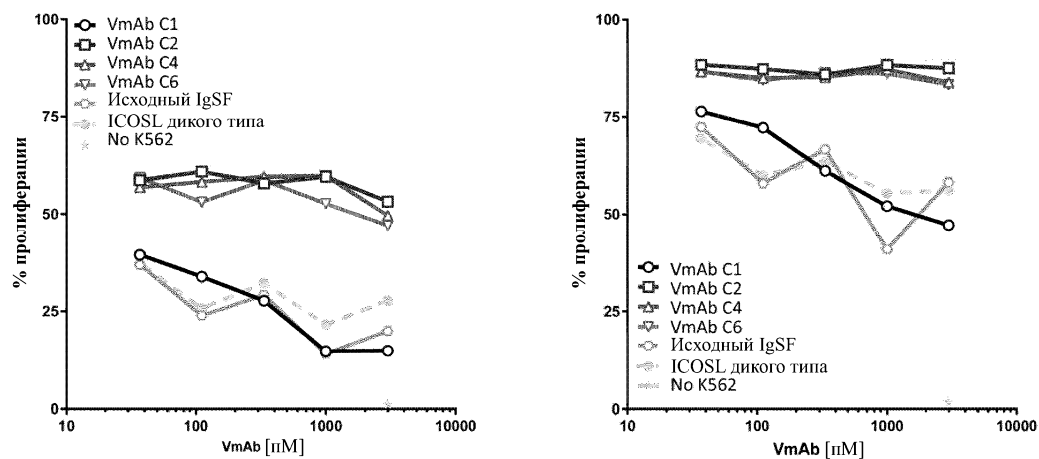
Фиг. 18



Фиг. 19



Фиг. 20A



Фиг. 20В

