

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **045594**

(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.12.11

(51) Int. Cl. **C07K 16/28** (2006.01)
A61P 37/00 (2006.01)

(21) Номер заявки
202091810

(22) Дата подачи заявки
2019.03.01

(54) АНТИТЕЛА К В7-Н4 И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

(31) **62/637,740**

(32) **2018.03.02**

(33) **US**

(43) **2021.01.29**

(86) **PCT/US2019/020189**

(87) **WO 2019/169212 2019.09.06**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**ФАЙВ ПРАЙМ ТЕРАПЬЮТИКС,
ИНК. (US)**

(72) Изобретатель:
**Каплан Чарльз, Палумбо Алессандро,
Миллер Кэти, Парк Хэнджил,
Мендоза Нерисса, Гходдуси Маджид
(US)**

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

(56) HEATHER L. MACGREGOR ET AL.: "Molecular Pathways: Evaluating the Potential for B7-H4 as an Immunoregulatory Target", CLINICAL CANCER RESEARCH, vol. 23, № 12, 21 March 2017 (2017-03-21), p. 2934-2941, XP55585792, US, ISSN: 1078-0432, DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-15-2440, the whole document

DENARDA DANGAJ ET AL.: "Blocking the B7-H4 pathway with novel recombinant antibodies enhances T cell-mediated antitumor responses", ONCOIMMUNOLOGY, vol. 2, № 8, 1 August 2013 (2013-08-01), p. e25913, XP055510290, DOI: 10.4161/onci.25913, the whole document

QIAN Y. ET AL.: "Development of a novel monoclonal antibody to B7-H4: characterization and biological activity", EUROPEAN JOURNAL OF MEDICAL RESEARCH, BIOMED CENTRAL LTD, LONDON, UK, vol. 16, № 7, 25 July 2011 (2011-07-25), p. 295, XP021094449, ISSN: 2047-783X, DOI: 10.1186/2047-783X-16-7-295, p. 296

SMITH JENESSA B. ET AL.: "B7-H4 as a potential target for immunotherapy for gynecologic cancers: A closer look", GYNECOLOGIC ONCOLOGY, vol. 134, № 1, 1 July 2014 (2014-07-01), p. 181-189, XP028874738, ISSN: 0090-8258, DOI: 10.1016/J.YGYNO.2014.03.553, p. 9; table 1

WO-A1-2013067492

WO-A1-2013025779

US-A1-2007218032

(57) В изобретении предложены антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связываются с В7-Н4 человека. Антитела к В7-Н4 или их антигенсвязывающие фрагменты являются применимыми, например, при обнаружении В7-Н4. Для обнаружения В7-Н4 может использоваться иммуногистохимия (ИГХ). В изобретении также предложены способы для лечения рака, при котором был обнаружен повышенный уровень В7-Н4, путем введения терапевтического антитела к В7-Н4 или его антигенсвязывающего фрагмента.

B1

045594

045594

B1

Область техники

Настоящее изобретение относится к антителам, которые специфически связываются с B7-H4 человека, и к способам получения и использования этих антител, например, для обнаружения B7-H4.

Уровень техники

B7-H4 (также известный как B7х, B7-S1 и VTCN1) представляет собой иммунорегулирующую молекулу, которая разделяет гомологию с другими членами семейства B7, включая PD-L1. Это трансмембранный белок типа I, состоящий из эктодоменов как IgV, так и IgC. В то время как экспрессия B7-H4 в здоровых тканях относительно ограничена на уровне белка, B7-H4 экспрессируется в нескольких солидных опухолях, таких как гинекологические карциномы молочной железы, яичника и эндометрия. Экспрессия B7-H4 в опухолях имеет тенденцию к корреляции с неблагоприятным прогнозом. Рецептор B7-H4 неизвестен, но считается, что он экспрессируется на поверхности Т-клеток. Считается, что B7-H4 непосредственно ингибирует активность Т-клеток.

Принимая во внимание экспрессию и функцию B7-H4, существует потребность в антителах, которые специфически связываются с B7-H4, и в использовании этих антител для обнаружения B7-H4, включая, например, использование иммуногистохимии (ИГХ) для обнаружения B7-H4 в образцах рака.

Сущность изобретения

В настоящем изобретении предложены антитела, которые специфически связываются с B7-H4, и использование этих антител для обнаружения B7-H4, включая, например, использование иммуногистохимии (ИГХ) для обнаружения B7-H4 в образцах рака.

В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предложено выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с B7-H4 человека, содержащие определяющую комплементарную область (CDR) 1 переменной области тяжелой цепи (VH), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22, CDR2 области VH, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23, CDR3 области VH, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 24, CDR1 переменной области легкой цепи (VL), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 25, CDR2 области VL, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 26, 27 или 28, и последовательность CDR3 области VL, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 29.

В определенных вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит область VH, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6, 7 или 8. В определенных вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит область VL, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9, 10 или 11.

В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предложено выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с B7-H4 человека, причем антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи, причем переменная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6, 7 или 8.

В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предложено выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с B7-H4 человека, причем антитело содержит переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи, причем переменная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9, 10 или 11. В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предложено выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с B7-H4 человека, содержащие переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности

- (a) SEQ ID NO: 6 и 9 соответственно;
- (b) SEQ ID NO: 6 и 10 соответственно;
- (c) SEQ ID NO: 6 и 11 соответственно;
- (d) SEQ ID NO: 7 и 9 соответственно;
- (e) SEQ ID NO: 7 и 10 соответственно;
- (f) SEQ ID NO: 7 и 11 соответственно;
- (g) SEQ ID NO: 8 и 9 соответственно;
- (h) SEQ ID NO: 8 и 10 соответственно;
- (i) SEQ ID NO: 8 и 11 соответственно;
- (j) SEQ ID NO: 89 и 19 соответственно;
- (k) SEQ ID NO: 90 и 19 соответственно; или
- (l) SEQ ID NO: 91 и 19 соответственно.

В определенных вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент дополнительно содержит константную область тяжелой цепи. В определенных вариантах осуществления константная область тяжелой цепи представляет собой константную область тяжелой цепи IgG₁ или IgG_{2a} мыши. В определенных вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент дополнительно содержит константную область легкой цепи. В определенных вариантах осуществления кон-

стантная область легкой цепи представляет собой константную область легкой цепи IgGκ мыши.

В определенных вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16, 17, 18, 89, 90 или 91. В определенных вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19, 30 или 31. В определенных вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент дополнительно содержит тяжелую цепь и легкую цепь, содержащие аминокислотные последовательности

- (a) SEQ ID NO: 16 и 19 соответственно;
- (b) SEQ ID NO: 16 и 30 соответственно;
- (c) SEQ ID NO: 16 и 31 соответственно;
- (d) SEQ ID NO: 17 и 19 соответственно;
- (e) SEQ ID NO: 17 и 30 соответственно;
- (f) SEQ ID NO: 17 и 31 соответственно;
- (g) SEQ ID NO: 18 и 19 соответственно;
- (h) SEQ ID NO: 18 и 30 соответственно; или
- (i) SEQ ID NO: 18 и 31 соответственно.

В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предложено выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с B7-H4 человека, причем антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит CDR1 области VH, CDR2 области VH, CDR3 области VH, CDR1 области VL, CDR2 области VL и CDR3 области VL антитела, выбранного из группы, состоящей из J512, J513, J514, J515, J516, J517, J518, J519, J520, J521 и J522. В определенных вариантах осуществления CDR представляют собой CDR, определенные по Кабату, CDR, определенные по Чотиа, или CDR, определенные по AbM. В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предложено выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с одним и тем же эпитопом B7-H4 человека, что и антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, предложенные в настоящем изобретении. В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предложено выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые конкурентно ингибируют связывание антитела или его антигенсвязывающего фрагмента другого антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, предложенного в настоящем изобретении, с B7-H4 человека.

В определенных вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляет собой мышинное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент.

В определенных вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляет собой полноразмерное антитело. В определенных вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляет собой антигенсвязывающий фрагмент. В определенных вариантах осуществления антигенсвязывающий фрагмент содержит Fab, Fab', F(ab')₂, одноцепочечный фрагмент Fv (scFv), связанный дисульфидной связью фрагмент Fv, минитело, F(ab')₃, диатело, (scFv)₂ или scFv-Fc.

В определенных вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент дополнительно содержит обнаруживаемую метку. В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен выделенный полинуклеотид, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую вариабельную область тяжелой цепи, или тяжелую цепь антитела, или ее антигенсвязывающий фрагмент, предложенные в настоящем изобретении. В определенных вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты кодирует область VH из SEQ ID NO: 6, 7 или 8 либо тяжелую цепь из SEQ ID NO: 16, 17 или 18.

В определенных вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность SEQ ID NO: 12, 13, 14, 93, 94 или 95.

В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен выделенный полинуклеотид, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую вариабельную область легкой цепи или легкую цепь антитела или ее антигенсвязывающий фрагмент, предложенные в настоящем изобретении. В определенных вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты кодирует область VL из SEQ ID NO: 9, 10 или 11 либо легкую цепь из SEQ ID NO: 19, 30 или 31. В определенных вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность SEQ ID NO: 15, 96 или 97.

В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен выделенный полинуклеотид, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую вариабельную область тяжелой цепи или тяжелую цепь антитела или ее антигенсвязывающий фрагмент, предложенные в настоящем изобретении, и вариабельную область легкой цепи или легкую цепь антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, предложенных в настоящем изобретении.

В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен выделенный вектор, содержащий полинуклеотид, предложенный в настоящем изобретении.

В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предложена клетка-хозяин

(например, выделенная клетка-хозяин), содержащая полинуклеотид, предложенный в настоящем изобретении, вектор, предложенный в настоящем изобретении, или первый вектор, содержащий полинуклеотид, кодирующий вариабельную область легкой цепи или легкую цепь, предложенные в настоящем изобретении, и второй вектор, содержащий полинуклеотид, кодирующий вариабельную область тяжелой цепи или тяжелую цепь, предложенные в настоящем изобретении. В определенных вариантах осуществления клетка-хозяин представляет собой клетку СНО или НЕК.

В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ получения антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которые специфически связываются с В7-Н4 человека, включающий в себя культивирование клетки-хозяина, предложенной в настоящем изобретении, так что будет экспрессироваться молекула нуклеиновой кислоты и будет вырабатываться антитело или его антигенсвязывающий фрагмент.

В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предложено выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с В7-Н4 человека и кодируются полинуклеотидом, предложенным в настоящем изобретении.

В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ обнаружения В7-Н4 в образце, включающий в себя приведение в контакт образца с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, предложенным в настоящем изобретении. В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ обнаружения В7-Н4 в образце, включающий в себя приведение в контакт образца с антителом к В7-Н4 или его антигенсвязывающим фрагментом, предложенным в настоящем изобретении, и обнаружение связывания антитела или его антигенсвязывающего фрагмента с В7-Н4. В определенных вариантах осуществления образец получают из ракового заболевания у субъекта. В определенных вариантах осуществления способ дополнительно включает в себя введение терапевтического антитела к В7-Н4 или его антигенсвязывающего фрагмента субъекту после обнаружения В7-Н4. В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ лечения рака, экспрессирующего В7-Н4, у субъекта, причем способ включает в себя введение субъекту терапевтического антитела к В7-Н4 или его антигенсвязывающего фрагмента, причем В7-Н4 был обнаружен в образце, полученном из ракового заболевания, используя антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, предложенные в настоящем изобретении.

В определенных вариантах осуществления способ дополнительно включает в себя обнаружение В7-Н4 в образце, полученном из ракового заболевания.

В определенных вариантах осуществления обнаруженный В7-Н4 представляет собой В7-Н4 клеточной мембраны. В определенных вариантах осуществления обнаруженный В7-Н4 представляет собой цитоплазматический В7-Н4. В определенных вариантах осуществления обнаруженный В7-Н4 представляет собой цельноклеточный В7-Н4.

В определенных вариантах осуществления В7-Н4 обнаруживается в циркулирующих клетках опухоли.

В определенных вариантах осуществления образец представляет собой солидную ткань, биопсию, асциты, аспираты, экстракт жидкости, плазму крови, сыворотку, спинномозговую жидкость, лимфатическую жидкость, внешний срез кожи, дыхательных путей, кишечника или мочеполового тракта, слезы, слюну, молоко, опухоль или орган, полученные от субъекта.

В определенных вариантах осуществления рак выбран из группы, состоящей из рака молочной железы, протоковой карциномы, рака эндометрия, рака яичников, немелкоклеточного рака легких, рака поджелудочной железы, рака щитовидной железы, рака почки и рака мочевого пузыря. В определенных вариантах осуществления рак молочной железы представляет собой трижды негативный рак молочной железы, а немелкоклеточный рак легких представляет собой плоскоклеточный рак.

В определенных вариантах осуществления в способе обнаружения используется иммуноферментный анализ (ИФА), сортировка клеток с активированной флуоресценцией (FACS) или иммуногистохимия (ИГХ). В определенных вариантах осуществления в способе обнаружения используется ИГХ, а концентрация антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, предложенных в настоящем изобретении, составляет от около 1 мкг/мл до около 50 мкг/мл. В определенных вариантах осуществления концентрация антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, предложенных в настоящем изобретении, составляет от около 1 мкг/мл до около 20 мкг/мл. В определенных вариантах осуществления концентрация антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, предложенных в настоящем изобретении, составляет около 10 мкг/мл.

В определенных вариантах осуществления субъект является человеком.

В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен набор, содержащий антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, предложенные в настоящем изобретении, и а) ре-агент для обнаружения, б) антиген В7-Н4, в) терапевтическое антитело к В7-Н4 или д) их комбинацию.

В определенных вариантах осуществления способа или набора, предложенных в настоящем изобретении, терапевтическое антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержат CDR1 области VH, CDR2 области VH, CDR3 области VH, CDR1 области VL, CDR2 области VL и CDR3 области VL 20502 или 22213. В определенных вариантах осуществления CDR представляют собой CDR, определенные по Ка-

бату, CDR, определенные по Чотиа, или CDR, определенные по AbM. В определенных вариантах осуществления CDR1 области VH, CDR2 области VH, CDR3 области VH, CDR1 области VL, CDR2 области VL и CDR3 области VL содержат аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 32-37 соответственно, или аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 58-63 соответственно. В определенных вариантах осуществления терапевтическое антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержат переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи, причем переменная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 54 или SEQ ID NO: 64. В определенных вариантах осуществления терапевтическое антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержат переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи, причем переменная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 55 или SEQ ID NO: 65. В определенных вариантах осуществления терапевтическое антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержат

(i) переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 54, и переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 55; или

(ii) переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 64, и переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 65.

В определенных вариантах осуществления терапевтическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 56 или SEQ ID NO: 74. В определенных вариантах осуществления терапевтическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 57 или SEQ ID NO: 75. В определенных вариантах осуществления терапевтическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит

(i) тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 56, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 57; или

(ii) тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 74, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 75.

Краткое описание графических материалов

На фиг. 1 показаны изображения окрашивания ИГХ, полученные с использованием антител к B7-H4 A57.1, AET_AB_J516 и AET_AB_J512 (см. пример 4).

На фиг. 2 показан вычислительный анализ изображений (Definiens) окрашивания ИГХ (см. пример 4).

На фиг. 3 показана сегментация положительных клеток с разными уровнями интенсивности (см. пример 4).

На фиг. 4 показано количество и соотношение клеток, связанных с каждым уровнем интенсивности окрашивания и полученных с использованием антител к B7-H4 A57.1, AET_AB_J516 и AET_AB_J512 (см. пример 4).

На фиг. 5A-5C показано сравнение экспрессии B7-H4 (интенсивность DAB) в цельных клетках, мембранах и цитоплазме B7-H4-положительных клеток. На фиг. 5A показана экспрессия B7-H4 (интенсивность DAB) с использованием антитела A57.1. На фиг. 5B показана экспрессия B7-H4 (интенсивность DAB) с использованием антитела J512. На фиг. 5C показана экспрессия B7-H4 (интенсивность DAB) с использованием антитела J516 (см. пример 4).

Подробное описание сущности изобретения

В настоящем изобретении предложены антитела (например, моноклональные антитела) и их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связываются с B7-H4 (например, B7-H4 человека). Антитела к B7-H4 и их антигенсвязывающие фрагменты могут использоваться для обнаружения B7-H4, например, с помощью иммуногистохимии в образце рака.

Также предложены выделенные нуклеиновые кислоты (полинуклеотиды), такие как комплементарная ДНК (кДНК), кодирующая такие антитела и их антигенсвязывающие фрагменты. Дополнительно предложены векторы (например, векторы экспрессии) и клетки (например, клетки-хозяева), содержащие нуклеиновые кислоты (полинуклеотиды), кодирующие такие антитела и их антигенсвязывающие фрагменты. Также предложены способы получения таких антител и их антигенсвязывающих фрагментов. В других аспектах в настоящем изобретении предложены способы обнаружения B7-H4, например, в образце рака. Также предложены связанные композиции (например, композиции для обнаружения) и наборы.

Терминология.

Термин "B7-H4" в контексте настоящего изобретения относится к полипептидам B7-H4 млекопитающих, включая, но не ограничиваясь этим, нативные полипептиды B7-H4 и изоформы полипептидов B7-H4. "B7-H4" охватывает полноразмерные непротессированные полипептиды B7-H4, а также формы полипептидов B7-H4, которые возникают в результате процессинга внутри клетки. Термин "B7-H4 человека" в контексте настоящего изобретения относится к полипептиду, содержащему аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1. "Полинуклеотид B7-H4", "нуклеотид B7-H4" или "нуклеиновая кислота B7-H4" относится к полинуклеотиду, кодирующему B7-H4.

Термин "антитело" означает молекулу иммуноглобулина, которая распознает и специфически связывается с мишенью, такой как белок, полипептид, пептид, углевод, полинуклеотид, липид или комбинации вышеуказанного по меньшей мере через один сайт распознавания антигена в варибельной области молекулы иммуноглобулина. Термин "антитело" в контексте настоящего изобретения охватывает интактные поликлональные антитела, интактные моноклональные антитела, химерные антитела, гуманизированные антитела, антитела человека, слитые белки, содержащие антитело, и любую другую модифицированную молекулу иммуноглобулина, при условии, что антитела проявляют желаемую биологическую активность. Антитело может быть любым из пяти основных классов иммуноглобулинов: IgA, IgD, IgE, IgG, и IgM, или их подклассов (изотипов) (например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и IgA2), на основании идентичности их константных доменов тяжелой цепи, называемых альфа, дельта, эпсилон, гамма и мю соответственно. Различные классы иммуноглобулинов имеют отличные и хорошо известные структуры субъединиц, и трехмерные конфигурации. Антитела могут быть "голыми" или конъюгированы с другими молекулами, такими как токсины, радиоизотопы и т.д.

Термин "фрагмент антитела" относится к части интактного антитела.

"Антигенсвязывающий фрагмент", "антигенсвязывающий домен" или "антигенсвязывающая область" относится к части интактного антитела, которая специфически связывается с антигеном. Антигенсвязывающий фрагмент может содержать антигенный участок распознавания интактного антитела (например, определяющие комплементарность области (CDR), достаточные для специфического связывания антигена). Примеры антигенсвязывающих фрагментов антител включают, но не ограничиваются ими, фрагменты Fab, Fab', F(ab')₂ и Fv, линейные антитела и одноцепочечные антитела. Антигенсвязывающий фрагмент антитела может быть получен из любых видов животных, таких как грызуны (например, мышь, крыса или хомяк) и человека, или может быть получен искусственно.

Термины "антитело к B7-H4" и "антитело, которое связывается с B7-H4" относятся к антителу, которое способно специфически связываться с B7-H4 с достаточной аффинностью, так что антитело может быть использовано как диагностический и/или терапевтический агент для нацеливания на B7-H4. Термины "специфически связывающий", "иммуноспецифически связывающий", "иммуноспецифически распознающий" и "специфически распознающий" в контексте настоящего изобретения являются аналогичными терминами в контексте антител или их антигенсвязывающих фрагментов. Эти термины указывают, что антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с эпитопом через его антигенсвязывающий домен и что связывание влечет за собой некоторую комплементарность между антигенсвязывающим доменом и эпитопом. Соответственно антитело, которое "специфически связывается" с B7-H4 человека (SEQ ID NO: 1), может также связываться с B7-H4 других видов (например, B7-H4 яванского макака, мыши и/или крысы) и/или белками B7-H4, продуцируемыми из других аллелей человека, но степень связывания антитела к B7-H4 с несвязанным белком, не относящимся к B7-H4 (например, другими членами семейства белков B7, такими как PD-L1), составляет менее чем около 10% связывания антитела с B7-H4, как измерено, например, радиоиммуноанализом (RIA).

"Моноклональное" антитело или его антигенсвязывающий фрагмент относится к популяции гомогенного антитела или антигенсвязывающего фрагмента, вовлеченного в высокоспецифичное распознавание и связывание одной антигенной детерминанты или эпитопа. Это отличается от поликлональных антител, которые обычно включают разные антитела, направленные против разных антигенных детерминант. Термин "моноклональное" антитело или его антигенсвязывающий фрагмент охватывает как интактные, так и полноразмерные моноклональные антитела, а также фрагменты антител (такие как Fab, Fab', F(ab')₂, Fv), одноцепочечные (scFv) мутанты, слитые белки, содержащие часть антитела, и любую другую модифицированную молекулу иммуноглобулина, содержащую участок распознавания. Кроме того, "моноклональное" антитело или его антигенсвязывающий фрагмент относится к таким антителам и их антигенсвязывающим фрагментам, полученным любым числом способов, включая, но не ограничиваясь ими, гибридомы, фаговый отбор, рекомбинантная экспрессия и трансгенные животные.

Термины "варибельная область" или "варибельный домен" в контексте настоящего изобретения используются взаимозаменяемо и являются общими в данной области техники. Варибельная область обычно относится к части антитела, как правило, к части легкой или тяжелой цепи, обычно к аминоконцу от 110 до 120 аминокислот или от 110 до 125 аминокислот в зрелой тяжелой цепи и от около 90 до 115 аминокислот в зрелой легкой цепи, которые различаются по последовательности среди антител и используются в связывании и специфичности конкретного антитела к его конкретному антигену. Изменчивость в последовательности сконцентрирована в тех областях, которые называются областями, определяющими комплементарность (CDR), в то время как более высоко консервативные области в варибельном домене называются каркасными областями (FR). Не желая быть связанными каким-либо конкретным механизмом или теорией, полагают, что CDR легкой и тяжелой цепей несут основную ответственность за взаимодействие и специфичность антитела с антигеном. В определенных вариантах осуществления варибельная область представляет собой варибельную область человека. В определенных вариантах осуществления варибельная область представляет собой варибельную область грызуна или мыши.

Термины "VL" и "домен VL" используются взаимозаменяемо для обозначения варибельной области легкой цепи антитела.

Термины "VH" и "домен VH" используются взаимозаменяемо для обозначения вариабельной области тяжелой цепи антитела.

Термин "нумерация по Кабату" и подобные термины известны в данной области техники и относятся к системе нумерации аминокислотных остатков в вариабельных областях тяжелой и легкой цепи антитела, или его антигенсвязывающего фрагмента. В определенных аспектах CDR могут быть определены в соответствии с системой нумерации по Кабату (см., например, Kabat E.A. & Wu T.T. (1971), *Ann. NY Acad. Sci.*, 190:382-391; и Kabat E.A. et al. (1991), *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Fifth Edition, U.S., Department of Health and Human Services, NIH Publication № 91-3242). Используя систему нумерации по Кабату, CDR в молекуле тяжелой цепи антитела обычно присутствуют в положениях аминокислот от 31 до 35, которые необязательно могут включать одну или две дополнительные аминокислоты, следующие за 35 (упоминается в схеме нумерации по Кабату как 35A и 35B) (CDR1), положениях аминокислот от 50 до 65 (CDR2) и положениях аминокислот от 95 до 102 (CDR3). Используя систему нумерации по Кабату, CDR в молекуле легкой цепи антитела обычно присутствуют в положениях аминокислот 24-34 (CDR1), положениях аминокислот 50-56 (CDR2) и положениях аминокислот 89-97 (CDR3). В конкретном варианте осуществления CDR антител, описанных в настоящем изобретении, были определены в соответствии со схемой нумерации по Кабату.

Чотиа вместо этого относится к расположению структурных петель (Chothia and Lesk, *J. Mol. Biol.*, 196:901-917 (1987)). Конец петли CDR-H1 по Чотиа при нумерации согласно системе нумерации по Кабату варьируется между H32 и H34 в зависимости от длины петли (это связано с тем, что в схеме нумерации по Кабату в H35A и H35B размещаются вставки; если ни 35A, ни 35B не присутствуют, петля заканчивается на 32; если присутствует только 35A, петля заканчивается на 33; если присутствуют оба 35A и 35B, петля заканчивается на 34). Гипервариабельные области AbM представляют собой компромисс между CDR по Кабату и структурными петлями по Чотиа и используются программным обеспечением Oxford Molecular для моделирования антител AbM.

Петля	По Кабату	AbM	По Чотиа
L1	L24-L34	L24-L34	L24-L34
L2	L50-L56	L50-L56	L50-L56
L3	L89-L97	L89-L97	L89-L97
H1	H31-H35B	H26-H35B	H26-H32..34
		<u>(Нумерация Кабат)</u>	
H1	H31-H35	H26-H35	H26-H32
		<u>(Нумерация Чотиа)</u>	
H2	H50-H65	H50-H58	H52-H56
H3	H95-H102	H95-H102	H95-H102

Термины "константная область" и "константный домен" в контексте настоящего изобретения используются взаимозаменяемо и имеют общие значения в данной области техники. Константная область представляет собой часть антитела, например, карбоксильную концевую часть легкой и/или тяжелой цепи, которая не участвует непосредственно в связывании антитела с антигеном, но которая может проявлять различные эффекторные функции, такие как взаимодействие с Fc-рецептором. Константная область молекулы иммуноглобулина обычно имеет более консервативную аминокислотную последовательность относительно вариабельного домена иммуноглобулина. В определенных аспектах антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит константную область или ее часть, достаточную для антителозависимой клеточноопосредованной цитотоксичности (ADCC). Термин "тяжелая цепь" в контексте настоящего изобретения при использовании в отношении антитела может относиться к любому отдельному типу, например альфа (α), дельта (δ), эпсилон (ϵ), гамма (γ) и мю (μ), на основании аминокислотной последовательности константного домена, которая приводит к классам антител IgA, IgD, IgE, IgG и IgM соответственно, включая подклассы IgG, например IgG₁, IgG₂, IgG₃, и IgG₄. Аминокислотные последовательности тяжелых цепей хорошо известны в данной области техники. В конкретных вариантах осуществления тяжелая цепь представляет собой тяжелую цепь человека. В конкретных вариантах осуществления тяжелая цепь представляет собой тяжелую цепь грызуна или мыши.

Термин "легкая цепь" в контексте настоящего изобретения при использовании в отношении антитела может относиться к любому другому типу, например каппа (κ) или лямбда (λ), на основе аминокислотной последовательности константных доменов. Аминокислотные последовательности легких цепей хорошо известны в данной области техники. В конкретных вариантах осуществления легкая цепь представляет собой легкую цепь человека. В конкретных вариантах осуществления легкая цепь представляет собой легкую цепь грызуна или мыши.

Термин "химерные" антитела или их антигенсвязывающие фрагменты относятся к антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, причем аминокислотная последовательность происходит от двух

или более видов. Как правило, переменная область как легкой, так и тяжелой цепей соответствует переменной области антител или их антигенсвязывающих фрагментов, полученных от одного вида млекопитающих (например, мыши, крысы, кролика и т.д.) с желаемой специфичностью, аффинностью и способностью, в то время как константные области гомологичны последовательностям антител или их антигенсвязывающих фрагментов, полученных от другого (обычно человека), чтобы избежать вызывания иммунного ответа у этого вида. Термин "гуманизованное" антитело или его антигенсвязывающий фрагмент относится к формам нечеловеческих (например, мышиных) антител или их антигенсвязывающих фрагментов, которые являются специфическими иммуноглобулиновыми цепями, химерными иммуноглобулинами или их фрагментами, которые содержат минимальные нечеловеческие (например, мышиные) последовательности. Как правило, гуманизованные антитела или их антигенсвязывающие фрагменты представляют собой иммуноглобулины человека, в которых остатки из определяющей комплементарности области (CDR) заменены остатками из CDR нечеловеческих видов (например, мыши, крысы, кролика, хомяка), которые имеют желаемую специфичность, аффинность и характеристики ("с привитой CDR") (Jones et al., *Nature*, 321:522-525 (1986); Riechmann et al., *Nature*, 332:323-327 (1988); Verhoeven et al., *Science*, 239:1534-1536 (1988)). В некоторых случаях определенные остатки каркасной области Fv (FR) иммуноглобулина человека заменяются соответствующими остатками в антителе или фрагменте вида, не принадлежащему к человеку, который обладает желаемой специфичностью, аффинностью и способностью. Гуманизованное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент могут быть дополнительно модифицированы путем замены дополнительных остатков либо в каркасной области Fv, и/или в остатках CDR нечеловеческого происхождения для уточнения и оптимизации специфичности антитела, его антигенсвязывающего фрагмента, аффинности и/или способности. В общем гуманизованное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент будет содержать переменные домены, содержащие все или по существу все области CDR, которые соответствуют иммуноглобулину, не относящемуся к человеку, тогда как все или по существу все области FR являются таковыми из консенсусной последовательности иммуноглобулина человека. Гуманизованное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент также могут содержать по меньшей мере часть константной области или домена иммуноглобулина (Fc), обычно иммуноглобулина человека. Примеры способов, используемых для создания гуманизованных антител описаны в патенте США 5225539; Roguska et al., *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 91(3):969-973 (1994); и Roguska et al., *Protein Eng.*, 9(10):895-904 (1996). В некоторых вариантах осуществления "гуманизованное антитело" представляет собой антитело с измененной поверхностью.

Термин антитело "человека" или его антигенсвязывающий фрагмент означает антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, имеющие аминокислотную последовательность, полученную из генного локуса иммуноглобулина человека, где такое антитело или антигенсвязывающий фрагмент получают с использованием любого способа, известного в данной области техники. Данное определение человеческого антитела или его антигенсвязывающего фрагмента включает в себя интактные или полноразмерные антитела и их фрагменты.

"Аффинность связывания" обычно относится к силе общей суммы нековалентных взаимодействий между одним сайтом связывания молекулы (например, антителом или его антигенсвязывающим фрагментом) и его партнером по связыванию (например, антигеном). Если не указано иное, в контексте настоящего изобретения "аффинность связывания" относится к внутренней аффинности связывания, которая отражает взаимодействие 1:1 между членами пары связывания (например, антителом или его антигенсвязывающим фрагментом и антигеном). Аффинность молекулы X к ее партнеру Y обычно может быть представлена константой диссоциации (K_D). Аффинность может быть измерена и/или выражена несколькими способами, известными в данной области техники, включая без ограничения константу равновесной диссоциации (K_D) и константу равновесной ассоциации (K_A). K_D вычисляется из отношения k_{off}/k_{on} , тогда как K_A вычисляется из отношения k_{on}/k_{off} . k_{on} относится к константе скорости ассоциации, например, антитела или его антигенсвязывающего фрагмента с антигеном, а k_{off} относится к диссоциации, например, антитела или его антигенсвязывающего фрагмента с антигеном, k_{on} и k_{off} могут быть определены способами, известными специалисту в данной области техники, такими как BIAcore® или KinExA.

Термин "эпитоп" в контексте настоящего изобретения является термином в данной области техники и относится к локализованной области антигена, с которой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент могут специфически связываться. Эпитоп может представлять собой, например, смежные аминокислоты полипептида (линейный или непрерывный эпитоп) или эпитоп, например, может объединяться из двух или более несмежных областей полипептида или полипептидов (конформационных, нелинейных, прерывистых или несмежных эпитопов). В определенных вариантах осуществления эпитоп, с которым специфически связывается антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, может быть определен, например, с помощью ЯМР-спектроскопии, исследований рентгеновской дифракционной кристаллографии, анализов ИФА, обмена водород/дейтерий в сочетании с масс-спектрометрией (например, жидкостной хроматографии с масс-спектрометрией с электрораспылением), анализов на основе олигопептидного сканирования и/или мутагенезного картирования (например, картирование сайт-направленного мутагенеза). В случае рентгеновской кристаллографии кристаллизация может осуществляться с помощью лю-

бых способов, известных в данной области техники (например, Giege R. et al. (1994), *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.*, 50(Pt 4):339-350; McPherson A. (1990), *Eur. J. Biochem.*, 189:1-23; Chayen N.E. (1997), *Structure*, 5:1269-1274; McPherson A. (1976), *J. Biol. Chem.*, 251:6300-6303). Кристаллы антитело/его антигенсвязывающий фрагмент: антиген могут быть изучены с использованием хорошо известных способов дифракции рентгеновских лучей и могут быть уточнены с использованием компьютерного программного обеспечения, такого как X-PLOR (Yale University, 1992, распространяется Molecular Simulations, Inc.; см., например, *Meth Enzymol.* (1985), vol. 114 & 115, eds Wyckoff H.W. et al., U.S. 2004/0014194); и BUSTER (Bricogne G. (1993), *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.*, 49(Pt 1):37-60; Bricogne G. (1997), *Meth Enzymol.*, 276A:361-423, ed Carter C.W.; Roversi P. et al. (2000), *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.*, 56(Pt 10):1316-1323). Исследования мутагенезного картирования могут осуществляться с использованием любого способа, известного специалисту в данной области техники. См., например, Champe M. et al. (1995), *J. Biol. Chem.*, 270:1388-1394; и Cunningham B.C. & Wells J.A. (1989), *Science*, 244:1081-1085 для описания методов мутагенеза, включая методы аланин-сканирующего мутагенеза.

Антитело к B7-H4, которое "связывается с тем же эпитопом", что и эталонное антитело к B7-H4, относится к антителу, которое связывается с теми же аминокислотными остатками B7-H4, что и эталонное антитело к B7-H4. Способность антитела к B7-H4 связываться с тем же эпитопом, что и эталонное антитело к B7-H4, определяется с помощью анализа обмена водород/дейтерий (см. Coales et al., *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 2009, 23:639-647).

Считается, что антитело "конкурентно ингибирует" связывание эталонного антитела с данным эпитопом, если оно связывается с тем же эпитопом или перекрывающимся эпитопом эталонного антитела, так что оно в некоторой степени блокирует связывание эталонного антитела с эпитопом. Конкурентное ингибирование может быть определено любым способом, известным в данной области техники, например, конкурентным ИФА. Можно сказать, что антитело конкурентно ингибирует связывание эталонного антитела с данным эпитопом на по меньшей мере 90%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 60%, или по меньшей мере 50%. Полипептид, антитело, полинуклеотид, вектор, клетка или композиция, которые "выделены", представляет собой полипептид, антитело, полинуклеотид, вектор, клетку или композицию, которая находится в форме, не встречающейся в природе. Выделенные полипептиды, антитела, полинуклеотиды, векторы, клетка или композиции включают те, которые были очищены до такой степени, что они больше не присутствуют в той форме, в которой они находятся в природе. В некоторых вариантах осуществления выделенные антитело, полинуклеотид, вектор, клетка или композиция являются по существу чистой. Термин "по существу чистый" в контексте настоящего изобретения относится к материалу, который имеет чистоту по меньшей мере 50% (т.е. не содержит загрязнений), чистоту по меньшей мере 90%, чистоту по меньшей мере 95%, чистоту по меньшей мере 98% или чистоту по меньшей мере 99%.

Термины "полипептид", "пептид" и "белок" используются в настоящем изобретении взаимозаменяемо для обозначения полимеров аминокислот любой длины. Полимер может быть линейным или разветвленным, он может содержать модифицированные аминокислоты, и он может быть разделен на аминокислотами. Кроме того, указанные термины включают аминокислотный полимер, который был модифицирован природным путем или путем вмешательства; например, образованием дисульфидных связей, гликозилированием, липидацией, ацелированием, фосфорилированием или любыми другими манипуляциями, или модификациями, такие как конъюгация с меченым компонентом. Также термин включает в себя, например, полипептиды, содержащие один или более аналогов аминокислоты (включающие, например, неприродные аминокислоты и т.д.), а также другие модификации, известные в данной области техники. Понятно, что поскольку полипептиды согласно данному изобретению основаны на антителах, в некоторых вариантах осуществления полипептиды могут встречаться в виде отдельных цепей или связанных цепей.

"Процент идентичности" относится к степени идентичности двух последовательностей (например, аминокислотных последовательностей или последовательностей нуклеиновых кислот). Процент идентичности можно определить путем выравнивания двух последовательностей, введения гэпов для максимизации идентичности двух последовательностей. Выравнивание можно создавать с помощью программ, известных в данной области техники. Для целей настоящего изобретения выравнивание нуклеотидных последовательностей можно выполнить с помощью программы *blastn*, настроенной по умолчанию, и выравнивание аминокислотных последовательностей можно выполнить с помощью программы *blastn*, настроенной по умолчанию (см. Национальный центр биотехнологической информации (National Center for Biotechnology Information - NCBI) на интернет сайте www.ncbi.nlm.nih.gov).

Термин "клетка - хозяин" в контексте настоящего изобретения может быть любым типом клеток, например, первичной клеткой, клеткой в культуре, или клеткой из клеточной линии. В конкретных вариантах осуществления термин "клетка-хозяин" относится к клетке, трансфицированной молекулой нуклеиновой кислоты, и потомству или потенциальному потомству такой клетки. Потомство такой клетки может не быть идентичным родительской клетке, трансфицированной молекулой нуклеиновой кислоты, например, из-за мутаций или влияния окружающей среды, которые могут произойти в последующих поколениях или интеграции молекулы нуклеиновой кислоты в геном клетки-хозяина.

Термин "сверхэкспрессия" В7-Н4 в конкретном образце опухоли, ткани или клеток относится к В7-Н4 (полипептиду В7-Н4 или нуклеиновой кислоте, кодирующей такой полипептид), который присутствует на уровне выше, чем тот, который присутствует в непораженной ткани или клетках одного и того же типа или происхождения вблизи опухоли или ракового заболевания. Такая сверхэкспрессия может быть вызвана, например, мутацией, амплификацией генов, увеличением транскрипции или увеличением трансляции.

Термин "первичное" антитело или его антигенсвязывающий фрагмент в настоящем изобретении относится к антителу или фрагменту, которые специфически связываются с антигеном-мишенью в образце. Первичное антитело, как правило, представляет собой первое антитело, которое используется в иммуногистохимической (ИГХ) процедуре. В одном варианте осуществления первичное антитело является единственным антителом, которое используется в ИГХ процедуре. Термин "вторичное" антитело или его антигенсвязывающий фрагмент в настоящем изобретении относится к антителу или фрагменту, которые специфически связываются с первичным антителом, тем самым образуя мостик между первичным антителом и последующим реагентом в случае его наличия. Вторичное антитело, как правило, представляет собой второе антитело, которое используется в иммуногистохимической процедуре. Термин "третичное" антитело в настоящем изобретении относится к антителу, которое специфически связывается со вторичным антителом, тем самым образуя мостик между вторичным антителом и последующим реагентом в случае его наличия.

"Образец" согласно настоящему изобретению имеет биологическое происхождение. В предпочтительных вариантах осуществления образец представляет собой образец человека, однако образцы животных также могут использоваться при осуществлении настоящего изобретения на практике. Неограничивающие источники образца для использования в настоящем изобретении включают в себя, например, солидную ткань, биопсию, асциты, аспираты, экстракты жидкости, кровь (включая циркулирующие опухолевые клетки), плазму, сыворотку, спинномозговую жидкость, лимфатическую жидкость, внешние срезы кожи, дыхательных путей, кишечника и мочеполового тракта, слезы, слюну, молоко, опухоли, органы, клеточные культуры и/или компоненты клеточных культур. "Раковый образец" - это образец, который содержит раковую клетку.

Для целей настоящего изобретения "срез" образца ткани относится к одной части или куску образца ткани, например, тонкому срезу ткани или клетки, вырезанному из образца ткани. Следует понимать, что можно получить несколько срезов образцов ткани и подвергнуть их анализу в соответствии с настоящим изобретением. В некоторых случаях выбранная часть или срез ткани содержит гомогенную популяцию клеток. В других случаях выбранная часть содержит область ткани, например просвет, в качестве неограничивающего примера. Выбранная часть может быть такой маленькой, как одна клетка или две клетки, или может представлять несколько тысяч клеток, например. В большинстве случаев сбор клеток является важным, и хотя настоящее изобретение было описано для применения с целью обнаружения клеточных компонентов, способ может также использоваться для обнаружения неклеточных компонентов организма (например, в качестве неограничивающего примера, растворимых компонентов в крови). Слово "метка" в контексте настоящего изобретения относится к обнаруживаемому соединению или композиции, которые прямо или косвенно конъюгируются с антителом с целью получения "меченного" антитела. Метка может быть обнаруживаемой сама по себе (например, радиоизотопные метки или флуоресцентные метки), или, если речь идет о ферментативной метке, она может катализировать химическое изменение субстратного соединения или композиции, которое можно обнаружить. Термин "фармацевтический состав" относится к препарату, который находится в такой форме, чтобы обеспечить биологическую активность активного ингредиента, чтобы быть эффективным, и который не содержит каких-либо дополнительных компонентов, которые являются неприемлемо токсичными для субъекта, которому будет вводиться состав. Состав может быть стерильным.

Термины "вводить", "вводимый", "введение" и т.п., используемые в настоящем изобретении, относятся к способам, которые могут использоваться для обеспечения доставки лекарственного средства, например, антитела к В7-Н4 или его антигенсвязывающего фрагмента в желаемый участок биологического действия (например, внутривенное введение). Способы введения, которые можно применять с агентами и способами, описанными в настоящем изобретении, можно найти, например, в Goodman and Gilman, *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, current edition, Pergamon; и Remington's, *Pharmaceutical Sciences*, current edition, Mack Publishing Co., Easton, Pa.

В контексте настоящего изобретения термины "субъект" и "пациент" употребляются взаимозаменяемо. Субъектом может быть животное. В некоторых вариантах осуществления субъект представляет собой млекопитающее, такое как отличное от человека животное (например, корова, свинья, лошадь, кошка, собака, крыса, мышь, обезьяна или другой примат и т.д.). В некоторых вариантах осуществления изобретения субъект представляет собой человека.

Термин "терапевтически эффективное количество" относится к количеству лекарственного средства, например антитела к В7-Н4 или его антигенсвязывающего фрагмента, эффективного для лечения заболевания или расстройства у субъекта. В случае рака терапевтически эффективное количество лекарственного средства может уменьшить количество раковых клеток; уменьшить размер или нагрузку опухо-

ли; ингибировать до некоторой степени инфильтрацию раковых клеток в периферические органы; ингибировать до некоторой степени метастазирование опухоли; ингибировать до некоторой степени рост опухоли; облегчить до некоторой степени один или более симптомов, связанных с раком; и/или приводят к благоприятному ответу, такому как увеличение выживаемости без прогрессирования заболевания (PFS), выживаемости без заболевания (DFS), общей выживаемости (OS), полного ответа (CR), частичного ответа (PR) или в некоторых случаях стабильное заболевание (SD), уменьшение прогрессирующего заболевания (PD), уменьшение времени до прогрессирования (TTP) или любая их комбинация. В той степени, в которой лекарственное средство может предотвращать рост и/или убивать существующие раковые клетки, оно может быть цитостатическим и/или цитотоксическим. Такие термины, как "лечение", "лечащий", "лечить", "облегчающий" и "облегчение" относятся к терапевтическим мерам, которые лечат, замедляют, уменьшают симптомы и/или останавливают прогрессирование патологического состояния или расстройства. Таким образом, те, кто нуждается в лечении, включают тех, кто уже имеет диагноз или подозрение на заболевание. В определенных вариантах осуществления субъект успешно "лечится" от рака в соответствии со способами по настоящему изобретению, если пациент демонстрирует одно или более из следующего: уменьшение количества или полное отсутствие раковых клеток; уменьшение размера опухоли; ингибирование или отсутствие проникновения раковых клеток в периферические органы, включая, например, распространение рака в мягкие ткани и кости; торможение или отсутствие метастазирования опухоли; торможение или отсутствие роста опухоли; облегчение одного или более симптомов, связанных с конкретным раком; снижение заболеваемости и смертности; улучшение качества жизни; уменьшение онкогенности, онкогенной частоты или онкогенной способности опухоли; уменьшение количества или частоты раковых стволовых клеток в опухоли; дифференцировка онкогенных клеток в неопухолевое состояние; увеличение выживаемости без прогрессирования (PFS), выживаемости без заболевания (DFS), общая выживаемость (OS), полный ответ (CR), частичный ответ (PR), стабильное заболевание (SD), уменьшение прогрессирующего заболевания (PD), уменьшенное время до прогрессирования (TTP) или любая их комбинация.

Термины "рак" и "раковый" относятся или описывают физиологическое состояние у млекопитающих, при котором популяция клеток характеризуется нерегулируемым ростом клеток. Примеры рака включают в себя без ограничения гинекологические виды рака (например, рак молочной железы (включая трижды негативный рак молочной железы, протоковую карциному, рак яичников и рак эндометрия), немелкоклеточный рак легких, рак поджелудочной железы, рак щитовидной железы, рак почки (например, почечно-клеточная карцинома) и рак мочевого пузыря (например, карцинома уротелиальной клетки). Рак может быть "раком, который экспрессирует B7-H4" или "раком, экспрессирующим B7-H4". Такие термины относятся к раку, содержащему клетки, которые экспрессируют B7-H4. Рак может представлять собой солидную опухоль, которая экспрессирует B7-H4. Рак может быть первичной опухолью или может быть запущенным или метастатическим раком.

"Рефрактерный" рак представляет собой рак, который прогрессирует, даже если противоопухолевое лечение, такое как химиотерапия, применяют к больному раком. "Рецидивирующий" рак представляет собой рак, который повторно развивается, или на начальном участке или в отдаленном месте, после ответа на начальную терапию.

В контексте настоящего изобретения в настоящем раскрытии и формуле изобретения, формы единственного числа включают формы и множественного числа, если контекст явно не предписывает иное.

Следует понимать, что, в случаях когда варианты осуществления описаны в настоящем изобретении с формулировкой "содержащий", также могут предлагаться аналогичные варианты осуществления, описанные в терминах "состоящий из" и/или "состоящий в основном из". В настоящем раскрытии "содержит", "содержащий", "включающий" и "имеющий" и т.п. может иметь значение, приписанное им в патентном праве США, и может означать "включает", "включающий" и т.п.; "состоящий по существу из" или "состоящий по существу" аналогичным образом имеет значение, указанное в патентном праве США, и термин является открытым, что допускает присутствие большего, чем то, что указано, если основные или новые характеристики того, что говорится не изменяются при наличии более того, что указано, но исключают варианты осуществления предшествующего уровня техники.

Если специально не указано или не очевидно из контекста, используемый в настоящем изобретении термин "и/или" понимается как включающий. Термин "и/или", используемый в фразе, такой как "А и/или В" в настоящем изобретении, предназначен для включения "А и В", "А или В", "А" и "В". Аналогично термин "и/или", используемый во фразе, такой как "А, В и/или С", предназначен для охвата каждого из следующих вариантов осуществления: А, В и С; А, В или С; А или С; А или В; В или С; А и С; А и В; В и С; А (отдельно); В (отдельно); и С (отдельно).

Термины "около" и "приблизительно" в контексте настоящего изобретения, когда используются для изменения числового значения или числового диапазона, указывают, что отклонения от 5 до 10% выше и от 5 до 10% ниже значения или диапазона остаются в пределах предполагаемого значения приведенного значения или диапазона.

Любые композиции или способы, представленные в настоящем изобретении, могут быть объединены с одной или более любыми другими композициями и способами, представленными в настоящем изобретении.

бретении.

Антитела.

В конкретном аспекте в настоящем изобретении предложены антитела (например, моноклональные антитела) и их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связываются с B7-H4 (например, B7-H4 человека). Аминокислотные последовательности для B7-H4 человека известны в данной области техники и также предложены в настоящем изобретении как SEQ ID NO: 1. B7-H4 человека:

MASLGQILFWSIISIIPLAGAIALIIIGFGISGRHSITVTTVASAGNIGEDGILSCTFEPDIKLS
 IVIQWLKEGVLGLVHEFKEGKDELSEQDEMFRGRTAVFADQVIVGNASRLKKNVQLTD
 AGTYKCYIITSKGKGNANLEYKTGAFSMPEVNVNDYNASSETLRCEAPRWFPPQTVVWA
 SQVDQGANFSEVSNTSFELNSENVTMKVVSVLNVNTINNTYSCMIENDIAKATGDIKVT
 ESEIKRRSHLQLLNSKASLCVSSFFAISWALLPLSPYLMLK (SEQ ID NO:1)

В определенных вариантах осуществления антитело к B7-H4 или его антигенсвязывающий фрагмент представляет собой антитело, описанное в табл. 1, или представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие определяющие комплементарность области (CDR), варибельную область тяжелой цепи, и/или варибельную область легкой цепи, и/или тяжелую цепь, и/или легкую цепь антитела, описанного в табл. 1.

Таблица 1

Типовые антитела к B7-H4

ИД клона	VH/VL гибридомы	Тип антитела	SEQ ID NO				
			CDR	VH	VL	H	L
J511	M6	mIgG1	22-26, 29	6	9	89	19
J512	M6	mIgG2a	22-26, 29	6	9	16	19
J517	M6 – De-N-gly (1)	mIgG2a	22-25, 27, 29	6	10	16	30
J518	M6 De-N-gly (2)	mIgG2a	22-25, 28, 29	6	11	16	31
J513	M11	mIgG1	22-26, 29	7	9	90	19
J514	M11	mIgG2a	22-26, 29	7	9	17	19
J519	M11 – De-N-gly (1)	mIgG2a	22-25, 27, 29	7	10	17	30
J520	M11 De-N-gly (2)	mIgG2a	22-25, 28, 29	7	11	17	31
J515	M15	mIgG1	22-26, 29	8	9	91	19
J516	M15	mIgG2a	22-26, 29	8	9	18	19
J521	M15 – De-N-gly (1)	mIgG2a	22-25, 27, 29	8	10	18	30
J522	M15 De-N-gly (2)	mIgG2a	22-25, 28, 29	8	11	18	31

В определенных вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в настоящем изобретении, специфически связываются с B7-H4 человека и содержат шесть CDR, перечисленных в табл. 2, т.е. шесть CDR из SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 26-28 и SEQ ID NO: 29.

Таблица 2

Аминокислотные последовательности CDR

Описание CDR	Аминокислотная последовательность CDR (SEQ ID NO)
VH-CDR1	GFSLSTYG (SEQ ID NO:22)
VH-CDR2	WWNDD (SEQ ID NO:23)
VH-CDR3	VDGYYWYFDV (SEQ ID NO:24)
VL-CDR1	RSSQSIVHSNRNTYLE (SEQ ID NO:25)
VL-CDR2	NVSNRFS (SEQ ID NO:26)
VL-CDR2, De-N-гликозилированная (1)	NVANRFS (SEQ ID NO:27)
VL-CDR2, De-N-гликозилированная (2)	QVSNRFS (SEQ ID NO:28)
VL-CDR3	FQGS HVPLT (SEQ ID NO:29)

В определенных вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в настоящем изобретении, специфически связываются с B7-H4 человека и содержат область VH, приведенную в табл. 3, например, в комбинации с областью VL.

Таблица 3

Аминокислотные последовательности вариательной области тяжелой цепи (VH)

Описание VH	Аминокислотная последовательность VH (SEQ ID NO)
M6 VH (J511, J512, J517, J518)	QVTLKESGPGILQPSQTLSTLCSFSGFSLSTYGLGVGWI RQPSGKGLDWLANIWWNDDKYYNSALKSRLTISKDTS NNQVFLKISSVDTADTGTYECAQVDGYYWYFDVWGA GTTVTVSS (SEQ ID NO:6)
M11 VH (J513, J514, J519, J520)	QVTLKESGPGILQPSQTLSTLCSLGFSLSTYGLGVGWI RQPSGKGLGWLANIWWNDDKYYNSALKSRLTISKDTS NNQVFLKISSVDTADTGTYECAQVDGYYWYFDVWGA GTTVTVSS (SEQ ID NO:7)
M15 VH (J515, J516, J521, J522)	QVTLKESGPGILQSSQTLSTLCSFSGFSLSTYGLGVGWI RQPSGKGLDWLANIWWNDDKYYNSALKSRLTISKDTS NNQVFLKISSVDTADTGTYECAQVDGYYWYFDVWGA GTTVTVSS (SEQ ID NO:8)

В определенных вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в настоящем изобретении, специфически связываются с B7-H4 человека и содержат область VL, приведенную в табл. 4, например, в комбинации с областью VH.

Таблица 4

Аминокислотные последовательности вариательной области легкой цепи (VL)

Описание VL	Аминокислотная последовательность VL (SEQ ID NO)
M6, M11, M15 VL (J511-J516)	DVLM TQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSIVHSNRNTYLE WYLQKPGQSPKLLIYNVSNRFS GVPDRFSGSGSGTDFT

связываются с В7-Н4 человека и содержат область VH, содержащую последовательность, по меньшей мере на 99% идентичную последовательности VH из табл. 3, и область VL, содержащую последовательность, по меньшей мере на 99% идентичную последовательности VL из табл. 4.

В определенных вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в настоящем изобретении, специфически связываются с В7-Н4 человека и содержат область VH, состоящую из последовательности, по меньшей мере на 96% идентичной последовательности VH из табл. 3, и область VL, состоящую из последовательности, по меньшей мере на 96% идентичной последовательности VL из табл. 4. В определенных вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в настоящем изобретении, специфически связываются с В7-Н4 человека и содержат область VH, состоящую из последовательности, по меньшей мере на 97% идентичной последовательности VH из табл. 3, и область VL, состоящую из последовательности, по меньшей мере на 97% идентичной последовательности VL из табл. 4. В определенных вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в настоящем изобретении, специфически связываются с В7-Н4 человека и содержат область VH, состоящую из последовательности, по меньшей мере на 98% идентичной последовательности VH из табл. 3, и область VL, состоящую из последовательности, по меньшей мере на 98% идентичной последовательности VL из табл. 4. В определенных вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в настоящем изобретении, специфически связываются с В7-Н4 человека и содержат область VH, состоящую из последовательности, по меньшей мере на 99% идентичной последовательности VH из табл. 3, и область VL, состоящую из последовательности, по меньшей мере на 99% идентичной последовательности VL из табл. 4.

В определенных аспектах антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в настоящем изобретении, описываются только их доменом VL, только их доменом VH, только их 3 CDR области VL или только их 3 CDR области VH. См., например, Rader C. et al. (1998), PNAS, 95:8910-8915, которая включена в настоящее изобретение посредством ссылки во всей ее полноте и описывает гуманизацию мышинного антитела к $\alpha\nu\beta 3$ путем идентификации дополняющей легкой цепи или тяжелой цепи соответственно, от легкой цепи человека или библиотеки тяжелой цепи, приводящей к вариантам гуманизированного антитела, имеющим аффинность настолько же или более высокую, чем аффинность исходного антитела. См. также Clackson T. et al. (1991), Nature, 352:624-628, которая включена в настоящее изобретение посредством ссылки во всей ее полноте и описывает способы получения антител, которые специфически связываются со специфическим антигеном с использованием специфического домена VL (или домена VH), и скрининг библиотеки на дополняющий домен VH (или домен VL). Скрининг привел к 14 новым партнерам для конкретного домена VH и 13 новым партнерам для конкретного домена VL, которые связывались сильнее, как определено с помощью ИФА. См. также Kim S.J. & Hong H.J. (2007), J. Microbiol., 45:572-577, которая включена в настоящее изобретение посредством ссылки во всей ее полноте и описывает способы получения антител, которые специфически связывают специфический антиген с использованием специфического домена VH, и скрининга библиотеки (например, библиотеки VL человека) на дополняющие домены VL; выбранные домены VL в свою очередь могут быть использованы для направленного отбора дополнительных комплементарных доменов VH (например, человека).

В определенных аспектах CDR антитела или его антигенсвязывающего фрагмента могут быть определены в соответствии со схемой нумерации по Чотиа, которая относится к местоположению структурных петель иммуноглобулина (см., например, Chothia C. & Lesk A.M. (1987), J. Mol. Biol., 196:901-917; Al-Lazikani B. et al. (1997), J. Mol. Biol., 273:927-948; Chothia C. et al. (1992), J. Mol. Biol., 227:799-817; Tramontano A. et al. (1990), J. Mol. Biol., 215(1):175-82; и патент США № 7709226). Как правило, при использовании системы нумерации по Кабату петля по Чотиа CDR-H1 представлена аминокислотами тяжелой цепи 26-32, 33 или 34, петля по Чотиа CDR-H2 представлена аминокислотами тяжелой цепи 52-56, и петля по Чотиа CDR-H3 представлена аминокислотами тяжелой цепи 95-102, в то время как петля по Чотиа CDR-L1 представлена аминокислотами легкой цепи 24-34, петля по Чотиа CDR-L2 представлена аминокислотами легкой цепи 50-56 и петля по Чотиа CDR-L3 представлена аминокислотами легкой цепи 89-97. Конец петли CDR-H1 по Чотиа при нумерации согласно системе нумерации по Кабату варьируется между H32 и H34 в зависимости от длины петли (это связано с тем, что в схеме нумерации по Кабату в H35A и H35B размещаются вставки; если ни 35A, ни 35B не присутствуют, петля заканчивается на 32; если присутствует только 35A, петля заканчивается на 33; если присутствуют оба 35A и 35B, петля заканчивается на 34).

В определенных аспектах в настоящем изобретении предложены антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связываются с В7-Н4 (например, В7-Н4 человека) и содержат CDR областей VH и VL по Чотиа антитела. В определенных вариантах осуществления антитела или их антигенсвязывающие фрагменты специфически связываются с В7-Н4 (например, В7-Н4 человека) и содержат одну или более CDR, в которых CDR по Кабату или по Чотиа имеют такую же аминокислотную последовательность. В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предложены антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связываются с В7-Н4 (например, В7-Н4 человека) и состоят из комбинаций CDR по Кабату и CDR по Чотиа.

В определенных аспектах CDR антитела или его антигенсвязывающего фрагмента могут быть оп-

ределены в соответствии с системой нумерации IMGT, как описано в Lefranc M-P (1999), *The Immunologist*, 7:132-136; и Lefranc M-P et al. (1999), *Nucleic. Acids. Res.*, 27:209-212. Согласно системе нумерации IMGT VH-CDR1 находится в положениях 26-35, VH-CDR2 находится в положениях 51-57, VH-CDR3 находится в положениях 93-102, VL-CDR1 находится в положениях 27-32, VL-CDR2 находится в положениях 50-52, и VL-CDR3 находится в положениях 89-97. В конкретном варианте осуществления в настоящем изобретении предложены антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связываются с B7-H4 (например, B7-H4 человека) и содержат CDR областей VH и VL по IMGT антитела, перечисленные в табл. 3 и 4, например, как описано в Lefranc M-P (1999) выше и Lefranc M-P et al. (1999), выше). В определенных аспектах CDR антитела или его антигенсвязывающего фрагмента могут быть определены в соответствии с MacCallum R.M. et al. (1996), *J. Mol. Biol.*, 262:732-745. См. также, например, Martin A., "Protein Sequence and Structure Analysis of Antibody Variable Domains" в *Antibody Engineering*, Kontermann и Dubel, eds., chapter 31, p. 422-439, Springer-Verlag, Berlin (2001). В конкретном варианте осуществления в настоящем изобретении предложены антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связываются с B7-H4 (например, B7-H4 человека) и могут быть определены методом, описанным в MacCallum R.M. et al.

В определенных аспектах CDR антитела или его антигенсвязывающего фрагмента могут быть определены в соответствии со схемой нумерации AbM, которая относится к гипервариабельным областям AbM, и которая представляют собой компромисс между CDR по Кабат и структурными петлями Чотиа, и используется в программном обеспечении для моделирования антител AbM Oxford Molecular (Oxford Molecular Group, Inc.). В конкретном варианте осуществления в настоящем изобретении предложены антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связываются с B7-H4 (например, B7-H4 человека) и могут быть определены в соответствии со схемой нумерации AbM.

В определенных вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в настоящем изобретении, специфически связываются с B7-H4 человека и содержат тяжелую цепь, приведенную в табл. 5, например, в комбинации с легкой цепью.

Таблица 5

Аминокислотные последовательности тяжелой цепи

Описание тяжелой цепи	Аминокислотная последовательность тяжелой цепи (SEQ ID NO)
M6 H (J511)	QVTLKESGPGILQPSQTLTLTCSFSGFSLSTYGLGVGWI RQPSGKGLDWLANIWWNDDKYNSALKSRLTISKDTS NNQVFLKISSVDTADTGTYECAQVDGYYWYFDVWGA GTTVTVSSAKTTPPSVYPLAPGSAQAQTNMVTGLCLVK GYFPEPVTVTWNSGSLSSGVHTFPAVLES DLYTLSSSVT VPSSRPSETVTCNVAHPASSTKVDKIVPRDCGCKPCI CTVPEVSSVFIFPPKPKDVLITLTPKVTVCVVVDISKDDP EVQFSWFVDDVEVHTAQTQPREEQFNSTFRSVSELPIM HQDWLNGKEFKCRVNSAAFPAPIEKTISKTKGRPKAPQ VYTIPPPKEQMAKDKVSLTCMITDFFPEDITVEWQWNG QPAENYKNTQPIMNTNGSYFVYSKLVQKSNWEAGN TFTCSVLHEGLHNNHTEKSLSHSPGK (SEQ ID NO:89)
M6 H (J512, J517, J518)	QVTLKESGPGILQPSQTLTLTCSFSGFSLSTYGLGVGWI RQPSGKGLDWLANIWWNDDKYNSALKSRLTISKDTS NNQVFLKISSVDTADTGTYECAQVDGYYWYFDVWGA GTTVTVSSAKTTPPSVYPLAPGSAQAQTNMVTGLCLVK GYFPEPVTVTWNSGSLSSGVHTFPAVLES DLYTLSSSVT VPSSRPSETVTCNVAHPASSTKVDKIVPRDCGCKPCI CTVPEVSSVFIFPPKIKDVLMSLSPIVTCVVVDVSEDDP DVQISWFVNNVEVHTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPI QHQDWMSGKEFKCKVNNKDLPAPIERTISKPKGSVRA PQVYVLPPEEEMTKKQVTLTCMVTD FMPEDIYVEWT NNGKTELNYKNTEPVLDSGYSFMYSKLRVEKKNWV ERNYSYSCSVVHEGLHNNHHTKFSRTPGK (SEQ ID NO:16)

<p>M11 H (J513)</p>	<p>QVTLKESGPGILQPSQTLSTCSLSGFSLSSTYGLGVGWI RQPSGKGLGWLANIWWNDDKYNSALKSRLTISKDTS NNQVFLKISSVDTADTGTYICAQVDGYYWYFDVWGA GTTVTVSSAKTTPPSVYPLAPGSAQAQNSMVTGCLVK GYFPEPVTVTWNSGSLSSGVHTFPAVLES DLYTLSSSVT VPSSPRPSETVTCNVAHPASSTKVDKKIVPRDCGCKPCI</p>
	<p>CTVPEVSSVFIFPPKPKDVLITITLTPKVTCVVVDISKDDP EVQFSWFVDDVEVHTAQTQPREEQFNSTFRSVSELPIM HQDWLNGKEFKCRVNSAAFPAPIEKTISKTKGRPKAPQ VYTIPPPKEQMAKDKVSLTCMITDFFPEDITVEWQWNG QPAENYKNTQPIMNTNGSYFVYSKLVNQKSNWEAGN TFTCSVLHEGLHNNHTEKSLSHSPGK (SEQ ID NO:90)</p>
<p>M11 H (J514, J519, J520)</p>	<p>QVTLKESGPGILQPSQTLSTCSLSGFSLSSTYGLGVGWI RQPSGKGLGWLANIWWNDDKYNSALKSRLTISKDTS NNQVFLKISSVDTADTGTYICAQVDGYYWYFDVWGA GTTVTVSSAKTTPPSVYPLAPGSAQAQNSMVTGCLVK GYFPEPVTVTWNSGSLSSGVHTFPAVLES DLYTLSSSVT VPSSPRPSETVTCNVAHPASSTKVDKKIVPRDCGCKPCI CTVPEVSSVFIFPPKIKDVLMISSLPIVTCVVVDVSEDDP DVQISWFVNNVEVHTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPI QHQDWMSGKEFKCKVNNKDLPAPIERTISKPKGSVRA PQVYVLPPEEEMTKKQVTLTCMVTDMPEDIYVEWT NNGKTELNYKNTEPVLDSDGSYFMYSKLRVEKKNWV ERNYSVCSVVHEGLHNNHHTKSFSTRTPGK (SEQ ID NO:17)</p>
<p>M15 H (J515)</p>	<p>QVTLKESGPGILQSSQTLSTCSFSGFSLSSTYGLGVGWI RQPSGKGLDWLANIWWNDDKYNSALKSRLTISKDTS NNQVFLKISSVDTADTGTYICAQVDGYYWYFDVWGA GTTVTVSSAKTTPPSVYPLAPGSAQAQNSMVTGCLVK GYFPEPVTVTWNSGSLSSGVHTFPAVLES DLYTLSSSVT VPSSPRPSETVTCNVAHPASSTKVDKKIVPRDCGCKPCI CTVPEVSSVFIFPPKPKDVLITITLTPKVTCVVVDISKDDP EVQFSWFVDDVEVHTAQTQPREEQFNSTFRSVSELPIM HQDWLNGKEFKCRVNSAAFPAPIEKTISKTKGRPKAPQ VYTIPPPKEQMAKDKVSLTCMITDFFPEDITVEWQWNG QPAENYKNTQPIMNTNGSYFVYSKLVNQKSNWEAGN TFTCSVLHEGLHNNHTEKSLSHSPGK (SEQ ID NO:91)</p>
<p>M15 H (J516, J521, J522)</p>	<p>QVTLKESGPGILQSSQTLSTCSFSGFSLSSTYGLGVGWI RQPSGKGLDWLANIWWNDDKYNSALKSRLTISKDTS NNQVFLKISSVDTADTGTYICAQVDGYYWYFDVWGA GTTVTVSSAKTTPPSVYPLAPGSAQAQNSMVTGCLVK</p>

	GYFPEPVTVTWNSGSLSSGVHTFPAVLES DLYTLSSSVT VPSSRPSETVTCNVAHPASSTKVDKIVPRDCGCKPCI CTVPEVSSVFIFPPKIKDVL MISLSPIVTCVVVDVSEDDP DVQISWFVNNVEVHTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPI QHQDWMSGKEFKCKVNNKDL PAPIERTISKPKGSVRA PQVYVLPPEEEMTKKQVTLTCMVTD FMPEDIYVEWT NNGKTELNYKNTEPVLDSDGSYFMYSKLRVEKKNWV ERNYSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPGK (SEQ ID NO:18)
--	--

В определенных вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в настоящем изобретении, специфически связываются с B7-H4 человека и содержат легкую цепь, приведенную в табл. 6, например, в комбинации с тяжелой цепью.

Таблица 6

Аминокислотные последовательности легкой цепи

Описание легкой цепи	Аминокислотная последовательность легкой цепи (SEQ ID NO)
M6, M11, M15 L (J511-J516)	DVLM TQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSIVHSNRNTYLE WYLQKPGQSPKLLIYNVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTL KISRVEAEDLGVYYCFQGSHVPLTFGAGTKLELKRADA APTVSIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNMFYPKDINVKWKID GSERQNGVLNSWTDQDSKDYSTYSMSSTLTLTKDEYERH NSYTCEATHKSTSTSPIVKSFNRNEC (SEQ ID NO:19)
De-N-гликозилированная L (1) (J517, J519, J521)	DVLM TQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSIVHSNRNTYLE WYLQKPGQSPKLLIYNVANRFSGVPDRFSGSGSGTDFTL KISRVEAEDLGVYYCFQGSHVPLTFGAGTKLELKRADA APTVSIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNMFYPKDINVKWKID GSERQNGVLNSWTDQDSKDYSTYSMSSTLTLTKDEYERH NSYTCEATHKSTSTSPIVKSFNRNEC (SEQ ID NO:30)
De-N-гликозилированная L (2) (J518, J520, J522)	DVLM TQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSIVHSNRNTYLE WYLQKPGQSPKLLIYQVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTL KISRVEAEDLGVYYCFQGSHVPLTFGAGTKLELKRADA APTVSIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNMFYPKDINVKWKID
	GSERQNGVLNSWTDQDSKDYSTYSMSSTLTLTKDEYERH NSYTCEATHKSTSTSPIVKSFNRNEC (SEQ ID NO:31)

В определенных вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в настоящем изобретении, специфически связываются с B7-H4 человека и содержат тяжелую цепь, приведенную в табл. 5, и легкую цепь, приведенную в табл. 6.

В конкретных аспектах в настоящем изобретении предложены антитела, которые содержат тяжелую цепь и легкую цепь. Что касается тяжелой цепи, в конкретном варианте осуществления тяжелая цепь антитела, описанного в настоящем изобретении, может представлять собой тяжелую цепь альфа (α), дельта (δ), эpsilon (ϵ), гамма (γ) или мю (μ). В конкретном варианте осуществления антитело, описанное в настоящем изобретении, которое иммуноспецифически связывается с B7-H4 (например, B7-H4 человека), содержит тяжелую цепь, причем аминокислотная последовательность домена VH содержит аминокислотную последовательность, указанную в табл. 3, и причем константная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность константной области тяжелой цепи IgG2a мыши.

В конкретном варианте осуществления антитело, описанное в настоящем изобретении, которое иммуноспецифически связывается с B7-H4 (например, B7-H4 человека), содержит тяжелую цепь, причем аминокислотная последовательность домена VH содержит аминокислотную последовательность, указанную в табл. 3, и причем константная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 87:

лотную последовательность SEQ ID NO: 9, 10 или 11);

(iii) последовательности тяжелой и легкой цепей мышинового M6 IgG2a или их De-N-гликозилированные варианты (например, тяжелая цепь, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16, и легкая цепь, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19, 30 или 31); или

(iv) последовательности тяжелой и легкой цепей мышинового M6 IgG1 (например, тяжелая цепь, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 89, и легкая цепь, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19).

В конкретных вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит

(i) последовательности CDR M11 (например, аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 22-25, 27 и 29);

(ii) последовательности областей VH и VL M11 или их De-N-гликозилированные варианты (например, VH, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7, и VL, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9, 10 или 11);

(iii) последовательности тяжелой и легкой цепей мышинового M11 IgG2a или их De-N-гликозилированные варианты (например, тяжелая цепь, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17, и легкая цепь, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19, 30 или 31); или

(iv) последовательности тяжелой и легкой цепей мышинового M11 IgG1 (например, тяжелая цепь, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 90, и легкая цепь, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19).

В конкретных вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит

(i) последовательности CDR M15 (например, аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 22-25, 28 и 29);

(ii) последовательности областей VH и VL M15 или их De-N-гликозилированные варианты (например, VH, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8, и VL, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9, 10 или 11);

(iii) последовательности тяжелой и легкой цепей мышинового M15 IgG2a или их De-N-гликозилированные варианты (например, тяжелая цепь, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18, и легкая цепь, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19, 30 или 31); или

(iv) последовательности тяжелой и легкой цепей мышинового M15 IgG1 (например, тяжелая цепь, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 91, и легкая цепь, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19).

В другом конкретном варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в настоящем изобретении, которые иммуноспецифически связываются с B7-H4 (например, B7-H4 человека), содержат тяжелую цепь и легкую цепь, причем

(i) тяжелая цепь содержит домен VH, содержащий аминокислотные последовательности CDR1 области VH, CDR2 области VH и CDR3 области VH антитела, указанного в табл. 1 (например, SEQ ID NO: 22-24);

(ii) легкая цепь содержит домен VL, содержащий аминокислотные последовательности CDR1 области VL, CDR2 области VL и CDR3 области VL того же антитела, указанного в табл. 1 (например, SEQ ID NO: 25, 26 и 29, 25, 27 и 29 или 25, 28 и 29);

(iii) тяжелая цепь дополнительно содержит константный домен IgG1 мыши (например, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 92) или константный домен IgG2a мыши (например, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 87); и

(iv) легкая цепь дополнительно содержит мышинный константный домен каппа (например, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 88).

В другом конкретном варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в настоящем изобретении, которые иммуноспецифически связываются с B7-H4 (например, B7-H4 человека), содержат тяжелую цепь и легкую цепь, причем

(i) тяжелая цепь содержит домен VH, содержащий аминокислотную последовательность антитела, указанного в табл. 1 (например, SEQ ID NO: 6-8);

(ii) легкая цепь содержит домен VL, содержащий аминокислотную последовательность того же антитела, указанного в табл. 1 (например, SEQ ID NO: 9-11);

(iii) тяжелая цепь дополнительно содержит константный домен IgG1 мыши (например, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 92) или константный домен IgG2a мыши (например, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 87); и

(iv) легкая цепь дополнительно содержит мышинный константный домен каппа (например, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 88).

В определенных вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в настоящем изобретении, которые специфически связываются с B7-H4 (например, B7-H4 человека), содержат одну, две или более каркасных областей VH (FR), имеющих аминокислотные по-

следовательности, описанные в настоящем изобретении для антитела, указанные в табл. 7 (например, SEQ ID NO: 38-49). В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в настоящем изобретении, которые специфически связываются с B7-H4 (например, B7-H4 человека), содержат одну, две или более каркасных областей VL (FR), имеющих аминокислотные последовательности, описанные в настоящем изобретении для антитела, указанные в табл. 7 (например, SEQ ID NO: 50-53). В конкретных вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в настоящем изобретении, которые специфически связываются с B7-H4 (например, B7-H4 человека), содержат одну, две или более каркасных областей VH, имеющих аминокислотные последовательности, описанные в настоящем изобретении для антитела, указанные в табл. 7 выше, и одну, две или более каркасных областей VL, имеющих аминокислотные последовательности, описанные в настоящем изобретении для того же антитела, указанные в табл. 7 (например, SEQ ID NO: 38-41 и 50-53; SEQ ID NO: 42-45 и 50-53; или SEQ ID NO: 46-49 и 50-53).

Таблица 7

Каркасные аминокислотные последовательности

VH/VL гибридомы	FR1 (SEQ ID NO)	FR2 (SEQ ID NO)	FR3 (SEQ ID NO)	FR4 (SEQ ID NO)
M6 VH	QVTLKESGP GILQPSQTLS LTCSFS (SEQ ID NO:38)	GVGWIRQPSG KGLDWLANI (SEQ ID NO:39)	KYYNSALKSRLTISKD TSNNQVFLKISSVDTA DTGTYCAQ (SEQ ID NO:40)	WGAGTTVT VSS (SEQ ID NO:41)
M11 VH	QVTLKESGP GILQPSQTLS LTCSLS (SEQ ID NO:42)	GVGWIRQPSG KGLGWLANI (SEQ ID NO:43)	KYYNSALKSRLTISKD TSNNQVFLKISSVDTA DTGTYCAQ (SEQ ID NO:44)	WGAGTTVT VSS (SEQ ID NO:45)
M15 VH	QVTLKESGP GILQSSQTLS LTCSFS (SEQ ID NO:46)	GVGWIRQPSG KGLDWLANI (SEQ ID NO:47)	KYYNSALKSRLTISKD TSNNQVFLKISSVDTA DTGTYCAQ (SEQ ID NO:48)	WGAGTTVT VSS (SEQ ID NO:49)
M6, M11, M15 VL	DVLMTQTPL SLPVSLGDQ ASISC (SEQ ID NO:50)	YLQKPGQSPK LLIY (SEQ ID NO:51)	GVPDRFSGSGSGTDFC LKISRVEAEDLGVYY C (SEQ ID NO:52)	FGAGTKLE LK (SEQ ID NO:53)

В определенных вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в настоящем изобретении, которые специфически связываются с B7-H4 (например, B7-H4 человека), содержат каркасные области VH (FR), имеющие по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 98% идентичности последовательности с каркасными областями VH, описанными в настоящем изобретении в табл. 7. В определенных вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в настоящем изобретении, которые специфически связываются с B7-H4 (например, B7-H4 человека), содержат каркасные области VL (FR), имеющие по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 98% идентичности последовательности с каркасными областями VL, описанными в настоящем изобретении в табл. 7. В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в настоящем изобретении, которые специфически связываются с B7-H4 (например, B7-H4 человека), содержат каркасные области VH (FR), имеющие по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 98% идентичности последовательности с каркасными областями VH, описанными в настоящем изобретении в табл. 7 выше, и каркасные области VL (FR), имеющие по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 98% идентичности последовательности с каркасными областями VL, описанными в настоящем изобретении в табл. 7.

В другом аспекте в настоящем изобретении предложены антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые связывают один и тот же эпитоп B7-H4 (например, эпитоп B7-H4 человека), что и антитело

или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в настоящем изобретении (например, J511-J522).

Анализы конкурентного связывания могут использоваться для определения того, связываются ли два антитела с перекрывающимися эпитопами. Конкурентное связывание можно определять с помощью анализа, в котором исследуемый иммуноглобулин ингибирует специфическое связывание эталонного антитела с общим антигеном, таким как В7-Н4. Известны различные типы анализов конкурентного связывания, например твердофазный прямой или непрямой радиоиммунологический анализ (RIA), твердофазный прямой или непрямой ферментный иммунологический анализ (EIA), конкурентный "сэндвич"-анализ (см. Stahl C. et al. (1983), *Methods Enzymol.*, 9:242-253); прямой твердофазный биотин-авидиновый EIA (см. Kirkland T.N. et al. (1986), *J. Immunol.*, 137:3614-9); твердофазный прямой анализ с мечением, твердофазный прямой "сэндвич"-анализ с мечением (см. Harlow E. & Lane D. (1988), *Antibodies: A Laboratory Manual.*, Cold Spring Harbor Press); твердофазный прямой RIA с применением метки I-125 (см. Morel G.A. et al. (1988), *Mol. Immunol.*, 25(1):7-15); прямой твердофазный биотин-авидиновый EIA (Cheung R.C. et al. (1990), *Virology*, 176:546-52) и прямой RIA с мечением. (Moldenhauer G. et al. (1990), *Scand. J. Immunol.*, 32:77-82). Обычно такой анализ включает в себя использование очищенного антигена (например, В7-Н4, такого как В7-Н4 человека), связанного с твердой поверхностью, или клеток, содержащих любой из этих компонентов: немеченного исследуемого иммуноглобулина и меченного эталонного иммуноглобулина. Конкурентное ингибирование можно измерить путем определения количества метки, связанной с твердой поверхностью или клетками, в присутствии исследуемого иммуноглобулина. Обычно исследуемый иммуноглобулин присутствует в избытке. Обычно, когда конкурирующее антитело присутствует в избытке, оно будет ингибировать специфическое связывание эталонного антитела с общим антигеном по меньшей мере на 50-55%, 55-60%, 60-65%, 65-70%, 70-75% или более. Анализ конкурентного связывания может быть разработан в большом количестве разных форматов с использованием меченного антигена или меченного антитела. В общем варианте этого анализа антиген иммобилизуют на 96-луночном планшете. Способность немеченных антител блокировать связывание меченных антител с антигеном затем измеряют, используя радиоактивные или ферментные метки. Для получения дополнительной информации см., например, Wagener C. et al. (1983), *J. Immunol.*, 130:2308-2315; Wagener C. et al. (1984), *J. Immunol. Methods*, 68:269-274; Kuroki M. et al. (1990), *Cancer Res.*, 50:4872-4879; Kuroki M. et al. (1992), *Immunol. Invest*, 21:523-538; Kuroki M. et al. (1992), *Hybridoma*, 11:391-407 and *Antibodies: A Laboratory Manual*, ed Harlow E. & Lane D. editors выше, p. 386-389.

В одном варианте осуществления конкурентный анализ выполняют с использованием поверхностного плазмонного резонанса (BIAcore), например, с помощью "тандемного подхода", такого как описан у Abdiche Y.N. et al. (2009), *Analytical. Biochem.*, 386:172-180, где антиген В7-Н4 иммобилизуют на поверхности чипа, например, сенсорного чипа CM5, а антитела к В7-Н4 затем пропускают через этот чип. Чтобы определить, конкурирует ли антитело или его антигенсвязывающий фрагмент с антителом к В7-Н4, описанным в настоящем изобретении, антитело к В7-Н4 сначала пропускают через поверхность чипа для достижения насыщения, а затем добавляют потенциальное конкурирующее антитело. Связывание конкурирующего антитела или его антигенсвязывающего фрагмента можно затем установить и количественно определить относительно неконкурирующего контроля.

В другом варианте осуществления используется конкурентное связывание Fortebio Octet для определения того, что антитело к В7-Н4 или его антигенсвязывающий фрагмент конкурентно ингибирует связывание другого антитела к В7-Н4 или его антигенсвязывающего фрагмента с В7-Н4.

В другом аспекте в настоящем изобретении предложены антитела, которые конкурентно ингибируют (например, дозозависимым образом) связывание антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, описанных в настоящем изобретении (например, J511-J522), с В7-Н4 (например, В7-Н4 человека), как определено с помощью анализов, известных специалисту в данной области техники или описанных в настоящем изобретении (например, конкурентные анализы ИФА, или анализ методом "suspension assay", или анализ поверхностного плазмонного резонанса).

В конкретных аспектах в настоящем изобретении предложено антитело или антигенсвязывающий фрагмент, которые конкурентно ингибируют (например, дозозависимым образом) связывание с В7-Н4 (например, В7-Н4 человека) антитела, содержащего домен VH, имеющий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 6, и домен VL, имеющий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 9.

В конкретных аспектах в настоящем изобретении предложено антитело или антигенсвязывающий фрагмент, которые конкурентно ингибируют (например, дозозависимым образом) связывание с В7-Н4 (например, В7-Н4 человека) антитела, содержащего домен VH, имеющий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 7, и домен VL, имеющий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 9.

В конкретных аспектах в настоящем изобретении предложено антитело или антигенсвязывающий фрагмент, которые конкурентно ингибируют (например, дозозависимым образом) связывание с В7-Н4 (например, В7-Н4 человека) антитела, содержащего домен VH, имеющий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 8, и домен VL, имеющий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 9.

В конкретных аспектах в настоящем изобретении предложено антитело или антигенсвязывающий фрагмент, которые конкурентно ингибируют (например, дозозависимым образом) связывание с В7-Н4 (например, В7-Н4 человека) антитела, содержащего домен VH, имеющий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 6, и домен VL, имеющий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 10.

В конкретных аспектах в настоящем изобретении предложено антитело или антигенсвязывающий фрагмент, которые конкурентно ингибируют (например, дозозависимым образом) связывание с В7-Н4 (например, В7-Н4 человека) антитела, содержащего домен VH, имеющий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 7, и домен VL, имеющий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 10.

В конкретных аспектах в настоящем изобретении предложено антитело или антигенсвязывающий фрагмент, которые конкурентно ингибируют (например, дозозависимым образом) связывание с В7-Н4 (например, В7-Н4 человека) антитела, содержащего домен VH, имеющий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 8, и домен VL, имеющий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 10.

В конкретных аспектах в настоящем изобретении предложено антитело или антигенсвязывающий фрагмент, которые конкурентно ингибируют (например, дозозависимым образом) связывание с В7-Н4 (например, В7-Н4 человека) антитела, содержащего домен VH, имеющий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 6, и домен VL, имеющий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 11.

В конкретных аспектах в настоящем изобретении предложено антитело или антигенсвязывающий фрагмент, которые конкурентно ингибируют (например, дозозависимым образом) связывание с В7-Н4 (например, В7-Н4 человека) антитела, содержащего домен VH, имеющий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 7, и домен VL, имеющий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 11.

В конкретных аспектах в настоящем изобретении предложено антитело или антигенсвязывающий фрагмент, которые конкурентно ингибируют (например, дозозависимым образом) связывание с В7-Н4 (например, В7-Н4 человека) антитела, содержащего домен VH, имеющий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 8, и домен VL, имеющий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 11.

В конкретных аспектах в настоящем изобретении предложено антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые иммуноспецифически связываются с одним и тем же эпитопом В7-Н4 (например, В7-Н4 человека), что и любое из J511-J522. В конкретном аспекте антигенсвязывающий фрагмент, как описано в настоящем изобретении, который иммуноспецифически связывается с В7-Н4 (например, В7-Н4 человека), выбран из группы, состоящей из Fab, Fab', F(ab')₂, и ScFv, причем Fab, Fab', F(ab')₂ или ScFv содержит последовательность варибельной области тяжелой цепи и варибельной области легкой цепи последовательности антитела к В7-Н4 или его антигенсвязывающего фрагмента, как описано в настоящем изобретении. Fab, Fab', F(ab')₂ или scFv могут быть получены с помощью любого способа, известного специалисту в данной области техники, включая без ограничения описанные в разделе 5.3 ниже. Антитело к В7-Н4 или его антигенсвязывающий фрагмент могут быть слиты или конъюгированы (например, ковалентно или нековалентно связаны) с обнаруживаемой меткой или веществом. Примеры обнаруживаемых меток или веществ включают в себя ферментные метки, такие как глюкозооксидаза; радиоизотопы, такие как йод (¹²⁵I, ¹²¹I), углерод (¹⁴C), сера (³⁵S), тритий (³H), индий (¹²¹In) и технеций (⁹⁹Tc); люминесцентные метки, такие как люминол; и флуоресцентные метки, такие как флуоресцеин, родамин и биотин. Такие меченные антитела или их антигенсвязывающие фрагменты могут использоваться для обнаружения белка В7-Н4 (например, В7-Н4 человека). См., например, раздел 5.4.1 ниже.

Производство антител.

Антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые иммуноспецифически связываются с В7-Н4 (например, В7-Н4 человека), могут быть получены любым способом, известным в данной области техники для синтеза антител и их антигенсвязывающих фрагментов, например, химическим синтезом или методами рекомбинантной экспрессии. Способы, описанные в настоящем изобретении используют, если не указано иное, обычные методы молекулярной биологии, микробиологии, генетического анализа, рекомбинантной ДНК, органической химии, биохимии, ПЦР, синтеза олигонуклеотидов и их модификации, гибридизации нуклеиновых кислот и методы смежных областей в пределах области техники. Эти методики описаны, например, в ссылках, цитируемых в настоящем изобретении, и полностью объяснены в литературе. См., например, Sambrook J. et al. (2001), *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY; Ausubel FM et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons (1987 and annual updates); *Current Protocols in Immunology*, John Wiley & Sons (1987 and annual updates) Gait (ed.) (1984), *Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach*, IRL Press; Eckstein (ed.) (1991), *Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach*, IRL Press; Birren B et al. (eds.) (1999), *Genome Analysis: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press.

В определенном аспекте в настоящем изобретении предложен способ получения антитела или анти-

генсвязывающего фрагмента, которые иммуноспецифически связываются с В7-Н4 (например, В7-Н4 человека), включающий в себя культивирование клетки или клетки-хозяина, описанной в настоящем изобретении. В определенном аспекте в настоящем изобретении предложен способ получения антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которые иммуноспецифически связываются с В7-Н4 (например, В7-Н4 человека), включающий в себя экспрессию (например, рекомбинантную экспрессию) антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, используя клетку или клетку-хозяина, описанную в настоящем изобретении (например, клетку или клетку-хозяина, содержащую полинуклеотиды, кодирующие антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в настоящем изобретении). В конкретном варианте осуществления клетка представляет собой выделенную клетку. В конкретном варианте осуществления экзогенные полинуклеотиды были введены в клетку. В конкретном варианте осуществления способ дополнительно включает в себя этап очистки антитела или антигенсвязывающего фрагмента, полученных из клетки или клетки-хозяина. Способы получения поликлональных антител известны в данной области техники (см., например, главу 11 в *Short Protocols in Molecular Biology* (2002), 5th ed., Ausubel F.M. et al., eds., John Wiley and Sons, New York).

Моноклональные антитела или их антигенсвязывающие фрагменты могут быть получены с использованием широкого спектра методов, известных в данной области техники, включая использование технологий гибридомной, рекомбинантной и фаговой индикации, технологий презентации на основе дрожжей или их комбинации. Например, моноклональные антитела или их антигенсвязывающие фрагменты могут быть получены с использованием гибридомных методов, включая известные в данной области техники и описанные, например, в Harlow E. & Lane D., *Antibodies: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed., 1988); Hammerling G.J. et al., *Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas*, 563681 (Elsevier, N.Y., 1981), или как описано у Kohler G. & Milstein C. (1975), *Nature*, 256:495. Примеры способов презентации на основе дрожжей, которые могут применяться для отбора и получения антител, описанных в настоящем изобретении, включают в себя способы, описанные, например, в WO 2009/036379 A2; WO 2010/105256; и WO 2012/009568, каждый из которых в полном объеме включен в настоящий документ посредством ссылки.

В конкретных вариантах осуществления моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент можно получить с помощью гибридомного способа, впервые описанного Kohler et al., *Nature*, 256:495 (1975), как упоминалось выше. В гибридомном способе мышь или другое подходящее животное-хозяина иммунизируют, как было описано выше, чтобы вызвать выработку лимфоцитов, которые вырабатывают или способны вырабатывать антитела, которые будут специфически связываться с белком, используемым для иммунизации, например, белком внеклеточного домена (ECD) В7-Н4 (SEQ ID NO: 20). Лимфоциты затем сливают с клетками миеломы, используя подходящий агент для слияния, такой как полиэтиленгликоль, для получения гибридомной клетки (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, p. 59-103 (Academic Press, 1986)). В конкретных вариантах осуществления моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляет собой антитело или антигенсвязывающий фрагмент, полученные из клональной клетки (например, гибридомы или клетки-хозяина, вырабатывающей рекомбинантное антитело или антигенсвязывающий фрагмент), причем антитело или антигенсвязывающий фрагмент иммуноспецифически связываются с В7-Н4 (например, В7-Н4 человека), как определено, например, с помощью ИФА или других анализов связывания антигена, известных в данной области техники или описанных в примерах, предложенных в настоящем изобретении. В конкретных вариантах осуществления моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент может представлять собой антитело грызуна или мыши или его антигенсвязывающий фрагмент. В конкретных вариантах осуществления моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент может представлять собой химерное или гуманизованное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент. В определенных вариантах осуществления моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент может представлять собой Fab-фрагмент или F(ab')₂-фрагмент. Моноклональные антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, описанные в настоящем изобретении, могут, например, быть получены с помощью гибридомного способа, как описано у Kohler G. & Milstein C. (1975), *Nature*, 256:495, или могут, например, быть выделены из фаговых библиотек, используя, например, способы, как описано в настоящем изобретении. Другие способы получения клональных клеточных линий и экспрессируемых ими моноклональных антител и их антигенсвязывающих фрагментов хорошо известны в данной области техники (см., например, главу 11 в *Short Protocols in Molecular Biology* (2002), 5th ed., Ausubel F.M. et al., выше).

Антигенсвязывающие фрагменты антител, описанных в настоящем изобретении, могут быть получены с помощью любого способа, известного специалисту в данной области техники. Например, Fab- и F(ab')₂-фрагменты, описанные в настоящем изобретении, могут быть получены вследствие протеолитического расщепления молекул иммуноглобулина, используя ферменты, такие как папаин (для получения Fab-фрагментов) или пепсин (для получения F(ab')₂-фрагментов). Fab-фрагмент соответствует одному из двух идентичных плеч молекулы тетрамерного антитела и содержит полную легкую цепь, спаренную с доменами VH и CH1 тяжелой цепи. F(ab')₂-фрагмент содержит два антигенсвязывающих плеча молекулы тетрамерного антитела, связанных дисульфидными связями в шарнирной области.

Более того, антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, описанные в настоящем изобретении,

могут также быть получены с помощью различных способов фаговой индикации и/или презентации на основе дрожжей, известных в данной области техники. В способах фаговой индикации белки отображаются на поверхности фаговых частиц, которые несут кодирующие их полинуклеотидные последовательности. В частности, последовательности ДНК, кодирующие домены VH и VL, амплифицируют из библиотек кДНК животных (например, человеческих или мышинных библиотек кДНК пораженных тканей). ДНК, кодирующие домены VH и VL, рекомбинируют вместе с линкером scFv путем ПЦР и клонируют в фагмидный вектор. Вектор электропорировать в *E.coli* и *E.coli* инфицируют хелперным фагом. Фаг, используемый в этих способах, как правило, представляет собой нитчатый фаг, включая fd и M13, а домены VH и VL обычно рекомбинантно слиты с фаговым геном III или геном VIII. Фаг, экспрессирующий антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с конкретным антигеном, может быть выбран или идентифицирован с помощью антигена, например, используя меченый антиген или антиген, связанный или захваченный на твердой поверхности или грануле. Примеры способов фаговой индикации, которые могут использоваться для получения антител или фрагментов, описанных в настоящем изобретении, включают в себя способы, описанные у Brinkman U. et al. (1995), *J. Immunol. Methods*, 182:41-50; Ames R.S. et al. (1995), *J. Immunol. Methods*, 184:177-186; Kettleborough C.A. et al. (1994), *Eur. J. Immunol.*, 24:952-958; Persic L. et al. (1997), *Gene*, 187:9-18; Burton D.R. & Barbas C.F. (1994), *Advan. Immunol.*, 57:191-280; в заявке PCT № PCT/GB91/001134; международных публикациях № WO 90/02809, WO 91/10737, WO 92/01047, WO 92/18619, WO 93/11236, WO 95/15982, WO 95/20401 и WO 97/13844; а также в патентах США № 5698426, 5223409, 5403484, 5580717, 5427908, 5750753, 5821047, 5571698, 5427908, 5516637, 5780225, 5658727, 5733743 и 5969108.

Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент могут быть выбраны из любого класса иммуноглобулинов, включая IgM, IgG, IgD, IgA и IgE, а также из любого изотипа, включая IgG₁, IgG₂, IgG₃ и IgG₄.

Полинуклеотиды.

В определенных аспектах в настоящем изобретении предложены полинуклеотиды, содержащие нуклеотидную последовательность, кодирующую антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в настоящем изобретении, или их домен (например, вариабельную область легкой цепи и/или вариабельную область тяжелой цепи), который иммуноспецифически связывается с антигеном B7-H4 (например, B7-H4 человека), а также векторы, например, векторы, содержащие такие полинуклеотиды для рекомбинантной экспрессии в клетках-хозяевах (например, *E.coli* и клетки млекопитающих).

В конкретных аспектах в настоящем изобретении предложены полинуклеотиды, содержащие нуклеотидные последовательности, кодирующие антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые иммуноспецифически связываются с полипептидом B7-H4 (например, B7-H4 человека) и содержат аминокислотную последовательность, как описано в настоящем изобретении, а также антитела или антигенсвязывающие фрагменты, которые конкурируют с такими антителами или антигенсвязывающими фрагментами за связывание с полипептидом B7-H4 (например, дозозависимым образом) или которые связываются с тем же эпитопом, что и такие антитела или антигенсвязывающие фрагменты.

Также в настоящем изобретении предложены полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид, содержащий последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 6-8. В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие полипептид, иммуноспецифически связываются с B7-H4.

Также в настоящем изобретении предложен полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид, содержащий последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 9-11. В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие полипептид, иммуноспецифически связываются с B7-H4.

Также в настоящем изобретении предложен полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид, содержащий последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 22-24, или содержащий все аминокислоты из SEQ ID NO: 22-24. В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие полипептид, иммуноспецифически связываются с B7-H4. Также в настоящем изобретении предложен полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид, содержащий последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 25-29, или содержащий все из SEQ ID NO: 25, 26 и 29, все из SEQ ID NO: 25, 27 и 29 или все из SEQ ID NO: 25, 28 и 29. В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие полипептид, иммуноспецифически связываются с B7-H4.

Также в настоящем изобретении предложен полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид, содержащий последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 16-18, 89, 90 и 91. В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие полипептид, иммуноспецифически связываются с B7-H4. Также в настоящем изобретении предложен полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид, содержащий последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 19, 30 и 31. В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие полипептид, иммуноспецифически связываются с B7-H4.

Также в настоящем изобретении предложены полинуклеотиды, содержащие нуклеотидную последовательность, кодирующую тяжелую цепь и/или легкую цепь и показанную в табл. 8, например, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие кодируемую тяжелую цепь и/или легкую цепь, специфически связываются с В7-Н4.

Таблица 8

Полинуклеотидные последовательности, кодирующие тяжелую цепь и легкую цепь

Антитело	Полинуклеотидная последовательность, кодирующая тяжелую/легкую цепь (SEQ ID NO)
J511 HC	ATGGGCAGGCTTACTTCTTCATTCCTGCTACTGATTGTCCCTGCATAT GTCCTGTCCCAGGTCACCTCTGAAAGAGTCTGGCCCTGGGATATTGCA GCCCTCCCAGACCCCTCAGTCTGACTTGTTCTTTCTCTGGGTTTTCACT GAGCACTTATGGTCTGGGTGTAGGTTGGATTTCGTCAGCCTTCAGGGA AGGGTCTGGACTGGCTGGCCAACATTTGGTGAATGATGATAAATAC TATAACTCAGCCCTGAAGAGCCGGCTCACAATCTCCAAGGATACCTC CAACAACCAGGTATTCCTCAAGATCTCCAGTGTGGACACTGCAGATA CTGGCACATACTACTGTGCTCAAGTTGATGGTTACTACTGGTACTTTCG ATGTCTGGGGCGCAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCAGCCAAAACG ACACCACCAAGTGTCTATCCACTGGCCCCTGGATCTGCTGCCCAAAC TAACTCCATGGTGACCCTGGGATGCCTGGTCAAGGGCTATTTCCCTG AGCCAGTGACAGTGACCTGGAACCTGGATCCCTGTCCAGCGGTGTG CACACCTTCCCAGCTGTCCTGGAGTCTGACCTCTACACTCTGAGCAG CTCAGTGA CTGTCCCCTCCAGCCCTCGGCCAGCGAGACCGTCACTT GCAACGTTGCCACCCGGCCAGCAGCACCAAAGTGGACAAGAAAAT TGTGCCAGGGATTGTGGTTGTAAGCCTTGCATATGTACAGTCCCAG AAGTATCATCTGTCTTCATCTTCCCCCAAAGCCCAAGGATGTGCTCA CCATTACTCTGACTCTAAGGTCACGTGTGTGTGGTAGACATCAGCA AGGATGATCCCAGGTCCAGTTCAGCTGGTTTGTAGATGATGTGGAG GTGCACACAGCTCAGACGCAACCCCGGGAGGAGCAGTTCAACAGCA CTTTCCGCTCAGTCAGTGAACCTCCCATCATGCACCAGGACTGGCTC AATGGCAAGGAGTTCAAATGCAGGGTCAACAGTGCAGCTTTCCTGTC

	<p> CCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAACCAAAGGCAGACCGAAGGCT CCACAGGTGTACACCATTCCACCTCCAAGGAGCAGATGGCCAAGG ATAAAGTCAGTCTGACCTGCATGATAACAGACTTCTTCCCTGAAGAC ATTAAGTGTGGAGTGGCAGTGGAAATGGGCAGCCAGCGGAGAACTACA AGAACACTCAGCCCATCATGAACACGAATGGCTCTTACTTCGTCTAC AGCAAGCTCAATGTGCAGAAGAGCAACTGGGAGGCAGGAAATACTT TCACCTGCTCTGTGTTACATGAGGGCCTGCACAACCACCATACTGAG AAGAGCCTCTCCCACTCTCTGGTAAATGA (SEQ ID NO:93) </p>
J512, J517, J518 HC	<p> ATGGGCAGGCTTACTTCTTATTCTGCTACTGATTGTCCCTGCATAT GTCTGTCCCAGGTCCTCTGAAAGAGTCTGGCCCTGGGATATTGCA GCCCTCCAGACCCTCAGTCTGACTTGTTCTTCTCTGGGTTTTACT GAGCACTTATGGTCTGGGTGTAGGTTGGATTTCGTACGCTTCAGGGA AGGGTCTGGACTGGCTGGCCAACATTGGTGGAAATGATGATAAATAC TATAACTCAGCCCTGAAGAGCCGGCTCACAATCTCCAAGGATACCTC CAACAACCAGGTATTCCTCAAGATCTCCAGTGTGGACACTGCAGATA CTGGCACATACTACTGTGCTCAAGTTGATGGTTACTACTGGTACTTCG ATGTCTGGGGGCAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCAGCCAAAACG ACACCACCAAGTGTCTATCCACTGGCCCTGGATCTGCTGCCCAAAC TAACTCCATGGTGACCCTGGGATGCCTGGTCAAGGGCTATTTCCCTG AGCCAGTGACAGTGACCTGGAACCTGGATCCCTGTCCAGCGGTGTG CACACCTCCCAGCTGTCTGGAGTCTGACCTCTACACTCTGAGCAG CTCAGTACTGTCCCTCCAGCCCTCGGCCAGCGAGACCGTCACT GCAACGTTGCCACCCGGCCAGCAGCACCAAAGTGGACAAGAAAAT TGTGCCAGGGATTGTGGTTGTAAGCCTTGCATATGTACAGTCCAG AAGTATCATCTGTCTTCATCTTCCCCCAAAGATCAAGGATGTACTCA TGATCTCCCTGAGCCCCATAGTCACATGTGTGGTGGTGGATGTGAGC GAGGATGACCCAGATGTCCAGATCAGCTGGTTTGTGAACAACGTGGA AGTACACACAGCTCAGACACAAACCCATAGAGAGGATTACAACAGT ACTCTCCGGGTGGTCAGTGCCCTCCCCATCCAGCACCAGGACTGGAT GAGTGGCAAGGAGTTCAAATGCAAGGTCAACAACAAAGACCTCCCA GCGCCCATCGAGAGAACCATCTCAAACCCAAAGGGTCAGTAAGAG CTCCACAGGTATATGTCTTGCCTCCACCAGAAGAAGAGATGACTAAG AAACAGGTCCTCTGACCTGCATGGTCACAGACTTCATGCCTGAAGA CATTACGTGGAGTGGACCAACAACGGGAAAACAGAGCTAAACTAC AAGAACACTGAACCAGTCTGGACTCTGATGGTTCTTACTTCATGTA </p>

	CAGCAAGCTGAGAGTGGAAAAGAAGAACTGGGTGGAAAGAAATAG CTACTCCTGTTTCAGTGGTCCACGAGGGTCTGCACAATCACCACACGA CTAAGAGCTTCTCCCGGACTCCGGGTAAATAGTAA (SEQ ID NO:12)
J513 HC	ATGGGCAGGCTTACTTCTTTCATTCTGCTACTGATTGTCCCTGCATAT GTCCTGTCCCAGGTCACTCTGAAAGAGTCTGGCCCTGGGATATTGCA GCCCTCCAGACCCTCAGTCTGACTTGTCTCTCTCTGGGTTTTCACT GAGCACTTATGGTCTGGGTGTAGGTTGGATTTCGTCAGCCTTCAGGGA AGGGTCTGGGCTGGCTGGCCAACATTTGGTGGAAATGATGATAAATAC TATAACTCAGCCCTGAAGAGCCGGCTACAATCTCCAAGGATACCTC CAACAACCAGGTATTCCTCAAGATCTCCAGTGTGGACACTGCAGATA CTGGCACATACTACTGTGCTCAAGTTGATGGTTACTACTGGTACTTCG ATGTCTGGGGCGCAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCAGCCAAAACG ACACCACCAAGTGTCTATCCACTGGCCCCTGGATCTGCTGCCCAAAC TAACTCCATGGTGACCCTGGGATGCCTGGTCAAGGGCTATTTCCCTG AGCCAGTGACAGTGACCTGGAACCTGGATCCCTGTCCAGCGGTGTG CACACCTTCCAGCTGTCTGGAGTCTGACCTCTACACTCTGAGCAG CTCAGTACTGTCCCTCCAGCCCTCGGCCAGCGAGACCGTCACCT GCAACGTTGCCACCCGCCAGCAGCACCAAGGTGGACAAGAAAAT TGTGCCCAGGATGTGGTTGTAAGCCTTGCATATGTACAGTCCAG AAGTATCATCTGTCTTCATCTTCCCCCAAAGCCCAAGGATGTGCTCA CCATTACTCTGACTC _c TAAGGTCACGTGTGTTGTGGTAGACATCAGCA AGGATGATCCCAGGTCCAGTTCAGCTGGTTTGTAGATGATGTGGAG GTGCACACAGCTCAGACGCAACCCCGGGAGGAGCAGTTCAACAGCA CTTTCCGCTCAGTCAGTGAACCTCCCATCATGCACCAGGACTGGCTC AATGGCAAGGAGTTCAAATGCAGGGTCAACAGTGCAGCTTTCCTCG CCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAACCAAAGGCAGACCGAAGGCT CCACAGGTGTACACCATTCCACCTCCCAAGGAGCAGATGGCCAAGG ATAAAGTCAGTCTGACCTGCATGATAACAGACTTCTTCCCTGAAGAC ATTACTGTGGAGTGGCAGTGGAAATGGGCAGCCAGCGGAGAACTACA AGAACACTCAGCCCATCATGAACACGAATGGCTTACTTCGTCTAC AGCAAGCTCAATGTGCAGAAGAGCAACTGGGAGGCAGGAAATACTT TCACCTGCTCTGTGTTACATGAGGGCCTGCACAACCACCATACTGAG AAGAGCCTCTCCCACTCTCCTGGTAAATGA (SEQ ID NO:94)
J514, J519, J520 HC	ATGGGCAGGCTTACTTCTTTCATTCTGCTACTGATTGTCCCTGCATAT GTCCTGTCCCAGGTCACTCTGAAAGAGTCTGGCCCTGGGATATTGCA

	<p>GCCCTCCAGACCCTCAGTCTGACTTGTTCTCTCTCTGGGTTTTCACT GAGCACTTATGGTCTGGGTGTAGGTTGGATTTCGTCAGCCTTCAGGGA AGGGTCTGGGCTGGCTGGCCAACATTTGGTGGAAATGATGATAAATAC TATAACTCAGCCCTGAAGAGCCGGCTCACAATCTCCAAGGATACCTC CAACAACCAGGTATTCCTCAAGATCTCCAGTGTGGACACTGCAGATA CTGGCACATACTACTGTGCTCAAGTTGATGGTTACTACTGGTACTTCG ATGTCTGGGGCGCAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCAGCCAAAACG ACACCACCAAGTGTCTATCCACTGGCCCCTGGATCTGCTGCCCAAAC TAACTCCATGGTGACCCTGGGATGCCTGGTCAAGGGCTATTTCCCTG AGCCAGTGACAGTGACCTGGAACCTGGATCCCTGTCCAGCGGTGTG CACACCTCCCAGCTGTCCTGGAGTCTGACCTCTACACTCTGAGCAG CTCAGTGACTGTCCCCTCCAGCCCTCGGCCAGCGAGACCGTCACCT GCAACGTTGCCACCCGGCCAGCAGCACCAGGTGGACAAGAAAAT TGTGCCAGGGATTGTGGTTGTAAGCCTTGCATATGTACAGTCCCAG AAGTATCATCTGTCTTCATCTTCCCCCAAAGATCAAGGATGTACTCA TGATCTCCCTGAGCCCCATAGTCACATGTGTGGTGGTGGATGTGAGC GAGGATGACCAGATGTCCAGATCAGCTGGTTTGTGAACAACGTGGA AGTACACACAGCTCAGACACAAACCCATAGAGAGGATTACAACAGT ACTCTCCGGGTGGTCAGTGCCCTCCCATCCAGCACCAGGACTGGAT GAGTGGCAAGGAGTTCAAATGCAAGGTCAACAACAAAGACCTCCCA GCGCCCATCGAGAGAACCATCTCAAACCCAAAGGGTCAGTAAGAG CTCCACAGGTATATGTCTTGCTCCACCAGAAGAAGAGATGACTAAG AAACAGGTCACTCTGACCTGCATGGTTCACAGACTTCATGCCTGAAGA CATTTACGTGGAGTGGACCAACAACGGGAAAACAGAGCTAAACTAC AAGAACACTGAACCAGTCTGGACTCTGATGGTTCTTACTTCATGTA CAGCAAGCTGAGAGTGGAAAAGAAGAACTGGGTGGAAAGAAATAG CTACTCCTGTTTCAGTGGTCCACGAGGGTCTGCACAATCACCACACGA CTAAGAGCTTCTCCCGGACTCCGGGTAAATAGTAA (SEQ ID NO:13)</p>
J515 HC	<p>ATGGGCAGGCTTACTTCTTTCATTCTGCTACTGATTGTCCCTGCATAT GTCCTGTCCCAGGTCACTCTGAAAGAGTCTGGCCCTGGGATATTGCA GTCCTCCCAGACCCTCAGTCTGACTTGTTCTTCTCTGGGTTTTCACT GAGCACTTATGGTCTGGGTGTAGGTTGGATTTCGTCAGCCTTCAGGGA AGGGTCTGGACTGGCTGGCCAACATTTGGTGGAAATGATGATAAATAC TATAACTCAGCCCTGAAGAGCCGGCTCACAATCTCCAAGGATACCTC CAACAACCAGGTATTCCTCAAGATCTCCAGTGTGGACACTGCAGATA</p>

	<p>CTGGCACATACTACTGTGCTCAAGTTGATGGTTACTACTGGTACTTCG ATGTCTGGGGCGCAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCAGCCAAAACG ACACCACCAAGTGTCTATCCACTGGCCCCTGGATCTGCTGCCCAAAC TAACTCCATGGTGACCCTGGGATGCCTGGTCAAGGGCTATTTCCCTG AGCCAGTGACAGTGACCTGGAACCTGGATCCCTGTCCAGCGGTGTG CACACCTTCCCAGCTGTCCTGGAGTCTGACCTCTACACTCTGAGCAG CTCAGTGACTGTCCCCTCCAGCCCTCGGCCAGCGAGACCGTCACT GCAACGTTGCCACCCCGCCAGCAGCACCAAGGTGGACAAGAAAAT TGTGCCAGGGATTGTGGTTGTAAGCCTTGCATATGTACAGTCCCAG AAGTATCATCTGTCTTCATCTTCCCCCAAAGCCCAAGGATGTGCTCA CCATTACTCTGACTCtTAAGGTCACGTGTGTTGTGGTAGACATCAGCA AGGATGATCCCGAGGTCCAGTTCAGCTGGTTTGTAGATGATGTGGAG GTGCACACAGCTCAGACGCAACCCCGGGAGGAGCAGTTCAACAGCA CTTCCGCTCAGTCAGTGAACCTCCCATCATGCACCAGGACTGGCTC AATGGCAAGGAGTTCAAATGCAGGGTCAACAGTGCAGCTTCCCTCG CCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAACCAAAGGCAGACCGAAGGCT CCACAGGTGTACACCATTCCACCTCCCAAGGAGCAGATGGCCAAGG ATAAAGTCAGTCTGACCTGCATGATAACAGACTTCTTCCCTGAAGAC ATTACTGTGGAGTGGCAGTGGAAATGGGCAGCCAGCGGAGAACTACA AGAACACTCAGCCCATCATGAACACGAATGGCTCTTACTTCGTCTAC AGCAAGCTCAATGTGCAGAAGAGCAACTGGGAGGCAGGAAATACTT TCACCTGCTCTGTGTTACATGAGGGCCTGCACAACCACATACTGAG AAGAGCCTCTCCCCTCTCCTGGTAAATGA (SEQ ID NO:95)</p>
<p>J516, J521, J522 HC</p>	<p>ATGGGCAGGCTTACTTCTTCATTCTGCTACTGATTGTCCCTGCATAT GTCCTGTCCCAGGTCACTCTGAAAGAGTCTGGCCCTGGGATATTGCA GTCTCCCAGACCCCTCAGTCTGACTTGTTCTTCTCTGGGTTTTACT GAGCACTTATGGTCTGGGTGTAGGTTGGATTCTGTCAGCCTCAGGGA AGGGTCTGGACTGGCTGGCCAACATTTGGTGGAAATGATGATAAATAC TATAACTCAGCCCTGAAGAGCCGGCTACAATCTCCAAGGATACCTC CAACAACCAGGTATTCTCAAGATCTCCAGTGTGGACACTGCAGATA CTGGCACATACTACTGTGCTCAAGTTGATGGTTACTACTGGTACTTCG ATGTCTGGGGCGCAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCAGCCAAAACG ACACCACCAAGTGTCTATCCACTGGCCCCTGGATCTGCTGCCCAAAC TAACTCCATGGTGACCCTGGGATGCCTGGTCAAGGGCTATTTCCCTG AGCCAGTGACAGTGACCTGGAACCTGGATCCCTGTCCAGCGGTGTG</p>

	<p>CACACCTTCCAGCTGTCCTGGAGTCTGACCTCTACACTCTGAGCAG CTCAGTGA CTGTCCCTCCAGCCCTCGGCCAGCGAGACCGTACCT GCAACGTTGCCACCCGGCCAGCAGCACCAAGGTGGACAAGAAAAT TGTGCCAGGGATTGTGGTTGTAAGCCTTGCATATGTACAGTCCCAG AAGTATCATCTGTCTTCATCTTCCCCCAAAGATCAAGGATGTACTCA TGATCTCCCTGAGCCCCATAGTCACATGTGTGGTGGTGGATGTGAGC GAGGATGACCCAGATGTCCAGATCAGCTGGTTTGTGAACAACGTGGA AGTACACACAGCTCAGACACAAACCCATAGAGAGGATTACAACAGT ACTCTCCGGGTGGTCACTGCCCCTCCCATCCAGCACCAGGACTGGAT GAGTGGCAAGGAGTTCAAATGCAAGGTCAACAACAAAGACCTCCCA GCGCCATCGAGAGAACCATCTCAAACCCAAAGGGTCAGTAAGAG CTCCACAGGTATATGTCTTGCCTCCACCAGAAGAAGAGATGACTAAG AAACAGGTCACTCTGACCTGCATGGTCCAGACTTCATGCCTGAAGA CATTACGTGGAGTGGACCAACAACGGGAAAACAGAGCTAAACTAC AAGAACACTGAACCAGTCTGGACTCTGATGGTTCTTACTTCATGTA CAGCAAGCTGAGAGTGGAAAAGAAGAACTGGGTGGAAAGAAATAG CTACTCCTGTTCACTGGTCCACGAGGGTCTGCACAATCACCACACGA CTAAGAGCTTCTCCCGACTCCGGGTAATAGTAA (SEQ ID NO:14)</p>
<p>J511-J516 LC</p>	<p>ATGAAGTTGCCGTGTTAGGCTGTTGGTGTGATGTTCTGGATTCTGCT TCCGGCAGTGATGTTTTGATGACCCAACTCCACTCTCCCTGCCTGTC AGTCTTGGAGATCAAGCCTCCATCTCTTGCAGATCTAGTCAGAGCAT TGTACATAGTAATAGAAACACCTATTTAGAATGGTACCTGCAGAAAC CAGGCCAGTCTCAAAGCTCCTGATCTACAACGTTTCCAACCGATTTT CTGGGGTCCCAGACAGGTTCACTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTT ACACTCAAGATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATCTGGGAGTTTATTA CTGCTTCAAGGTTACATGTTCCGCTCACGTTCCGGTGTGGGACCAA GCTGGAGCTGAAACGGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCATCTTCC CACCATCCAGTGAGCAGTTGACATCTGGAGGTGCCTCAGTCGTGTGC TTCTTGAACAACCTTCTACCCCAAAGACATCAATGTCAAGTGGAAAGAT TGATGGCAGTGAACGACAAAATGGCGTCTGAACAGTTGGACTGATC AGGACAGCAAAGACAGCACCTACAGCATGAGCAGCACCTCACGTT GACCAAGGACGAGTATGAACGACATAACAGCTATACTGTGAGGCC ACTCACAAGACATCAACTCACCCATTGTCAAGAGCTTCAACAGGAA TGAGTGTTAG (SEQ ID NO:15)</p>

J517, J519 и J521 LC	ATGAAGTTGCCTGTTAGGCTGTTGGTGCTGATGTTCTGGATTCCCTGCT TCCGGCAGTGATGTTTTGATGACCCAAACTCCACTCTCCCTGCCTGTC AGTCTTGAGATCAAGCCTCCATCTCTTGCAGATCTAGTCAGAGCAT TGTACATAGTAATAGAAACACCTATTTAGAATGGTACCTGCAGAAAC CAGGCCAGTCTCCAAGCTCCTGATCTACAACGTTGCCAACCGATTT TCTGGGGTCCCAGACAGGTTCAAGTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTT CACACTCAAGATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATCTGGGAGTTTATT ACTGCTTTCAAGGTTACATGTTCCGCTCACGTTCCGGTGCTGGGACCA AGCTGGAGCTGAAACGGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCATCTTC CCACCATCCAGTGAGCAGTTGACATCTGGAGGTGCCTCAGTCGTGTG CTTCTTGAACAACCTTCTACCCCAAAGACATCAATGTCAAGTGGGAAGA TTGATGGCAGTGAACGACAAAATGGCGTCCTGAACAGTTGGACTGAT CAGGACAGCAAAGACAGCACCTACAGCATGAGCAGCACCCCTCACGT TGACCAAGGACGAGTATGAACGACATAACAGCTATACCTGTGAGGC CACTCACAAGACATCAACTTCACCCATTGTCAAGAGCTTCAACAGGA ATGAGTGTTAG (SEQ ID NO:96)
J518, J520 и J522 LC	ATGAAGTTGCCTGTTAGGCTGTTGGTGCTGATGTTCTGGATTCCCTGCT TCCGGCAGTGATGTTTTGATGACCCAAACTCCACTCTCCCTGCCTGTC AGTCTTGAGATCAAGCCTCCATCTCTTGCAGATCTAGTCAGAGCAT TGTACATAGTAATAGAAACACCTATTTAGAATGGTACCTGCAGAAAC CAGGCCAGTCTCCAAGCTCCTGATCTACCAGTTTTCCAACCGATTTT CTGGGGTCCCAGACAGGTTCAAGTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTT ACACTCAAGATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATCTGGGAGTTTATTA CTGCTTTCAAGGTTACATGTTCCGCTCACGTTCCGGTGCTGGGACCAA GCTGGAGCTGAAACGGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCATCTTCC CACCATCCAGTGAGCAGTTGACATCTGGAGGTGCCTCAGTCGTGTGC TTCTTGAACAACCTTCTACCCCAAAGACATCAATGTCAAGTGGGAAGAT TGATGGCAGTGAACGACAAAATGGCGTCCTGAACAGTTGGACTGATC AGGACAGCAAAGACAGCACCTACAGCATGAGCAGCACCCCTCACGTT GACCAAGGACGAGTATGAACGACATAACAGCTATACCTGTGAGGCC ACTCACAAGACATCAACTTCACCCATTGTCAAGAGCTTCAACAGGAA TGAGTGTTAG (SEQ ID NO:97)

Также в настоящем изобретении предложен полинуклеотид, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую вариabельный домен тяжелой цепи, причем нуклеиновая кислота, кодирующая вариabельный домен тяжелой цепи, содержит кодирующую три CDR последовательность SEQ ID NO: 12. Также в настоящем изобретении предложен полинуклеотид, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую вариabельный домен тяжелой цепи, причем нуклеиновая кислота, кодирующая вариabельный домен тяжелой цепи, содержит кодирующую три CDR последовательность SEQ ID NO: 13. Также в настоящем изобретении предложен полинуклеотид, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую вариabельный домен тяжелой цепи, причем нуклеиновая кислота, кодирующая вариabельный домен тяжелой цепи, содержит кодирующую три CDR последовательность SEQ ID NO: 14. Также в настоящем изобретении предложен полинуклеотид, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую вариabельный домен тяжелой цепи, причем нуклеиновая кислота, кодирующая вариabельный домен тяжелой цепи, содержит кодирующую три CDR последовательность SEQ ID NO: 93. Также в настоящем изобретении предложен полинуклеотид, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую вариabельный домен тяжелой цепи, причем нуклеиновая кислота, кодирующая вариabельный домен тяжелой цепи, содержит кодирующую три CDR последовательность SEQ ID NO: 94. Также в настоящем изобретении предложен полинуклеотид, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую вариabельный домен тяжелой цепи, причем нуклеиновая кислота, кодирующая вариabельный домен тяжелой цепи, содержит кодирующую три CDR последовательность SEQ ID NO: 95.

Также в настоящем изобретении предложен полинуклеотид, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую вариabельный домен легкой цепи, причем нуклеиновая кислота, кодирующая вариabель-

женные в настоящем изобретении, содержат нуклеотидную последовательность или комбинацию нуклеотидных последовательностей, кодирующих антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые иммуноспецифически связываются с В7-Н4 (например, В7-Н4 человека), причем антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит тяжелую цепь, причем тяжелая цепь содержит переменный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, указанную в табл. 3 (например, SEQ ID NO: 6-8), и константную область, содержащую аминокислотную последовательность константной области тяжелой цепи гамма (γ) мыши (например, IgG1 или IgG2a).

В конкретном варианте осуществления полинуклеотид или комбинация полинуклеотидов, предложенные в настоящем изобретении, содержат нуклеотидную последовательность или комбинацию нуклеотидных последовательностей, кодирующих антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые иммуноспецифически связываются с В7-Н4 (например, В7-Н4 человека), причем антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит легкую цепь, причем легкая цепь содержит переменный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, указанную в табл. 4 (например, SEQ ID NO: 9-11), и константную область, содержащую аминокислотную последовательность константной области легкой цепи каппа мыши. В конкретном варианте осуществления в настоящем изобретении предложены полинуклеотиды, содержащие нуклеотидную последовательность, кодирующую антитело к В7-Н4 или его антигенсвязывающий фрагмент, или их домен, обозначенный в настоящем изобретении; см., например, табл. 1.

Также в настоящем изобретении предложены полинуклеотиды, кодирующие антитело к В7-Н4 или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в настоящем изобретении, или их домен, которые являются оптимизированными, например, путем оптимизации кодонов/РНК, замены гетерологичными сигнальными последовательностями, а также путем устранения нестабильных элементов мРНК. Способы для генерирования оптимизированных нуклеиновых кислот, кодирующих антитело к В7-Н4 или его антигенсвязывающий фрагмент или домен (например, тяжелую цепь, легкую цепь, домен VH, или домен VL) для рекомбинантной экспрессии путем внесения изменений в кодоны (например, изменение кодона, кодирующего ту же аминокислоту из-за вырожденности генетического кода) и/или устранения ингибирующих областей в мРНК, может быть осуществлено путем адаптации способов оптимизации описанных, например, патентах США № 5965726, 6174666, 6291664, 6414132 и 6794498 соответственно. Полинуклеотид, кодирующий антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в настоящем изобретении, или его домен может быть получен из нуклеиновой кислоты из подходящего источника (например, гибридомы), используя способы, хорошо известные в данной области техники (например, ПЦР и другие способы молекулярного клонирования). Например, ПЦР-амплификация с использованием синтетических праймеров, которые способны гибридизоваться с 3'- и 5'-концами известной последовательности, может быть выполнена с помощью геномной ДНК, полученной из клеток гибридомы, вырабатывающих представляющее интерес антитело. Такие способы ПЦР-амплификации могут быть использованы для получения нуклеиновых кислот, содержащих последовательность, кодирующую легкую цепь и/или тяжелую цепь антитела или его антигенсвязывающего фрагмента. Такие способы ПЦР-амплификации могут быть использованы для получения нуклеиновых кислот, содержащих последовательность, кодирующую переменную область легкой цепи и/или переменную область тяжелой цепи антитела или ее антигенсвязывающий фрагмент.

Аmplифицированные нуклеиновые кислоты могут быть клонированы в векторы для экспрессии в клетках-хозяевах и для дальнейшего клонирования, например, с получением химерных или гуманизированных антител или их антигенсвязывающих фрагментов. Полинуклеотиды, предложенные в настоящем изобретении, могут быть, например, в форме РНК или в форме ДНК. ДНК включает в себя к ДНК геномную ДНК и синтетическую ДНК, а также ДНК может быть двухцепочечной или одноцепочечной. Будучи одноцепочечной, ДНК может являться кодирующей цепью или не кодирующей (антисмысловой) цепью. В определенных вариантах осуществления полинуклеотид представляет собой кДНК или ДНК, в которой отсутствует один или более эндогенных интронов. В определенных вариантах осуществления полинуклеотид представляет собой не встречающийся в природе полинуклеотид. В определенных вариантах осуществления полинуклеотид продуцируется рекомбинантно. В определенных вариантах осуществления полинуклеотиды являются изолированными. В определенных вариантах осуществления полинуклеотиды являются по существу чистыми. В определенных вариантах осуществления полинуклеотид очищают от природных компонентов.

Клетки и векторы.

В определенных аспектах в настоящем изобретении предложены векторы (например, векторы экспрессии), содержащие полинуклеотиды, содержащие нуклеотидные последовательности, кодирующие антитела к В7-Н4 и их антигенсвязывающие фрагменты или их домен, для рекомбинантной экспрессии в клетках-хозяевах, предпочтительно в клетках млекопитающих. Также в настоящем изобретении предложены клетки, например, клетки-хозяева, содержащие такие векторы для рекомбинантной экспрессии антител к В7-Н4 или их антигенсвязывающих фрагментов, описанных в настоящем изобретении. В конкретном аспекте в настоящем изобретении предложены способы получения антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, описанных в настоящем изобретении, включающие в себя экспрессию такого

антитела или его антигенсвязывающего фрагмента в клетке-хозяине.

В определенных вариантах осуществления рекомбинантная экспрессия антитела, или его антигенсвязывающего фрагмента, или его домена, описанных в настоящем изобретении (например, тяжелой или легкой цепи, описанной в настоящем изобретении), которые специфически связываются с B7-H4 (например, B7-H4 человека), включает в себя конструирование вектора экспрессии, содержащего полинуклеотид, который кодирует антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, или его домен. После получения полинуклеотида, кодирующего антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, или его домен (например, вариабельный домен тяжелой или легкой цепи), описанные в настоящем изобретении, вектор для создания антитела или его антигенсвязывающего фрагмента может быть получен с помощью технологии рекомбинантной ДНК, используя способы, хорошо известные в данной области техники. Таким образом, в настоящем изобретении описаны способы получения белка путем экспрессии полинуклеотида, содержащего антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, или его домен (например, легкую цепь или тяжелую цепь), кодирующие нуклеотидную последовательность. Способы, которые хорошо известны специалистам в данной области техники, могут быть использованы для конструирования векторов экспрессии, содержащих антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, или его домен (например, легкую цепь или тяжелую цепь), кодирующие последовательности, и соответствующие сигналы контроля транскрипции и трансляции. Эти способы включают в себя, например, методы рекомбинантной ДНК *in vitro*, методы синтеза и генетическую рекомбинацию *in vivo*. Также предложены реплицируемые векторы, содержащие нуклеотидную последовательность, кодирующую антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в настоящем изобретении, тяжелую или легкую цепь, вариабельный домен тяжелой или легкой цепи либо CDR тяжелой или легкой цепи, функционально связанные с промотором. Такие векторы, например, могут содержать нуклеотидную последовательность, кодирующую константную область антитела или его антигенсвязывающего фрагмента (см., например, международные публикации № WO 86/05807 и WO 89/01036; а также патент США № 5122464), а вариабельные домены антитела или его антигенсвязывающего фрагмента могут быть клонированы в такой вектор для экспрессии всей тяжелой цепи, всей легкой цепи или как всей тяжелой, так и всей легкой цепей.

Вектор экспрессии может быть перенесен в клетку (например, клетку-хозяина) с помощью обычных методик, и полученные клетки могут быть затем культивированы с помощью обычных методов для получения антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, описанных в настоящем изобретении (например, антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, содержащих шесть CDR из SEQ ID NO: 22-25, 26, 27 или 28, и 29, область VH из SEQ ID NO: 6-8, область VL из SEQ ID NO: 9-11, область VH из SEQ ID NO: 6-8 и область VL из SEQ ID NO: 9-11, тяжелую цепь из SEQ ID NO: 16-18, 89, 90 или 91, легкую цепь из SEQ ID NO: 19, 30, 31, или тяжелую цепь из SEQ ID NO: 16-18, 89, 90 или 91 и легкую цепь из SEQ ID NO: 19, 30 или 31). Таким образом, в настоящем изобретении предложены клетки-хозяева, содержащие полинуклеотид, кодирующий антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в настоящем изобретении, например, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие шесть CDR из SEQ ID NO: 22-25, 26, 27 или 28, и 29, область из VH SEQ ID NO: 6-8, область VL из SEQ ID NO: 9-11, область VH из SEQ ID NO: 6-8 и область VL из SEQ ID NO: 9-11, тяжелую цепь из SEQ ID NO: 16-18, 89, 90 или 91, легкую цепь из SEQ ID NO: 19, 30, 31, или тяжелую цепь из SEQ ID NO: 16-18, 89, 90 или 91 и легкую цепь из SEQ ID NO: 19, 30 или 31, функционально связанные с промотором для экспрессии таких последовательностей в клетке-хозяине. В определенных вариантах осуществления для экспрессии двухцепочечных антител или их антигенсвязывающих фрагментов могут быть совместно экспрессированы векторы, кодирующие как тяжелую, так и легкую цепи, индивидуально, в клетке-хозяине для экспрессии всего иммуноглобулина, как описано ниже. В определенных вариантах осуществления клетка-хозяин содержит вектор, содержащий полинуклеотид, кодирующий тяжелую цепь и легкую цепь антитела, описанного в настоящем изобретении, или их домен. В конкретных вариантах осуществления клетка-хозяин содержит два разных вектора, причем первый вектор содержит полинуклеотид, кодирующий тяжелую цепь или вариабельную область тяжелой цепи антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, описанного в настоящем изобретении, а второй вектор содержит полинуклеотид, кодирующий легкую цепь или вариабельную область легкой цепи антитела, описанного в настоящем изобретении (например, антитела, содержащего шесть CDR из SEQ ID NO: 22-25, 26, 27 или 28, и 29), или их домен. В других вариантах осуществления первая клетка-хозяин содержит первый вектор, содержащий полинуклеотид, кодирующий тяжелую цепь или вариабельную область тяжелой цепи антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, описанного в настоящем изобретении, а вторая клетка-хозяин содержит второй вектор, содержащий полинуклеотид, кодирующий легкую цепь или вариабельную область легкой цепи антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, описанного в настоящем изобретении (например, антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, содержащего шесть CDR из SEQ ID NO: 22-25, 26, 27 или 28 и 29). В конкретных вариантах осуществления тяжелая цепь/вариабельная область тяжелой цепи, экспрессируемая первой клеткой, связана с легкой цепью/вариабельной областью легкой цепи второй клетки с образованием антитела к B7-H4 или его антигенсвязывающего фрагмента, описанного в настоящем изобретении (например, антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, содержащего шесть CDR из SEQ ID NO: 22-25, 26, 27 или 28 и 29). В опре-

деленных вариантах осуществления в настоящем изобретении предложена популяция клеток-хозяев, содержащая такую первую клетку-хозяина и такую вторую клетку-хозяина.

В конкретном варианте осуществления в настоящем изобретении предложена популяция векторов, содержащая первый вектор, содержащий полинуклеотид, кодирующий легкую цепь/вариабельную область легкой цепи антитела к В7-Н4 или его антигенсвязывающего фрагмента, описанного в настоящем изобретении, и второй вектор, содержащий полинуклеотид, кодирующий тяжелую цепь/вариабельную область тяжелой цепи антитела к В7-Н4 или его антигенсвязывающего фрагмента, описанного в настоящем изобретении (например, антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, содержащего CDR из SEQ ID NO: 22-25, 26, 27 или 28 и 29). В альтернативном варианте может использоваться один вектор, который кодирует и способен экспрессировать полипептиды тяжелой и легкой цепей.

Для экспрессии антител и их антигенсвязывающих фрагментов, описанных в настоящем изобретении (например, антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, содержащего CDR из SEQ ID NO: 22-25, 26, 27 или 28 и 29), можно использовать множество векторных систем экспрессии хозяина (см., например, патент США № 5807715). Такие системы экспрессии хозяина являются носителями, с помощью которых могут быть получены и затем очищены представляющие интерес кодирующие последовательности, а также они представляют клетки, которые при трансформации или трансфекции соответствующими нуклеотидными кодирующими последовательностями могут экспрессировать антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в настоящем изобретении, *in situ*. Они включают в себя без ограничения микроорганизмы, такие как бактерии (например, *E. coli* и *B. Subtilis*), трансформированные векторами экспрессии рекомбинантной ДНК бактериофага, плазмидной ДНК или космидной ДНК, содержащими последовательности, кодирующие антитела; дрожжи (например, *Saccharomyces Pichia*), трансформированные рекомбинантными дрожжевыми векторами экспрессии, содержащими последовательности, кодирующие антитела; системы клеток насекомых, инфицированные рекомбинантными векторами экспрессии вирусов (например, бакуловируса), содержащие последовательности, кодирующие антитела; системы растительных клеток (например, зеленые водоросли, такие как *Chlamydomonas reinhardtii*), инфицированные рекомбинантными векторами экспрессии вирусов (например, вирус мозаики цветной капусты, CaMV; вирус табачной мозаики, TMV) или трансформированные рекомбинантными плазмидными векторами экспрессии (например, Ti-плазида), содержащими последовательности, кодирующие антитела; или клеточные системы млекопитающих (например, клетки COS (например, COS1 или COS), CHO, ВНК, MDCK, HEK 293, NSO, PER.C6, VERO, CRL7030, HsS78Bst, HeLa и NIH 3T3, HEK-293T, HepG2, SP210, R1.1, B-W, L-M, BSCI, BSC40, YB/20 и BMT10), несущие рекомбинантные экспрессионные конструкции, содержащие промоторы, полученные из генома клеток млекопитающих (например, металлотионеиновый промотор) или из вирусов млекопитающих (например, поздний промотор аденовируса; промотор вируса коровьей оспы 7,5K). В конкретном варианте осуществления клетками для экспрессии антител или их антигенсвязывающих фрагментов, описанных в настоящем изобретении (например, антител или их антигенсвязывающих фрагментов, содержащих CDR из SEQ ID NO: 22-25, 26, 27 или 28 и 29), являются клетки CHO, например, клетки CHO из CHO GS System™ (Lonza). В конкретном варианте осуществления клетками для экспрессии антител, описанных в настоящем изобретении, являются клетки человека, например, клеточные линии человека. В конкретном варианте осуществления вектор экспрессии млекопитающих представляет собой рOptiVEC™ или pcDNA3.3. В конкретном варианте осуществления бактериальные клетки, такие как *Escherichia coli*, или эукариотические клетки (например, клетки млекопитающих), особенно для экспрессии целой молекулы рекомбинантного антитела, используются для экспрессии молекулы рекомбинантного антитела. Например, клетки млекопитающих, такие как клетки яичника китайского хомяка (CHO) в сочетании с вектором, таким как основной элемент промотора промежуточного раннего гена из цитомегаловируса человека, являются эффективной системой экспрессии для антител (Foelking M.K. & Hofstetter H. (1986), *Gene*, 45:101-105; и Cockett M.I. et al. (1990), *Biotechnology*, 8:662-667). В определенных вариантах осуществления антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, описанные в настоящем изобретении, вырабатываются клетками CHO или клетками NS0.

В некоторых вариантах осуществления сигнальный пептид используется при конструировании вектора, содержащего область VH или VL антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, предложенного в настоящем изобретении. В одном конкретном варианте осуществления нуклеотидная последовательность и аминокислотная последовательность сигнального пептида, используемого для конструирования вектора экспрессии для последовательности VH, представлены в SEQ ID NO: 2 и 4 соответственно. В другом конкретном варианте осуществления нуклеотидная последовательность и аминокислотная последовательность сигнального пептида, используемого для конструирования вектора экспрессии для последовательности VL, представлены в SEQ ID NO: 3 и 5 соответственно.

В одном конкретном варианте осуществления нуклеотидная последовательность сигнального пептида VH представлена в виде ATGGGC AGGCTT ACTTCT TCATTC CTGCTA CTGATT GTCCCT GCATAT GTCCTG TCC (SEQ ID NO: 2). В другом конкретном варианте осуществления аминокислотная последовательность сигнального пептида VH представлена в виде MGRLTSSFLLIVPAYVLS (SEQ ID NO: 4). В одном конкретном варианте осуществления нуклеотидная последовательность сигнального пептида VL

представлена в виде ATGAAG TTGCCT GTTAGG CTGTTG GTGCTG ATGTTT TGGATT CCTGCT TCCGGC AGT (SEQ ID NO: 3). В другом конкретном варианте осуществления аминокислотная последовательность сигнального пептида VL представлена в виде MKLPVRLLVLMFWIPASGS (SEQ ID NO: 5). Кроме того, может быть выбран штамм клетки-хозяина, который модулирует экспрессию вставленных последовательностей или модифицирует и обрабатывает генный продукт конкретным желаемым образом. Такие модификации (например, гликозилирование) и процессинг (например, расщепление) белковых продуктов могут способствовать функции белка. С этой целью могут быть использованы эукариотические клетки-хозяева, которые обладают клеточным механизмом для правильного процессинга первичного транскрипта, гликозилирования и фосфорилирования генного продукта. Такие клетки-хозяева млекопитающих включают в себя без ограничения клетки CHO, VERO, BHK, HeLa, MDCK, HEK 293, NIH 3T3, W138, BT483, Hs578T, HTB2, BT20 и T47D, NSO (клеточная линия миеломы мышей, которая эндогенно не вырабатывает никаких цепей иммуноглобулина), CRL7030, COS (например, COS1 или COS), PER.C6, VERO, HsS78Bst, HEK-293T, HepG2, SP210, R1.1, B-W, L-M, BSCI, BSC40, YB/20, BMT10 и HsS78Bst. В определенных вариантах осуществления антитела к B7-H4, описанные в настоящем изобретении (например, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие CDR SEQ ID NO: 22-25, 26, 27 или 28 и 29), вырабатываются в клетках млекопитающих, таких как клетки CHO.

В определенных вариантах осуществления антитела к B7-H4, описанные в настоящем изобретении (например, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие CDR из SEQ ID NO: 22-25, 26, 27 или 28 и 29), вырабатываются в клетках Potelligent® CHOK1SV.

После того как антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в настоящем изобретении, были выработаны путем рекомбинантной экспрессии, они могут быть очищены любым способом, известным в данной области техники для очистки молекулы иммуноглобулина, например, с помощью хроматографии (например, ионный обмен, аффинность, в частности, по аффинности к специфическому антигену после белка А, и колоночная хроматография с распределением по размерам); центрифугирования, дифференциальной растворимости или любой другой стандартной методики очистки белков. Более того, антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, описанные в настоящем изобретении, могут быть слиты с гетерологичными полипептидными последовательностями, описанными в настоящем изобретении или известными в данной области техники для облегчения очистки.

В конкретных вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в настоящем изобретении, выделяют или очищают. Обычно изолированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляет собой такое, которое по существу не содержит других антител или их антигенсвязывающих фрагментов с антигенной специфичностью, отличной от выделенного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента. Например, в конкретном варианте осуществления состав антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, описанный в настоящем изобретении, по существу не содержит клеточного материала и/или химических предшественников.

Применения и способы.

Применения для обнаружения и диагностики.

Антитело к B7-H4 или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в настоящем изобретении (см., например, раздел 5.2), могут использоваться для количественного определения уровней белка B7-H4 в биологическом образце, используя способы, известные специалистам в данной области техники, включая иммуноанализы, такие как иммуноферментный анализ (ИФА), сортировка клеток с активированной флуоресценцией (FACS), иммуногистохимия (ИГХ), иммунопреципитация и вестерн-блоттинг.

Подходящие метки для анализа антител известны в данной области техники и включают в себя ферментные метки, такие как пероксидаза хрена (HRP) и глюкозооксидаза; радиоизотопы, такие как йод (^{125}I , ^{121}I), углерод (^{14}C), сера (^{35}S), тритий (^3H), индий (^{121}In) и технеций (^{99}Tc); гаптены, флуоресцентные метки, фосфоресцирующие молекулы, хемилуминесцентные молекулы, хромофоры, люминесцентные молекулы, фотоаффинные молекулы, окрашенные частицы и/или лиганды, такие как биотин. В некоторых вариантах осуществления фермент (ферментная метка) будет генерировать окрашенный продукт при контакте с хромогенным субстратом. Примеры подходящих ферментов включают в себя уреазу, щелочную фосфатазу, пероксидазу водорода (хрена) и/или глюкозооксидазу.

Такие метки могут использоваться для мечения антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, описанных в настоящем изобретении. Альтернативно второе антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые распознают антитело к B7-H4 или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в настоящем изобретении, могут быть помечены и использованы в комбинации с антителом к B7-H4 или его антигенсвязывающим фрагментом для обнаружения уровней белка B7-H4. В некоторых вариантах осуществления такое вторичное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, например, антитело мыши или грызуна, помечены ферментом (например, пероксидазой хрена) и обнаруживаются с помощью субстрата фермента (например, 3,3'-диаминобензидина (DAB)).

В данной области техники известно несколько способов для присоединения или конъюгации антитела с его фрагментом конъюгата. Некоторые способы присоединения включают в себя применение комплекса хелатов металлов с использованием, например, органического хелатирующего агента, такого как ангидрид диэтилентриаминпентауксусной кислоты (DTPA); этилентриаминтетрауксусная кислота;

N-хлор-п-толуолсульфонамид и/или тетрахлор-3 α -6 α -дифенилгликоурил-3, присоединенных к антителу (патенты США № 4472509 и 4938948, каждый из которых включен в настоящий документ посредством ссылки). Моноклональные антитела также могут реагировать с ферментом в присутствии сочетающего агента, такого как глутаральдегид или периодат. Конъюгаты с флуоресцеиновыми маркерами получают в присутствии таких сочетающих агентов или путем реакции с изотиоцианатом. В патенте США № 4938948 визуализация опухолей молочных желез, например, достигается путем использования моноклональных антител, а обнаруживаемые фрагменты для визуализации связываются с антителом с помощью линкеров, таких как метил-п-гидроксibenзимидат или N-сукцинимидил-3-(4-гидроксифенил)пропионат.

В других вариантах осуществления обсуждается дериватизация иммуноглобулинов селективным введением сульфгидрильных групп в Fc-область иммуноглобулина с использованием условий реакции, которые не изменяют участок связывания антитела. Описано, что конъюгаты антител, получаемые в соответствии с этой методологией, проявляют улучшенную долговечность, специфичность и чувствительность (патент США № 5196066, включенный в настоящий документ посредством ссылки). Сайт-специфическое присоединение эффекторных или репортерных молекул, где репортерную или эффекторную молекулу конъюгируют с углеводным остатком в Fc-области, также было описано в литературе (O'Shannessy et al., *Biotecnol. Appl. Biochem.*, 1987 Dec, 9(6):488-96). Проведение анализа на уровень экспрессии белка V7-N4 предназначено для включения качественного или количественного измерения или оценки уровня белка V7-N4 в первом биологическом образце прямо (например, путем определения или оценки абсолютного уровня белка) или косвенно (например, путем сравнения с уровнем белка V7-N4 во втором биологическом образце или эталонном образце). Уровень экспрессии полипептида V7-N4 в первом биологическом образце можно измерить или оценить и сравнить с эталонным уровнем белка V7-N4, при этом эталон определяют на основании второго непораженного биологического образца или определяют путем усреднения уровней в популяции непораженных образцов. Как будет понятно специалистам в данной области техники, как только будет известен "эталонный" уровень полипептида V7-N4, его можно систематически использовать в качестве эталона для сравнения. Термин "биологический образец" в контексте настоящего изобретения относится к любому биологическому образцу, полученному от субъекта, из клеточной линии, ткани или другого источника клеток, потенциально экспрессирующих V7-N4. Неограничивающие источники биологического образца для использования в настоящем изобретении включают в себя, например, солидную ткань, биопсию, асциты, аспираты, экстракты жидкости, кровь (включая циркулирующие опухолевые клетки), плазму, сыворотку, спинномозговую жидкость, лимфатическую жидкость, внешние срезы кожи, дыхательных путей, кишечника и мочеполового тракта, слезы, слюну, молоко, опухоли, органы, клеточные культуры и/или компоненты клеточных культур. Способы получения образцов биопсии тканей и жидкостей организма у животных (например, людей) хорошо известны в данной области техники. Примеры способов получения циркулирующих опухолевых клеток (ЦОК) описаны в Ferreira et al., *Molecular Oncology*, 10:374-394, которая в полном объеме включена в настоящий документ посредством ссылки. Например, ЦОК могут быть обогащены из образца крови, используя стратегии на основе иммуноаффинности или биофизики. ЦОК также могут быть получены, используя методы прямой визуализации. Примеры способов получения и обработки образцов биопсии, которые могут использоваться в иммуногистохимических (ИГХ) анализах, представлены в настоящем изобретении в примере 4.

Антитело к V7-N4, описанное в настоящем изобретении, может использоваться в диагностических применениях, включая применения *in vitro*, которые хорошо известны и являются стандартными для специалиста, а также основаны на настоящем описании. Диагностические анализы и наборы для оценки V7-N4 *in vitro* могут использоваться для изучения образцов пациента, включая образцы, известные как имеющие рак или подозрение на рак. Такой тип прогностического и диагностического мониторинга и оценки применяется на практике, например, используя антитела к белку HER2 при раке молочной железы (HerceptinTM, Dako), где анализ применяется для оценки пациента на предмет терапии антителами с использованием герцептина®.

Антитела к V7-N4 и их антигенсвязывающие фрагменты, описанные в настоящем изобретении, могут нести обнаруживаемую или функциональную метку. В случае использования флуоресцентных меток доступная в настоящее время микроскопия и сортировка флуоресцентно-активированных клеток (FACS), или комбинация двух способов, известных в данной области техники, могут применяться для идентификации и количественного определения членов специфического связывания. Антитела к V7-N4 или их антигенсвязывающие фрагменты, описанные в настоящем изобретении, могут нести флуоресцентную метку. Примеры флуоресцентных меток включают в себя, например, реактивные и конъюгированные зонды, например, аминокумарин, флуоресцеин и техасский красный, красители Alexa Fluor, красители Cy и красители DyLight. Антитело к V7-N4 может нести радиоактивную метку, такую как изотопы ³H, ¹⁴C, ³²P, ³⁵S, ³⁶Cl, ⁵¹Cr, ⁵⁷Co, ⁵⁸Co, ⁵⁹Fe, ⁶⁷Cu, ⁹⁰Y, ⁹⁹Tc, ¹¹¹In, ¹¹⁷Lu, ¹²¹I, ¹²⁴I, ¹²⁵I, ¹³¹I, ¹⁹⁸Au, ²¹¹At, ²¹³Bi, ²²⁵Ac и ¹⁸⁶Re. В случае использования радиоактивных меток доступные в настоящее время способы подсчета, известные в данной области техники, могут использоваться для идентификации и количественного определения специфического связывания антитела к V7-N4 или антигенсвязывающего фрагмента с V7-N4

(например, В7-Н4 человека). В случае когда метка представляет собой фермент, обнаружение может выполняться с помощью любого метода, применяемого в настоящее время в данной области техники: колориметрического, спектрофотометрического, флуороспектрофотометрического, амперометрического или газометрического метода. Этого можно достичь путем приведения в контакт образца или контрольного образца с антителом к В7-Н4 или его антигенсвязывающим фрагментом в условиях, которые позволяют образовать комплекс между антителом или его антигенсвязывающим фрагментом и В7-Н4. Все комплексы, образованные между антителом или его антигенсвязывающим фрагментом и В7-Н4, обнаруживаются и сравниваются в образце и контрольном образце. В свете специфического связывания антител или их антигенсвязывающих фрагментов, описанных в настоящем изобретении, с В7-Н4 антитела или их антигенсвязывающие фрагменты могут использоваться для специфического обнаружения экспрессии В7-Н4, например, в цельных клетках, на клеточных мембранах или в цитоплазме. Антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, описанные в настоящем изобретении, также могут использоваться для очистки В7-Н4 путем иммуноаффинной очистки.

В настоящее изобретение также включена система анализа, которая может быть получена в виде набора для анализа для количественного определения степени присутствия, например, В7-Н4. Система или набор для анализа могут содержать меченный компонент, например, меченное антитело или антигенсвязывающий фрагмент, а также один или более дополнительных иммунохимических реагентов. Дополнительную информацию о наборах см., например, в разделе 5.4.3 ниже.

В некоторых аспектах способы обнаружения В7-Н4 в образце *in vitro* включают в себя приведение в контакт образца с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, как описано в настоящем изобретении. В некоторых аспектах в настоящем изобретении предложено использование антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, как описано в настоящем изобретении, для обнаружения В7-Н4 в образце *in vitro*. В одном аспекте в настоящем изобретении предложено антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в настоящем изобретении, для использования с целью обнаружения В7-Н4 у субъекта или в образце, полученном от субъекта. В одном аспекте в настоящем изобретении предложено антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в настоящем изобретении, для использования в целях диагностики. В одном варианте осуществления антитело содержит обнаруживаемую метку. В одном предпочтительном варианте осуществления В7-Н4 представляет собой В7-Н4 человека. В одном предпочтительном варианте осуществления субъект представляет собой человека. В дополнительном варианте осуществления субъект, например, субъект-человек, имеет рак. В некоторых аспектах настоящее изобретение рассматривает способы иммунологического анализа для связывания и обнаружения В7-Н4. Антитела, полученные в соответствии с настоящим изобретением, могут применяться для обнаружения В7-Н4. Некоторые способы иммунологического анализа включают в себя, помимо прочего, иммуногистохимию, проточную цитометрию, иммуноферментный анализ (ИФА), радиоиммунологический анализ (RIA), иммунорадиометрический анализ, иммунофлуоресцентный анализ, хемилуминесцентный анализ, биолюминесцентный анализ и вестерн-блоттинг. Этапы различных способов иммунологического анализа были описаны в научной литературе, как, например, в Doolittle M.H., Ben-Zeev O., *Methods Mol. Biol.*, 1999, 109:215-37; Gulbis B., Galand P., *Hum Pathol.*, 1993 Dec, 24(12):1271-85; и De Jager R. et al., *Semin. Nucl. Med.*, 1993 Apr, 23(2):165-79, каждая из которых включена в настоящий документ путем ссылки.

В общем способы иммунного связывания включают в себя получение образца, например образца, поддающегося в наличии В7-Н4, и приведение в контакт этого образца с первым антителом к В7-Н4 в соответствии с настоящим изобретением в условиях, эффективных для образования иммунных комплексов.

Приведение в контакт выбранного биологического образца с антителом в эффективных условиях и в течение периода времени, достаточного для образования иммунных комплексов (первичных иммунных комплексов), как правило, включает в себя добавление в образец композиции антител и инкубацию смеси в течение периода времени, достаточного для образования антителами иммунных комплексов, т.е. для специфического связывания, с любыми присутствующими В7-Н4. После этого композицию образца с антителами, такую как срез ткани, планшет для ИФА, дот-блот или вестерн-блот, обычно промывают для удаления любых неспецифически связанных антител, позволяя обнаруживать только те антитела, которые специфически связаны с первичными иммунными комплексами.

В общем обнаружение образования иммунных комплексов хорошо известно в данной области техники и может достигаться путем применения различных подходов. Такие способы обычно основаны на обнаружении метки или маркера, таких как любая из радиоактивной, флуоресцентной, биологической или ферментативной меток. Патенты США, касающиеся использования таких меток, включают в себя патенты США № 3817837, 3850752, 3939350, 3996345, 4277437, 4275149 и 4366241, каждый из которых включен в настоящий документ посредством ссылки. В некоторых вариантах осуществления вторичный связывающий агент, такой как вторичное антитело и/или система связывания лигандов биотина/авидина, может использоваться в соответствии с методологиями, известными в данной области техники.

В некоторых вариантах осуществления первое антитело, которое связывается в пределах первичных иммунных комплексов, может быть обнаружено при помощи второго связывающего агента, обладающего аффинностью связывания с антителом. В таких случаях второй связывающий агент может быть связан

с обнаруживаемой меткой. Второй связывающий агент часто сам по себе является антителом, которое, таким образом, может быть названо "вторичным" антителом. Первичные иммунные комплексы контактируют с меченым вторичным связывающим агентом, или антителом, в эффективных условиях и в течение периода времени, достаточного для образования вторичных иммунных комплексов. Вторичные иммунные комплексы затем, как правило, промывают для удаления любых неспецифически связанных меченных вторичных антител или лигандов, а затем обнаруживают оставшуюся метку во вторичных иммунных комплексах.

Дополнительные способы включают в себя обнаружение первичных иммунных комплексов с помощью двухэтапного подхода. Второй связывающий агент, такой как антитело, который обладает аффинностью связывания с антителом, используется для образования вторичных иммунных комплексов, как было описано выше. После промывания вторичные иммунные комплексы приводят в контакт с третьим связывающим агентом или антителом, которые обладают аффинностью связывания со вторым антителом, опять-таки в эффективных условиях и в течение периода времени, достаточного для образования иммунных комплексов (третичных иммунных комплексов). Третий лиганд или антитело связаны с обнаруживаемой меткой, позволяя обнаруживать третичные иммунные комплексы, образованные таким образом. Такая система может обеспечить амплификацию сигнала, если это желательно.

В другом варианте осуществления биотинилированное моноклональное или поликлональное антитело используется для обнаружения антигенов-мишеней, а антитело второго этапа затем используется для обнаружения биотина, присоединенного к комплексу антитела. В этом способе образец, подлежащий анализу, сначала инкубируют в растворе, содержащем антитело первого этапа. В случае присутствия антигена-мишени некоторые антитела специфически связываются с антигеном для образования комплекса биотинилированного антитела с антигеном. Комплекс антитела с антигеном затем амплифицируют путем инкубации в последующих растворах стрептавидина (или авидина) и биотинилированной ДНК, и/или комплементарной биотинилированной ДНК, при этом на каждом этапе к комплексу антитела с антигеном добавляются дополнительные сайты биотина. Этапы амплификации повторяют до тех пор, пока не будет достигнут подходящий уровень амплификации, после чего образец инкубируют в растворе, содержащем антитело второго этапа против биотина. Такое антитело второго этапа является меченым, например, ферментом, который может использоваться для обнаружения присутствия комплекса антитела с антигеном с помощью гистоэнзимологии, используя хромогенный субстрат. При подходящей амплификации можно получить конъюгат, который будет макроскопически видимым.

В одном варианте осуществления для иммунологического обнаружения применяется иммуногистохимия (ИГХ). Используя ИГХ, обнаружение в образце В7-Н4 достигается путем нацеливания на образец связывающего агента, например, антитела к В7-Н4 или его антигенсвязывающего фрагмента. Связывающий агент может быть связан, прямо или косвенно, с обнаруживаемой меткой или может обнаруживаться с помощью другого связывающего агента, который прямо или косвенно связан с обнаруживаемой меткой. В одном варианте осуществления в ИГХ анализе используется 3,3'-диаминобензидин (DAB) для обнаружения первичного антитела, связанного с В7-Н4. В одном варианте осуществления концентрация антитела к В7-Н4 или его антигенсвязывающего фрагмента в ИГХ анализе составляет от около 1 мкг/мл до около 50 мкг/мл. В одном варианте осуществления концентрация антитела к В7-Н4 или его антигенсвязывающего фрагмента в ИГХ анализе составляет от около 1 мкг/мл до около 20 мкг/мл. В одном варианте осуществления концентрация антитела к В7-Н4 или его антигенсвязывающего фрагмента в ИГХ анализе составляет около 10 мкг/мл. ИГХ может выполняться на клетках, клеточном осадке, тканях, препаратах крови, плазме, сыворотке или лимфатической жидкости и т.д. В некоторых вариантах осуществления образцы представляют собой фиксированные образцы. В некоторых вариантах осуществления образцы представляют собой погруженные в парафин образцы. В некоторых вариантах осуществления образцы представляют собой фиксированные формалином и погруженные в парафин образцы.

В одном варианте осуществления для иммунологического обнаружения применяется проточная цитометрия. Таким образом, например, число связанных антител на одну клетку (antibodies bound per cell - ABC) можно оценить с помощью проточной цитометрии.

Терапевтические применения и способы.

В одном аспекте в настоящем изобретении представлены способы лечения рака, экспрессирующего В7-Н4, у субъекта, включающие в себя введение субъекту терапевтического антитела к В7-Н4 или его антигенсвязывающего фрагмента, причем экспрессия В7-Н4 была обнаружена в образце, полученном от этого субъекта, используя антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, предложенные в настоящем изобретении. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает в себя обнаружение В7-Н4 в образце, полученном от субъекта.

В определенных вариантах осуществления представленный в настоящем изобретении рак выбран из группы, состоящей из: рака молочной железы (например, тройной негативный рак молочной железы, положительный на рецептор гормона (HR) рак молочной железы, рак протоков), рака эндометрия, рака яичника, немелкоклеточного рака легкого (например, плоскоклеточный рак), рака поджелудочной железы, рака щитовидной железы, рака почки (например, почечно-клеточный рак) и рака мочевого пузыря (например, уротелиально-клеточный рак).

Терапевтические антитела к В7-Н4 или их антигенсвязывающие фрагменты включают в себя, например, 20502 и 22213, а также их антигенсвязывающие фрагменты. Аминокислотные и нуклеотидные последовательности антител 20502 и 22213 представлены в табл. 9 и 10.

Таблица 9

Аминокислотные и нуклеотидные последовательности антитела 20502	
Домен антитела (AA/N)	Последовательность (SEQ ID NO)
VH CDR1 (AA)	GSIKSGSYW (SEQ ID NO:58)
VH CDR2 (AA)	NIYYSGSTYYNPSLRS (SEQ ID NO:59)
VH CDR3 (AA)	AREGSYPNQFDP (SEQ ID NO:60)
VL CDR1 (AA)	RASQSVSSNLA (SEQ ID NO:61)
VL CDR2 (AA)	GASTRAT (SEQ ID NO:62)
VL CDR3 (AA)	QQYHSFPFT (SEQ ID NO:63)
VH (AA)	QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSIKSGSYWGWIRQPPGKGLEWIGNIYSGSTYYNPSLRSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAREGSYPNQFDPWGQGLVTVSS (SEQ ID NO:64)
VL (AA)	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSNLAWYQQKPGQAPRLLIYGASTRATGIPARFSGSGSGTEFTLTISSLQSEDFAVYYCQQYHSFPFTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:65)
VH FR1 (AA)	QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSG (SEQ ID NO:66)
VH FR2 (AA)	WIRQPPGKGLEWIG (SEQ ID NO:67)
VH FR3 (AA)	RVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYC (SEQ ID NO:68)
VH FR4 (AA)	WGQGLVTVSS (SEQ ID NO:69)
VL FR1 (AA)	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSC (SEQ ID NO:70)
VL FR2 (AA)	WYQQKPGQAPRLLIY (SEQ ID NO:71)
VL FR3 (AA)	GIPARFSGSGSGTEFTLTISSLQSEDFAVYYC (SEQ ID NO:72)
VL FR4 (AA)	FGGGTKVEIK (SEQ ID NO:73)
Тяжелая цепь (AA)	QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSIKSGSYWGWIRQPPGKGLEWIGNIYSGSTYYNPSLRSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAREGSYPNQFDPWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPPSSLTGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPETVTCVVVDVSDPEVDFKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL

	TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:74)
Легкая цепь (AA)	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSNLAWYQQK PGQAPRLLIYGASTRATGIPARFSGSGSGTEFTLTISLSQS EDFAVYYCQQYHSFPFTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPP SDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSG NSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACE VTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:75)
VH (N)	CAGCTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCAGGACTGGTG AAGCCTTCGGAGACCCTGTCCCTCACCTGCACTGTCT CTGGTGGCTCCATCAAAGTGGTAGTTACTACTGGGG CTGGATCCGCCAGCCCCAGGGAAGGGGCTGGAGTG GATTGGGAACATCTATTATAGTGGGAGCACCTACTAC AACCCGTCCTCAGAAGTCGAGTCACCATATCCGTAG ACACGTCCAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGTTC TGTGACCGCCGCAGACACGGCGGTGTACTACTGCGCC AGAGAAGGATCTTACCCCAATCAGTTTGATCCATGGG GACAGGGTACATTGGTCACCGTCTCCTCA (SEQ ID NO:76)
VL(N)	GAAATAGTGATGACGCAGTCTCCAGCCACCCTGTCTG TGICTCCAGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGC CAGTCAGAGTGTTAGCAGCAACTTAGCCTGGTACCAG CAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATG GTGCATCCACCAGGGCCACTGGTATCCCAGCCAGGTT CAGTGGCAGTGGTCTGGGACAGAGTTCACTCTCACC ATCAGCAGCCTGCAGTCTGAAGATTTTGCAGTTTATT ACTGTCAGCAGTACCACTCCTTCCCTTCACTTTTGGC GGAGGGACCAAGGTTGAGATCAAAA (SEQ ID NO:77)

Таблица 10

Аминокислотные и нуклеотидные последовательности антитела 22213

Домен антитела (AA/N)	Последовательность (SEQ ID NO)
VH CDR1 (AA)	GSIGRGSYYWG (SEQ ID NO:32)
VH CDR2 (AA)	NIYYSGSTYYNPSLKS (SEQ ID NO:33)
VH CDR3 (AA)	AREGSYTTVLNV (SEQ ID NO:34)
VL CDR1 (AA)	RASQSVASSHLA (SEQ ID NO:35)
VL CDR2 (AA)	DAVSRAT (SEQ ID NO:36)
VL CDR3 (AA)	QQAASYPLT (SEQ ID NO:37)
VH (AA)	QLQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSIGRGSYYWGWIRQPPGKGLEWIGNIYYSGSTYYNPSLKS RVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAREGSYTTVLNVWGQGMVTVSS (SEQ ID NO:54)
VL (AA)	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVASSHLAWYQQKPGQAPRLLIYDAVSRATGIPDRFSGSGSGTDFLTISRLEPEDFAVYYCQQAASYPLTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:55)
VH FR1 (AA)	QLQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSG (SEQ ID NO:78)
VH FR2 (AA)	WIRQPPGKGLEWIG (SEQ ID NO:79)
VH FR3 (AA)	RVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYC (SEQ ID NO:80)
VH FR4 (AA)	WGQGMVTVSS (SEQ ID NO:81)
VL FR1 (AA)	EIVLTQSPGTLSPGERATLSC (SEQ ID NO:82)
VL FR2 (AA)	WYQQKPGQAPRLLIY (SEQ ID NO:83)
VL FR3 (AA)	GIPDRFSGSGSGTDFLTISRLEPEDFAVYYC (SEQ ID NO:84)
VL FR4 (AA)	FGGGTKVEIK (SEQ ID NO:98)
Тяжелая цепь (AA)	QLQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSIGRGSYYWGWIRQPPGKGLEWIGNIYYSGSTYYNPSLKS RVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAREGSYTTVLNVWGQGMVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPPEVTCVVVDVSH

	DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:56)
Легкая цепь (AA)	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVASSHLAWYQQ KPGQAPRLLIYDAVSRATGIPDRFSGSGSGTDFLTISR EPEDFAVYYCQQAASYPLTFGGGKVEIKRTVAAPSVFI FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQ SGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYA CEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:57)
VH (N)	CAGCTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCAGGACTGGTG AAGCCTTCGGAGACCCTGTCCCTCACCTGCACTGTCT CTGGTGGCTCCATCGGGAGGGGGAGTACTACTGGGG CTGGATCCGCCAGCCCCAGGGAAGGGGCTGGAGTG GATTGGGAACATCTATTATAGTGGGAGCACCTACTAC AACCCGTCCCTCAAGAGTCGAGTCACCATATCCGTAG ACACGTCCAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGTTC TGTGACCGCCGACAGACACGGCGGTGTACTACTGCGCC AGAGAAGGATCTTACACAACCGTGTTAAACGTATGG GGTCAGGGTACAATGGTCACCGTCTCCTCA (SEQ ID NO:85)
VL (N)	GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTT TGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGC CAGTCAGAGTGTGCCAGCAGCCACTTAGCCTGGTAC CAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCT ATGACGCAGTCAGCAGGGCCACTGGCATCCAGACA GGTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCT CACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTTGCAGTG TATTACTGTCAGCAGGCCGCCAGTTACCCTTCACTTT TGGCGGAGGGACCAAGGTTGAGATCAAA (SEQ ID NO:86)

В некоторых вариантах осуществления терапевтическое антитело к B7-H4 или антигенсвязывающий фрагмент содержат CDR1 области VH, CDR2 области VH, CDR3 области VH, CDR1 области VL, CDR2 области VL и CDR3 области VL антитела 20502. CDR могут представлять собой CDR, определенные по Кабату, CDR, определенные по Чотиа, или CDR, определенные по AbM.

В некоторых вариантах осуществления терапевтическое антитело к B7-H4 или антигенсвязывающий фрагмент содержат CDR1 области VH, CDR2 области VH, CDR3 области VH, CDR1 области VL, CDR2 области VL и CDR3 области VL антитела 22213. CDR могут представлять собой CDR, определенные по Кабату, CDR, определенные по Чотиа, или CDR, определенные по AbM.

В некоторых вариантах осуществления терапевтическое антитело к B7-H4 или антигенсвязывающий фрагмент содержат CDR1 области VH, CDR2 области VH, CDR3 области VH, CDR1 области VL, CDR2 области VL и CDR3 области VL, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 32-37 соответственно. В некоторых вариантах осуществления терапевтическое антитело к B7-H4 или антигенсвязывающий фрагмент содержат CDR1 области VH, CDR2 области VH, CDR3 области VH, CDR1 области VL, CDR2 области VL и CDR3 области VL, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 58-63 соответственно.

В некоторых вариантах осуществления терапевтическое антитело к B7-H4 или антигенсвязывающий фрагмент содержат переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи, причем переменная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 54. В некоторых вариантах осуществления терапевтическое антитело к B7-H4 или антигенсвязывающий

фрагмент содержат вариабельную область тяжелой цепи и вариабельную область легкой цепи, причем вариабельная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 64.

В некоторых вариантах осуществления терапевтическое антитело к В7-Н4 или антигенсвязывающий фрагмент содержат вариабельную область тяжелой цепи и вариабельную область легкой цепи, причем вариабельная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 55. В некоторых вариантах осуществления терапевтическое антитело к В7-Н4 или антигенсвязывающий фрагмент содержат вариабельную область тяжелой цепи и вариабельную область легкой цепи, причем вариабельная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 65.

В некоторых вариантах осуществления терапевтическое антитело к В7-Н4 или антигенсвязывающий фрагмент содержат вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 54, и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 55. В некоторых вариантах осуществления терапевтическое антитело к В7-Н4 или антигенсвязывающий фрагмент содержат вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 64, и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 65. В некоторых вариантах осуществления терапевтическое антитело к В7-Н4 или антигенсвязывающий фрагмент содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 56. В некоторых вариантах осуществления терапевтическое антитело к В7-Н4 или антигенсвязывающий фрагмент содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 74. В некоторых вариантах осуществления терапевтическое антитело к В7-Н4 или антигенсвязывающий фрагмент содержит легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 57. В некоторых вариантах осуществления терапевтическое антитело к В7-Н4 или антигенсвязывающий фрагмент содержит легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 75. В некоторых вариантах осуществления терапевтическое антитело к В7-Н4 или антигенсвязывающий фрагмент содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 56, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 57. В некоторых вариантах осуществления терапевтическое антитело к В7-Н4 или антигенсвязывающий фрагмент содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 74, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 75.

Наборы.

В настоящем изобретении предложены наборы, содержащие одно или более антител или их антигенсвязывающих фрагментов, описанных в настоящем изобретении, или их конъюгатов (например, детектирующих конъюгатов). Как предложено в настоящем изобретении, наборы могут использоваться в способах диагностики. В одном варианте осуществления набор содержит антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в настоящем изобретении, предпочтительно очищенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, в одном или более контейнеров.

В конкретном варианте осуществления наборы, описанные в настоящем изобретении, содержат по существу выделенный антиген В7-Н4 (например, В7-Н4 человека), который может использоваться в качестве контроля. В конкретных вариантах осуществления набор, предложенный в настоящем изобретении, может содержать полученный рекомбинантным способом или химически синтезированный антиген В7-Н4. Антиген В7-Н4, представленный в наборе, также может быть присоединен к твердой подложке.

В другом конкретном варианте осуществления наборы, описанные в настоящем изобретении, дополнительно содержат контрольное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые не реагируют с антигеном В7-Н4. В другом конкретном варианте осуществления наборы, описанные в настоящем изобретении, содержат один или более элементов для обнаружения специфического связывания антитела или его антигенсвязывающего фрагмента с антигеном В7-Н4 (например, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент могут быть конъюгированы с обнаруживаемым субстратом, таким как флуоресцентное соединение, фермент, ферментативный субстрат, радиоактивное соединение или люминесцентное соединение, или второе антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые распознают первое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, могут быть конъюгированы с обнаруживаемым субстратом). В еще одном конкретном варианте осуществления элементы для обнаружения из описанного выше набора включают в себя твердую подложку, к которой присоединен антиген В7-Н4. Подобный набор может также включать в себя неприсоединенное меченое репортером антитело мыши/грызуна или его антигенсвязывающий фрагмент. В этом варианте осуществления связывание антитела или его антигенсвязывающего фрагмента с антигеном В7-Н4 может быть обнаружено путем связывания указанного меченого репортером антитела или его антигенсвязывающего фрагмента.

В другом конкретном варианте осуществления наборы, описанные в настоящем изобретении, дополнительно содержат терапевтическое антитело к В7-Н4 или его антигенсвязывающий фрагмент и информацию о том, что терапевтическое антитело к В7-Н4 или его антигенсвязывающий фрагмент должны вводиться, когда В7-Н4 обнаружен в образце, используя антитело к В7-Н4 или его антигенсвязывающий фрагмент, предложенные в настоящем изобретении.

Следующие примеры приведены с целью иллюстрации, а не с целью ограничения.

Примеры

Примеры в этом разделе (т.е. в разделе б) предлагаются в качестве иллюстрации, а не в качестве ограничения.

Пример 1. Получение гибридомы.

Панель антител, которые селективно связываются с B7-H4, была получена с помощью рекомбинантного растворимого варианта белка внеклеточного домена (ECD) B7-H4:

```
MASLGQILFWSIISIIILAGAIALIGFGISGRHSITVTTVASAGNIGEDGILSCTFEPDIKLS
D
IVIQWLKEGVLGLVHEFKEGKDELSEQDEMFRGRTAVFADQVIVGNASLRLKINVQLTD
AGTYKCYIPTS KKGKNANLEYKTGAFSMPEVNV DYNASSETLRCEAPRWFPQPTVVWA
SQVDQGANFSEVSN TSFELNSENVTM KVSVLVYNVTINNTYSCMIENDIAKATGDIKVT
ESEIKRRSHLQLLNSKASGSEPKSSDKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT
PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW
LNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY
PSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEA
LHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:20).
```

В каждую заднюю подушечку лапы мыши линии NZB/W инъекцировали белок ECD B7-H4, ресуспендированный в Sigma Adjuvant System® (Sigma-Aldrich, Inc., г. Сент-Луис, штат Миссури). Через 21 день после первой инъекции сыворотку отбирали и титровали путем иммуноферментного анализа (ИФА), сортировки клеток с активированной флуоресценцией (FACS) и проточной цитометрии, чтобы обеспечить хороший иммунный ответ у мыши. Скрининги ИФА и FACS подробно описаны в примерах 2 и 3 соответственно. Через 3 дня после последней инъекции клетки подколennых узлов, полученные от мышей с положительным титром, сливали с линиями миеломных клеток мыши (см., например, Chuntharapai et al., 1997, *Methods Enzymol.*, 288:15-27). Было получено около 2880 гибридомных клонов крысы.

Гибридомные клоны, полученные таким образом, затем подвергали скринингу на предмет выработки моноклональных антител, связывающихся с белком ECD B7-H4 (SEQ ID NO: 20), слитым Fc-белком N-концевого IgV-домена B7-H4 (аминокислоты 1-151)-huIgG (SEQ ID NO: 21) и с клетками НЕК 293, стабильно экспрессирующими полноразмерный B7-H4 человека (SEQ ID NO: 1) на своей поверхности.

```
MASLGQILFWSIISIIILAGAIALIGFGISGRHSITVTTVASAGNIGEDGILSCTFEPDIKLS
D
IVIQWLKEGVLGLVHEFKEGKDELSEQDEMFRGRTAVFADQVIVGNASLRLKINVQLTD
AGTYKCYIPTS KKGKNANLEYKTGAFSGSEPKSSDKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPK
KDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS
VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQV
SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV
FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:21).
```

Пример 2. Скрининг ИФА.

Для скрининга гибридомных клонов, полученных в примере 1, выполнили ИФА, в целом как описано в Baker et al., 2002, *Trends Biotechnol.*, 20:149-156. Вкратце 96-луночные планшеты покрывали 50 мкл белка ECD B7-H4 (SEQ ID NO: 20) или N-концевого слитого Fc-белка B7-H4 (SEQ ID NO: 21) в концентрации 2 мкг/мл в покрывающем буфере (0,05 М карбонатный буфер, pH 9,6), запечатывали и хранили в течение ночи при температуре 40°C. После удаления покрывающего раствора в каждую лунку 96-луночного планшета добавляли 200 мкл аналитического/блокирующего раствора, содержащего 0,5% бычий сывороточный альбумин (BSA) и 0,05% Tween®-20 в ФСБ (pH 7,4) (разбавитель ИФА). Планшеты инкубировали при комнатной температуре в течение одного часа с перемешиванием. Лунки затем трижды промывали 300 мкл 0,05% Tween®-20 в ФСБ (промывочный буфер). После промывания в каждую лунку добавляли 100 мкл гибридомного супернатанта в разбавителе ИФА, и планшеты инкубировали при комнатной температуре в течение одного часа с перемешиванием. Лунки трижды промывали промывочным буфером, как было описано выше. После промывания в каждую лунку добавляли 100 мкл разведения 1:1000 овечьих антител против мышинного IgG, соединенных с пероксидазой хрена в разбавителе ИФА. Планшеты инкубировали при комнатной температуре в течение одного часа с перемешиванием, трижды промывали промывочным буфером, как было описано выше, и высушивали. Лунки обрабатывали добавлением 100 мкл микролуночного субстрата пероксидазы хрена тетраметилбензидина (ТМБ) в каждую лунку и инкубацией при комнатной температуре в течение 5-10 минут или пока не происходило изменение цвета. Обработку останавливали добавлением 100 мкл стоп-раствора ТМБ в каждую лунку. Планшеты анализировали при 650 нм. В качестве контролей использовали предотбор и полисыворотку. Образцы предотбора содержали мышиную сыворотку до иммунизации, а образцы полисыворотки содержали мышиную антисыворотку после иммунизации. Антитела, которые дали положительный сигнал ИФА, были отобраны для последующего скрининга с помощью сортировки клеток с активированной флуоресценцией (FACS).

Пример 3. Скрининг FACS.

Для дальнейшего скрининга гибридных клонов, полученных в примере 1, выполнили сортировку клеток с активированной флуоресценцией (FACS), используя клетки НЕК 293, стабильно экспрессирующие полноразмерный В7-Н4 человека (SEQ ID NO: 1). Стандартные клеточные линии НЕК 293 служили в качестве отрицательного контроля. Клетки ресуспендировали и центрифугировали при 500g в течение 5 минут при температуре 40°C. Среду аспирировали, а клетки ресуспендировали в буфере для окрашивания BD FACSTFlow™ Stain Buffer (BD Biosciences, Сан-Хосе, штат Калифорния) с 1% фетальной бычьей сывороткой (FBS) (буфер для окрашивания клеток) при температуре 40°C. Клетки центрифугировали, как было описано ранее, среду аспирировали, а клетки ресуспендировали в буфере для окрашивания клеток при температуре 40°C до конечной концентрации 2×10^6 клеток/мл. Затем клетки добавляли в 96-луночные планшеты с круглым дном в концентрации 50 мкл/лунку. 100 мкл супернатанта от каждого гибридного клона добавляли в каждую лунку, так что каждый гибридный супернатант инкубировали с одной лункой, содержащей клеточную линию НЕК 293, стабильно экспрессирующую В7-Н4, или клеточную линию отрицательного контроля. Планшеты инкубировали на льду в течение 30 минут и центрифугировали, как было описано ранее. Затем супернатанты аспирировали. Каждую лунку ресуспендировали в 200 мкл буфера для окрашивания клеток при температуре 40°C. После этого планшеты центрифугировали, как было описано ранее, а буфер для окрашивания клеток аспирировали. После этапа промывания клетки в каждой лунке ресуспендировали в 100 мкл разведения 1:1000 козьего Fc-фрагмента против мышинового IgG, соединенного с R-фикоэритрином (Jackson ImmunoResearch, Вест Гров, штат Пенсильвания), в буфере для окрашивания клеток при температуре 40°C, и планшеты инкубировали в темноте на льду в течение 30 минут. Планшеты центрифугировали, как было описано ранее, а супернатанты аспирировали. Каждую лунку ресуспендировали в 200 мкл буфера для окрашивания клеток при температуре 40°C, а планшеты центрифугировали, как было описано ранее. Буфер для окрашивания клеток аспирировали. Клетки в каждой лунке ресуспендировали в 200 мкл буфера для окрашивания клеток при температуре 40°C и переносили в пробирки для микротитрования объемом 1,2 мл. FACS выполняли на приборе FACScan™ или FACSCalibur™ (BD Biosciences, Сан-Хосе, штат Калифорния). Антитела, которые продемонстрировали клеточное связывание в анализе FACS, отбирали для дальнейшего скрининга с помощью иммуногистохимии (ИГХ).

Пример 4. Скрининг ИГХ.

Для дальнейшего скрининга гибридных клонов, полученных в примере 1, выполнили иммуногистохимическое (ИГХ) окрашивание срезов, полученных от субъекта с инвазивной протоковой карциномой молочной железы. Фиксированные формалином и погруженные в парафин (FFPE) срезы вырезали на расстоянии 5 микрон, сушили на воздухе на заряженных предметных стеклах Superfrost Plus и выпекали в течение одного часа при температуре 60°C. Срезы депарафинизировали и окрашивали на автоматической системе окрашивания Discovery Ultra (Ventana Medical Systems, Тусон, штат Аризона). Через 1 ч демаскировки антигена с помощью Ultra CC1 при температуре 95°C В7-Н4 обнаруживали с помощью мышинных первичных антител к В7-Н4 в течение 1 ч при комнатной температуре с последующим использованием системы обнаружения на основе антимышиных антител Omni-Map, конъюгированных с HRP, 3,3'-диаминобензидина (DAB) ChromoMap и контрастным окрашиванием гематоксилином в соответствии с инструкциями производителя.

Использовали семь первичных антител к В7-Н4: шесть рекомбинантных антител, полученных в примере 1 (в концентрации 10 мкг/мл), а также А57.1 (см. патент США № 7619068) (в концентрации 1,25 мкг/мл), которое использовалось в качестве контроля. Два рекомбинантных антитела (J516 и J512) обнаружили В7-Н4 на клеточных мембранах и в цитоплазме аналогичным с А57.1 образом, при этом большинство В7-Н4-положительных клеток наблюдалось в опухолевом отделе, как показано на фиг. 1 и 2. Рекомбинантные антитела обнаружили меньшее количество В7-Н4-экспрессирующих клеток с интенсивностью сигнала 1+, чем А57.1 (35% с помощью J512 по сравнению с 35% с помощью J516% по сравнению с 58% с помощью А57.1), как показано на фиг. 3 и 4. При измерении экспрессии В7-Н4 с помощью вычислительного анализа изображений (Definiens, Кембридж, штат Массачусетс) J516 и J512 продемонстрировали аналогичное распределение сигнала В7-Н4 по клеточным отделам, что и А57.1, как показано на фиг. 5А-5С.

Пример 5. Определение последовательностей.

Последовательности тяжелой цепи (HC) и легкой цепи (LC) антител к В7-Н4 М6, М11 и М15, все из которых продемонстрировали окрашивание ИГХ, были определены в соответствии со следующей процедурой.

РНК собирали из гибридом с помощью реагента тризол (ThermoFisher Scientific, Карлсбад, штат Калифорния), а кДНК получали с помощью обратной транскриптазы SmartScribe (Clontech, Маунтин Вью, штат Калифорния) и полимеразы Advantage 2 (Clontech, Маунтин Вью, штат Калифорния). ПЦР выполняли с использованием полимеразы Phusion Taq (NEB, Ипсвич, штат Массачусетс) в стандартных условиях ПНР. Продукты ПЦР затем клонировали с использованием набора для клонирования Zero Blunt® TOPO® (ThermoFisher Scientific, Карлсбад, штат Калифорния).

Проводили скрининг клонов на предмет вставок, и множественные клоны секвенировали для проверки исходных генных последовательностей тяжелой цепи и легкой цепи. Полинуклеотидные последовательности, кодирующие тяжелую цепь и легкую цепь, представлены в табл. 8 выше.

Вариабельные домены антитела к В7-Н4 затем субклонировали в векторы экспрессии с различными Fc-областями с получением антител с константными областями IgG2a мыши и IgG1 мыши. Вариабельные домены тяжелой цепи антитела к В7-Н4 затем клонировали в векторы экспрессии с различными Fc-областями с получением антител с константными областями IgG2a мыши и IgG1 мыши. Вариабельные домены легкой цепи антитела к В7-Н4 клонировали в векторы экспрессии с константной областью IgK мыши. После проверки последовательностей выделенным антителам присвоили ID J511-J516, как указано в табл. 1 выше.

Изобретение не должно быть ограничено в объеме конкретными вариантами осуществления, описанными в настоящем изобретении. Действительно различные модификации изобретения в дополнение к описанным будут очевидны специалистам в данной области техники из вышеуказанного описания и сопроводительных фигур. Подразумевается, что такие модификации входят в объем прилагаемой формулы изобретения.

Все ссылки (например, публикации, или патенты, или патентные заявки), цитированные в настоящем изобретении, включены в настоящий документ посредством ссылки во всей их полноте и для всех целей в той же степени, как если бы каждая отдельная ссылка (например, публикация, или патент, или заявка на патент) была конкретно и индивидуально включена посредством ссылки во всей своей полноте для всех целей. Другие варианты осуществления находятся в пределах следующей формулы изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое специфически связывается с В7-Н4 человека, содержащее определяющую комплементарность область (CDR) 1 вариабельной области тяжелой цепи (VH), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22, CDR2 области VH, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23, CDR3 области VH, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 24, CDR1 вариабельной области легкой цепи (VL), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 25, CDR2 области VL, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 26, 27 или 28, и последовательность CDR3 области VL, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 29.

2. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1, в котором антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит VH, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6, 7 или 8, и/или VL, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9, 10 или 11.

3. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое специфически связывается с В7-Н4 человека, содержащее вариабельную область тяжелой цепи и вариабельную область легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности

- (a) SEQ ID NO: 6 и 9 соответственно;
- (b) SEQ ID NO: 6 и 10 соответственно;
- (c) SEQ ID NO: 6 и 11 соответственно;
- (d) SEQ ID NO: 7 и 9 соответственно;
- (e) SEQ ID NO: 7 и 10 соответственно;
- (f) SEQ ID NO: 7 и 11 соответственно;
- (g) SEQ ID NO: 8 и 9 соответственно;
- (h) SEQ ID NO: 8 и 10 соответственно; или
- (i) SEQ ID NO: 8 и 11 соответственно.

4. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-3, в котором антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержит тяжелую цепь и легкую цепь, содержащие аминокислотные последовательности

- (a) SEQ ID NO: 16 и 19 соответственно;
- (b) SEQ ID NO: 16 и 30 соответственно;
- (c) SEQ ID NO: 16 и 31 соответственно;
- (d) SEQ ID NO: 17 и 19 соответственно;
- (e) SEQ ID NO: 17 и 30 соответственно;
- (f) SEQ ID NO: 17 и 31 соответственно;
- (g) SEQ ID NO: 18 и 19 соответственно;
- (h) SEQ ID NO: 18 и 30 соответственно;
- (i) SEQ ID NO: 18 и 31 соответственно;
- (j) SEQ ID NO: 89 и 19 соответственно;
- (k) SEQ ID NO: 90 и 19 соответственно; или
- (l) SEQ ID NO: 91 и 19 соответственно.

5. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое специфически связывает-

ся с B7-H4 человека, причем антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит CDR1 области VH, CDR2 области VH, CDR3 области VH, CDR1 области VL, CDR2 области VL и CDR3 области VL антитела, выбранного из группы, состоящей из J512, содержащего аминокислотную последовательность VH из SEQ ID NO: 6 и аминокислотную последовательность VL из SEQ ID NO: 9, J513 или J514, каждый из которых содержит аминокислотную последовательность VH из SEQ ID NO: 7 и аминокислотную последовательность VL из SEQ ID NO: 9, J515 или J516, каждый из которых содержит аминокислотную последовательность VH из SEQ ID NO: 8 и аминокислотную последовательность VL из SEQ ID NO: 9, J517, содержащего аминокислотную последовательность VH из SEQ ID NO: 6 и аминокислотную последовательность VL из SEQ ID NO: 10, J518, содержащего аминокислотную последовательность VH из SEQ ID NO: 6 и аминокислотную последовательность VL из SEQ ID NO: 11, J519, содержащего аминокислотную последовательность VH из SEQ ID NO: 7 и аминокислотную последовательность VL из SEQ ID NO: 10, J520, содержащего аминокислотную последовательность VH из SEQ ID NO: 7 и аминокислотную последовательность VL из SEQ ID NO: 11, J521, содержащего аминокислотную последовательность VH из SEQ ID NO: 8 и аминокислотную последовательность VL из SEQ ID NO: 10, и J522, содержащего аминокислотную последовательность VH из SEQ ID NO: 8 и аминокислотную последовательность VL из SEQ ID NO: 11.

6. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.5, в котором CDR представляют собой CDR, определенные по Кабату, CDR, определенные по Чотиа, или CDR, определенные по AbM.

7. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-6, который представляет собой антигенсвязывающий фрагмент, причем антигенсвязывающий фрагмент содержит Fab, Fab', F(ab')₂, одноцепочечный фрагмент Fv (scFv), связанный дисульфидной связью фрагмент Fv, минитело, F(ab')₃, диатело, (scFv)₂ или scFv-Fc.

8. Конъюгат антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп.1-7 и токсина.

9. Выделенный полинуклеотид, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую вариабельную область тяжелой цепи антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по п.2 или 3.

10. Выделенный полинуклеотид, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую вариабельную область легкой цепи антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по п.2 или 3.

11. Выделенный полинуклеотид, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую вариабельную область легкой цепи или легкую цепь антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп.1-7.

12. Выделенный полинуклеотид по п.11, в котором молекула нуклеиновой кислоты кодирует область VL SEQ ID NO: 9, 10 или 11 либо легкую цепь SEQ ID NO: 19, 30 или 31.

13. Выделенный полинуклеотид, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую вариабельную область тяжелой цепи или тяжелую цепь антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп.1-7.

14. Выделенный полинуклеотид, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую вариабельную область тяжелой цепи или тяжелую цепь антител, или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп.2-4 и вариабельную область легкой цепи или легкую цепь антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп.2-4.

15. Выделенный вектор экспрессии, содержащий полинуклеотид по любому из пп.9-14.

16. Клетка-хозяин, содержащая полинуклеотид по любому из пп.9-13, вектор по п.15 или первый вектор, содержащий полинуклеотид, кодирующий вариабельную область тяжелой цепи по п.9 или 13, и второй вектор, кодирующий вариабельную область легкой цепи по любому из пп.10-12.

17. Способ получения антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которое специфически связывается с B7-H4 человека, включающий культивирование клетки-хозяина, содержащей полинуклеотид, кодирующий вариабельную область тяжелой цепи и вариабельную область легкой цепи по любому из пп.9-14, таким образом, чтобы экспрессировался полинуклеотид, кодирующий вариабельную область тяжелой цепи, и полинуклеотид, кодирующий вариабельную область легкой цепи, и вырабатывалось антитело или его антигенсвязывающий фрагмент.

18. Способ обнаружения B7-H4 в образце, включающий приведение в контакт образца с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом по любому из пп.1-7 и обнаружение связывания антитела или его антигенсвязывающего фрагмента с B7-H4.

19. Способ по п.18, в котором образец получают от субъекта, имеющего рак.

20. Способ по п.19, в котором рак выбран из группы, состоящей из рака молочной железы, протоковой карциномы, рака эндометрия, рака яичников, немелкоклеточного рака легкого, рака поджелудочной железы, рака щитовидной железы, рака почки и рака мочевого пузыря.

21. Применение терапевтического антитела к B7-H4 или его антигенсвязывающего фрагмента для лечения рака, экспрессирующего B7-H4, причем экспрессия B7-H4 была обнаружена в образце, полученном от субъекта с использованием антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп.1-7, при этом терапевтическое антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержит

(i) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 54, и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность

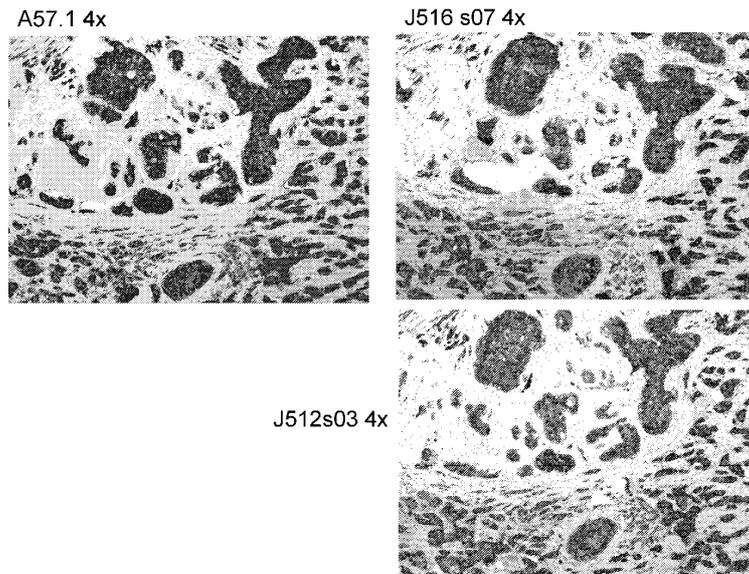
SEQ ID NO: 55; или

(ii) переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 64, и переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 65.

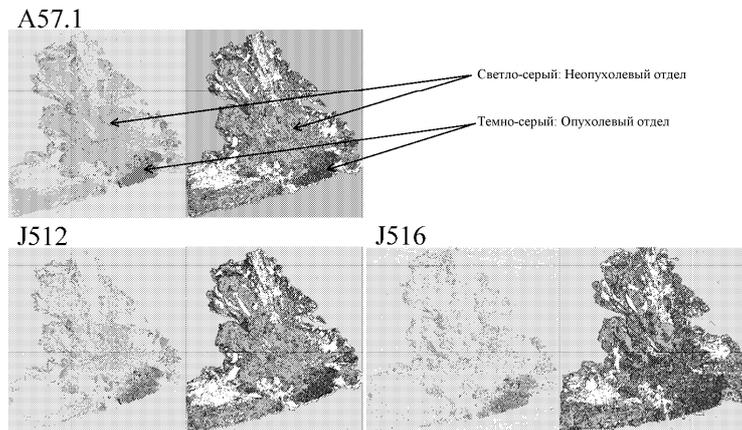
22. Применение по п.21, в котором рак выбран из группы, состоящей из рака молочной железы, протоковой карциномы, рака эндометрия, рака яичников, немелкоклеточного рака легкого, рака поджелудочной железы, рака щитовидной железы, рака почки и рака мочевого пузыря.

23. Набор для обнаружения клеток, экспрессирующих V7-N4, где набор содержит антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-7 и а) реагент для обнаружения, б) антиген V7-N4, с) терапевтическое антитело к V7-N4 или d) комбинацию любого из а)-с).

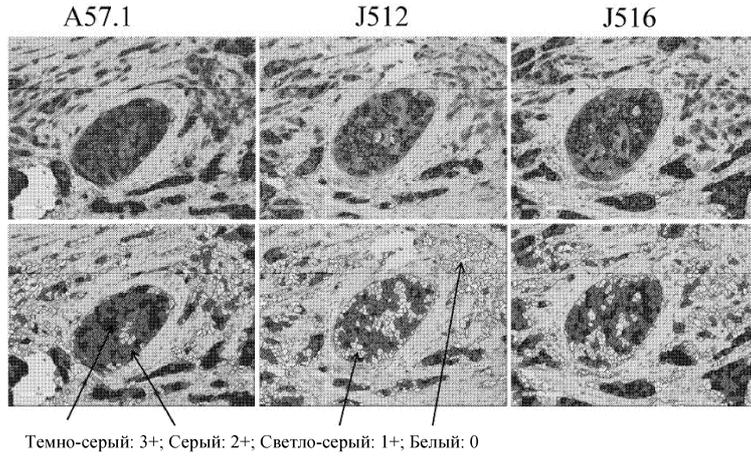
24. Набор для лечения рака, экспрессирующего V7-N4, где набор содержит антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-7 и а) реагент для обнаружения, б) антиген V7-N4, с) терапевтическое антитело к V7-N4 или d) комбинацию любого из а)-с).



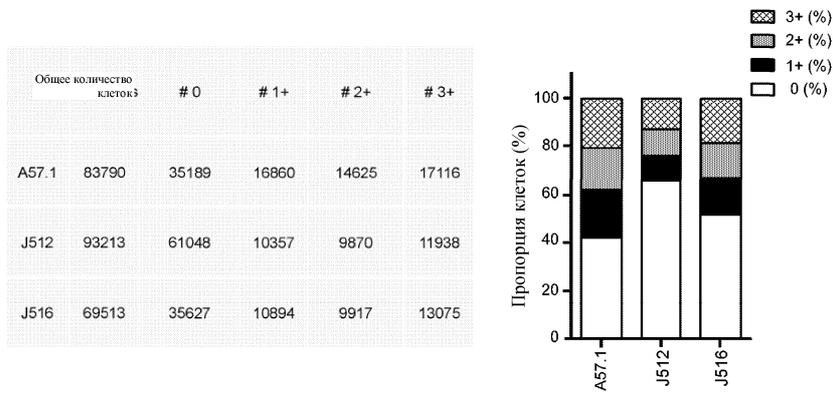
Фиг. 1



Фиг. 2

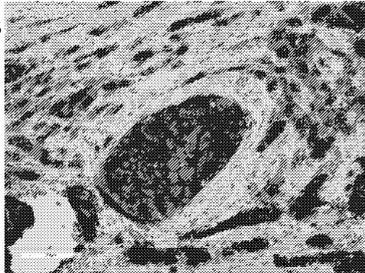


Фиг. 3

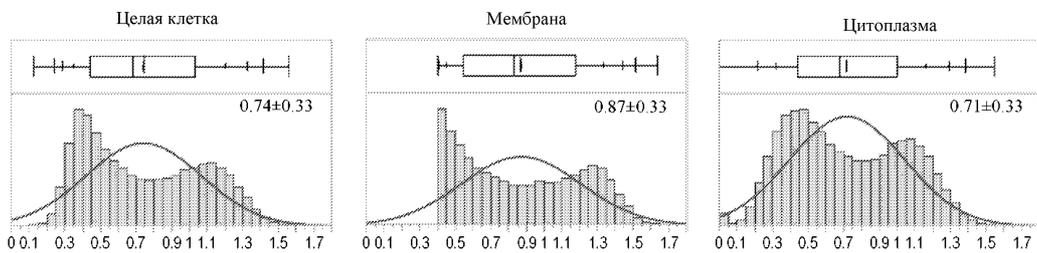


Фиг. 4

Оценка H (A57.1)=116

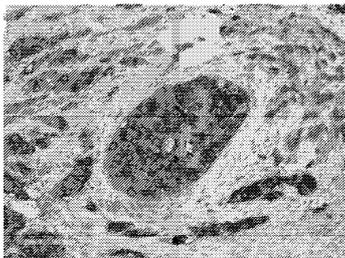


Распределение интенсивности DAB среди B7-H4-положительных клеток

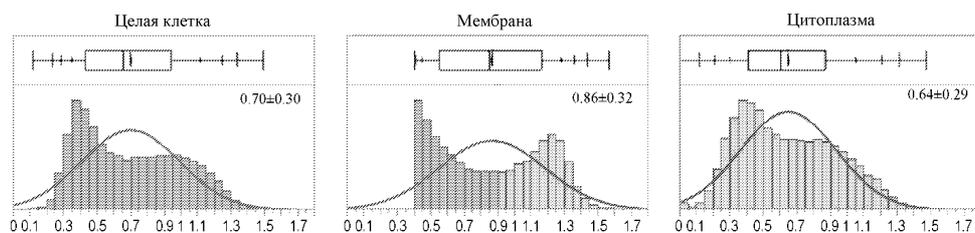


Фиг. 5А

Оценка N (J512)=71

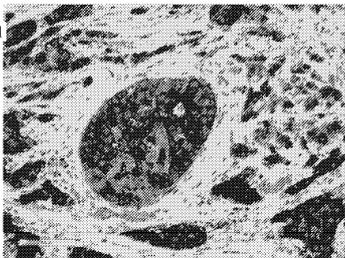


Распределение интенсивности DAB среди В7-Н4-положительных клеток

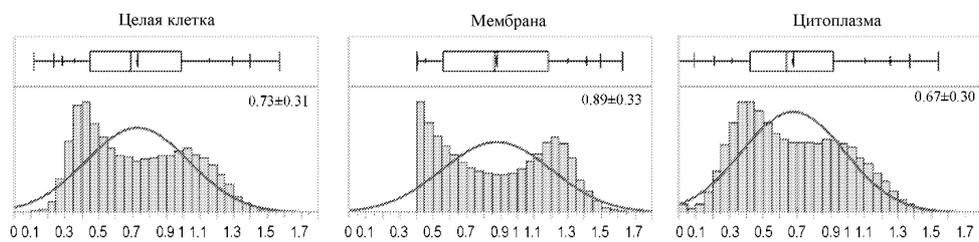


Фиг. 5В

Оценка N (J516)=101



Распределение интенсивности DAB среди В7-Н4-положительных клеток



Фиг. 5С

