

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **046814**

(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2024.04.24

(51) Int. Cl. **C07K 16/28** (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(21) Номер заявки
202090218

(22) Дата подачи заявки
2018.08.23

(54) АНТИТЕЛА К B7-H4 И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

(31) **62/550,173; 62/579,774; 62/607,810;
62/656,789**

(32) **2017.08.25; 2017.10.31; 2017.12.19;
2018.04.12**

(33) **US**

(43) **2020.07.21**

(86) **PCT/US2018/047805**

(87) **WO 2019/040780 2019.02.28**

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

(72) Изобретатель:
**Каплан Чарльз, Хаусер Деррик,
Боргес Луис, Браттич Глория,
Белловин Дэвид, Кемп Фелисия,
Гходдуси Маджид, Нильсон Нельс П.,
Миллер Кэти, Шмидт Майки (US)**

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

(56) HYUNGJUN JEON ET AL.: "Structure and Cancer Immunotherapy of the B7 Family Member B7x", CELL REPORTS, vol. 9, № 3, 1 November 2014 (2014-11-01), p. 1089-1098, XP055510316, ISSN: 2211-1247, DOI: 10.1016/j.celrep.2014.09.053, results and discussion

WO-A1-2014100483

NING ZHANG ET AL.: "Preparation and Characterization of Monoclonal Antibody Against Human B7-H4 Molecule", MONOCLONAL ANTIBODIES IN IMMUNODIAGNOSIS AND IMMUNOTHERAPY, vol. 33, № 4, 1 August 2014 (2014-08-01), p. 270-274, XP055468610, ISSN: 2167-9436, DOI: 10.1089/mab.2013.0082, discussion

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, discussion

CHEN CHENG ET AL.: "Induced expression of B7-H4 on the surface of lung cancer cell by the tumor-associated macrophages: A potential mechanism of immune escape", CANCER LETTERS, vol. 317, № 1, 1 April 2012 (2012-04-01), p. 99-105, XP028889120, ISSN: 0304-3835, DOI: 10.1016/J.CANLET.2011.11.017, discussion

JOSEPH R. PODOJIL ET AL.: "Potential targeting of B7-H4 for the treatment of cancer", IMMUNOLOGICAL REVIEWS, vol. 276, № 1, 1 March 2017 (2017-03-01), p. 40-51, XP055510318, US, ISSN: 0105-2896, DOI: 10.1111/imr.12530, item 8

(57) Изобретение относится к антителам и их антигенсвязывающим фрагментам, которые специфически связываются с B7-H4 человека (и необязательно B7-H4 яванского макака (Susomolgus), мыши и/или крысы), и к композициям, содержащим такие антитела или их антигенсвязывающие фрагменты. В конкретном аспекте указанные антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связываются с B7-H4 человека, усиливают пролиферацию Т-клеток, увеличивают продукцию интерферона-гамма и/или деплетируют экспрессирующие B7-H4 клетки посредством активности АЗКЦ. Изобретение также обеспечивает способы лечения расстройств, таких как рак, путем введения антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которые специфически связываются с B7-H4 человека.

B1

046814

**046814
B1**

Перекрестная ссылка на родственные заявки

Данная заявка заявляет приоритет по предварительной заявке США № 62/550173, поданной 25 августа 2017 г., предварительной заявке США № 62/579774, поданной 31 октября 2017 г., предварительной заявке США № 62/607810, поданной 19 декабря 2017 г., и предварительной заявке США № 62/656789, поданной 12 апреля 2018 г., каждая из которых включена в данный документ в качестве ссылки.

Ссылка на список последовательностей, представленных в электронном виде EFS-WEB

Содержание представленного в электронном виде перечня последовательностей (имя: 3986.0090004_SL_ST25.txt; размер:331354 байта; дата создания: 3 августа 2018 г.) полностью включена в данный документ посредством ссылки.

Область техники

Область исследования.

Данное изобретение относится к антителам, которые специфически связываются с B7-H4 человека, композициями содержащими такие антитела, и к способам получения и применения антител, которые специфически связываются с B7-H4.

Описание связанного уровня техники.

B7-H4 (также известный как B7х, B7-S1 и VTCN1) представляет собой иммунную регуляторную молекулу, которая разделяет гомологию с другими членами семейства B7, включая PD-L1. Это трансмембранный белок типа I, состоящий из эктодоменов IgV и IgC. Хотя 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 коррелировать с плохим прогнозом. Рецептор B7-H4 неизвестен, но считается, что он экспрессируется на Т-клетках. Считается, что B7-H4 непосредственно ингибирует активность Т-клеток.

Учитывая экспрессию и функцию B7-H4, в данном изобретении представлены антитела, которые специфически связываются с B7-H4, и использование этих антител для модуляции активности B7-H4, в том числе, например, при лечении рака.

Сущность изобретения

В данном изобретении представлено выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с B7-H4 человека, содержащие последовательности определяющего комплементарность участка (CDR) 1 переменного участка тяжелой цепи (VH), CDR2 VH, CDR3 VH и CDR1, CDR2, CDR3 переменного участка легкой цепи (VL) выбранные из группы, состоящей из SEQ ID NO: 458-463 соответственно и SEQ ID NO: 35-40 соответственно.

В одном варианте осуществления данного изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат VH, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 464 или 41.

В одном варианте осуществления данного изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат VL, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 42.

В одном варианте осуществления данного изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат переменный участок тяжелой цепи и переменный участок легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности: SEQ ID NO: 464 и 42 соответственно или SEQ ID NO: 41 и 42 соответственно.

В одном варианте осуществления данного изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент дополнительно содержат константный участок тяжелой цепи. В одном варианте осуществления данного изобретения константный участок тяжелой цепи выбран из группы, состоящей из константных участков тяжелой цепи иммуноглобулинов IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁ и IgA₂.

В одном варианте осуществления данного изобретения антитело или антигенсвязывающий фрагмент дополнительно содержат константный участок легкой цепи. В одном варианте осуществления данного изобретения константный участок легкой цепи выбран из группы, состоящей из константных участков легкой цепи иммуноглобулинов человека IgGκ и IgGλ.

В одном варианте осуществления данного изобретения антитело или антигенсвязывающий фрагмент дополнительно содержат константный участок тяжелой цепи и константный участок легкой цепи, при этом константный участок тяжелой цепи представляет собой константный участок тяжелой цепи IgG₁ человека, где константный участок легкой цепи представляет собой константный участок легкой цепи IgGκ человека.

В одном варианте осуществления данного изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 43 или 469.

В одном варианте осуществления данного изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 44.

В одном варианте осуществления данного изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат тяжелую цепь и легкую цепь, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 469 и 44 соответственно или SEQ ID NO: 43 и 44 соответственно.

В данном изобретении также предлагается выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с B7-H4 человека, при этом антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат VH CDR1, VH CDR2, VH CDR3, VL CDR1, VL CDR2 и VL CDR3 антитела, содержащего

- (i) последовательность VH из SEQ ID NO: 464 и последовательность VL из SEQ ID NO: 42; или
- (ii) последовательность VH из SEQ ID NO: 41 и последовательность VL из SEQ ID NO: 42.

В одном варианте осуществления изобретения CDR представляют собой CDR, определенные по Кабату, CDR, определенные по Хотиа, или CDR, определенные по AbM. В одном варианте осуществления изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляют собой антитело человека или его антигенсвязывающий фрагмент. В одном варианте осуществления изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляют собой мышинное, гуманизованное или химерное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент.

В одном варианте осуществления изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент индуцируют пролиферацию Т-клеток. В одном варианте осуществления изобретения антитело или антигенсвязывающий фрагмент усиливают пролиферацию Т-клеток по меньшей мере на 21% по сравнению с обработкой контрольным антителом. В одном варианте осуществления изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент усиливают пролиферацию Т-клеток на около 5% до на около 35% по сравнению с обработкой контрольным антителом. В одном варианте осуществления изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент индуцируют пролиферацию CD4+ Т-клеток. В одном варианте осуществления изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент усиливают пролиферацию CD4+ Т-клеток по меньшей мере на 9% по сравнению с обработкой контрольным антителом. В одном варианте осуществления изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент усиливают пролиферацию CD4+ Т-клеток на около 5% до около 15% по сравнению с обработкой контрольным антителом. В одном варианте осуществления изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент индуцируют пролиферацию CD8+ Т-клеток. В одном варианте осуществления изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент усиливают пролиферацию CD8+ Т-клеток по меньшей мере на 11% по сравнению с обработкой контрольным антителом. В одном варианте осуществления изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент усиливают пролиферацию CD8+ Т-клеток на около 5% до около 15% по сравнению с обработкой контрольным антителом.

В одном варианте осуществления изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент индуцируют продукцию интерферона-гамма (ИФН γ). В одном варианте осуществления данного изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент способны увеличивать продукцию ИФН γ по меньшей мере в 2 раза, по меньшей мере в 3 раза, по меньшей мере в 4 раза и по меньшей мере в 5 раз, по меньшей мере в 6 раз, по меньшей мере в 7 раз, по меньшей мере в 8 раз, от около 2 до около 10 раз или от около 3 до около 10 раз.

В одном варианте осуществления данного изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент способны индуцировать антителозависимую клеточно-опосредованную цитотоксичность (АЗКЦ) в B7-H4-экспрессирующей клетке. В одном варианте осуществления данного изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент индуцируют специфический лизис по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 40%, от около 20% до около 50% или от около 30% до около 50% B7-H4-экспрессирующих клеток.

В одном варианте осуществления данного изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент ингибируют рост опухоли в модели мышинной СТ26 колоректальной карциномы, модели 4Т1 карциномы молочной железы мыши или модели линии клеток меланомы V16-моB7-H4/H3. В одном варианте осуществления данного изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент снижают рост опухоли по меньшей мере на 25%, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 45% или по меньшей мере на 50% по сравнению с обработкой контрольным антителом.

В одном варианте осуществления данного изобретения индукция пролиферации Т-клеток, индукция пролиферации CD4+ Т-клеток, индукция пролиферации CD8+ Т-клеток, индукция продукции ИФН γ , активность АЗКЦ и/или ингибирование роста опухоли зависит от дозы.

В одном варианте осуществления данного изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связываются с B7-H4 яванского макака (*Сynomolgus*). В одном варианте осуществления данного изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связываются с B7-H4 крысы. В одном варианте осуществления данного изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связываются с B7-H4 мыши. В одном варианте осуществления данного изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связываются с B7-H4 человека, B7-H4 яванского макака, B7-H4 крысы и B7-H4 мыши.

В одном варианте осуществления данного изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связываются с доменом IgV B7-H4 человека.

В одном варианте осуществления данного изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент являются афукозилированным.

В одном варианте осуществления данного изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляют собой полноразмерное антитело. В одном варианте осуществления данного изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляют собой антигенсвязывающий фрагмент. В одном варианте осуществления данного изобретения антигенсвязывающий фрагмент содержит Fab, Fab', F(ab')₂, одноцепочечный Fv (scFv), дисульфидно-связанный Fv, домен V-NAR, IgNar, внутриклеточный, IgGΔCH2, минитело, F(ab')₃, тетратело, триатело, диатело, однодоменное антитело, DVD-Ig, Fcab, mAtr², (scFv)₂ или scFv-Fc.

В одном варианте осуществления данного изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент дополнительно содержат детектируемую метку.

В данном изобретении также предоставлен конъюгат выделенного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента с токсином. В одном варианте осуществления данного изобретения токсин является цитостатическим или цитотоксическим. В одном варианте осуществления данного изобретения токсин является цитотоксическим.

В данном изобретении также предоставлен выделенный полинуклеотид, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую вариабельный участок тяжелой цепи или тяжелую цепь антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, предоставленного в данном изобретении. В одном варианте осуществления данного изобретения молекула нуклеиновой кислоты кодирует VH SEQ ID NO: 41 или 464 или тяжелую цепь SEQ ID NO: 43 или 469. В одном варианте осуществления данного изобретения молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность из SEQ ID NO: 213, 223, 233, 243, 470, 253, 263, 273, 283, 293, 303, 313, 323, 333, 343, 353, 363, 373, 383, 393 или 403. В одном варианте осуществления данного изобретения молекула нуклеиновой кислоты содержит

(i) последовательность из SEQ ID NO: 213, 223, 233, 243, 470, 253, 263, 273, 283, 293, 303, 313, 323, 333, 343, 353, 363, 373, 383, 393 или 403; и

(ii) последовательность из SEQ ID NO: 408.

В данном изобретении также предоставлен выделенный полинуклеотид, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую вариабельный участок легкой цепи или легкую цепь антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, предоставленного в данном изобретении. В одном варианте осуществления данного изобретения молекула нуклеиновой кислоты кодирует VL SEQ ID NO: 42 или легкую цепь SEQ ID NO: 44. В одном варианте осуществления данного изобретения молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность из SEQ ID NO: 214, 224, 234, 244, 254, 264, 274, 284, 294, 304, 314, 324, 334, 344, 354, 364, 374, 384, 394 или 404. В одном варианте осуществления данного изобретения молекула нуклеиновой кислоты содержит

(i) последовательность из SEQ ID NO: 214, 224, 234, 244, 254, 264, 274, 284, 294, 304, 314, 324, 334, 344, 354, 364, 374, 384, 394 или 404; и

(ii) последовательность из SEQ ID NO: 406.

В данном изобретении также предлагается выделенный полинуклеотид, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую вариабельный участок тяжелой цепи или тяжелую цепь антитела или антигенсвязывающего фрагмента, представленную в данном изобретении, и вариабельный участок легкой цепи или легкую цепь антитела или его антигенсвязывающего фрагмента.

В данном изобретении также представлен выделенный вектор, содержащий полинуклеотид, предоставленный в данном изобретении.

В данном изобретении также предоставлена клетка-хозяин, содержащая полинуклеотид, представленный в данном изобретении, вектор, представленный в данном изобретении, первый вектор, содержащий один полинуклеотид, представленный в данном изобретении (например, полинуклеотид, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую вариабельную тяжелую цепь или тяжелую цепь), и второй вектор, содержащий другой полинуклеотид, предоставленный в данном изобретении (например, полинуклеотид, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую вариабельную легкую цепь или легкую цепь). В одном варианте осуществления данного изобретения клетка-хозяин представляет собой клетку, выбранную из группы, состоящей из E.coli, Pseudomonas, Bacillus, Streptomyces, дрожжей, CHO, YB/20, NS0, PER-C6, HEK-293T, NIH-3T3, HeLa, BHK, Hep G2, SP2/0, R1.1, BW, LM, COS 1, COS 7, BSC1, BSC40, клетки BMT10, клетки растения, клетки насекомого и клетки человека в культуре ткани. В одном варианте осуществления данного изобретения клетка-хозяин представляет собой клетку CHO. В одном варианте осуществления данного изобретения клетка-хозяин (например, клетка-хозяин млекопитающего, такая как клетка CHO) не имеет функционального гена альфа-1,6-фукозилтрансферазы (FUT8). В данном изобретении также предложен способ (например, способ *in vitro*) получения антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которые связываются с B7-H4 человека, включающий культивирование клетки-хозяина, предоставленной в данном изобретении, так что молекула нуклеиновой кислоты экспрессируется, и продуцируется антитело или его антигенсвязывающий фрагмент.

В данном изобретении также предлагается выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с B7-H4 человека и кодируются полинуклеотидом, представленным в данном изобретении.

В данном изобретении также предоставлена фармацевтическая композиция, содержащая антитело

или его антигенсвязывающий фрагмент, представленный в данном изобретении, конъюгат, представленный в данном изобретении, полинуклеотид, представленный в данном изобретении, вектор, представленный в данном изобретении, или клетка-хозяин, представленная в данном изобретении; и фармацевтически приемлемый наполнитель.

В одном варианте осуществления данного изобретения фармацевтическая композиция дополнительно содержит анти-PD-1 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент. В одном варианте осуществления данного изобретения анти-PD-1 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляют собой ниволумаб, пембролизумаб, AMP-514, камрелизумаб, тизелизумаб или спартализумаб.

В данном изобретении также предлагается фармацевтическая композиция, содержащая

(i) антитела или антигенсвязывающие фрагменты, представленные в данном изобретении; и
(ii) фармацевтически приемлемый наполнитель, при этом по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, при по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% антител или их антигенсвязывающих фрагментов в композиции являются афукозилированными.

В данном изобретении также предоставлена фармацевтическая композиция, содержащая

(i) антитела или антигенсвязывающие фрагменты, представленные в данном изобретении; и
(ii) фармацевтически приемлемый наполнитель, при этом по меньшей мере 95% антител или их антигенсвязывающих фрагментов в композиции являются афукозилированными.

В данном изобретении также предложена фармацевтическая композиция, содержащая

(i) антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связываются с B7-H4 человека и содержат последовательности определяющего комплементарность участка (CDR) 1 варибельного участка тяжелой цепи (VH), CDR2 VH, CDR3 VH и CDR1, CDR2 и CDR3 варибельного участка легкой цепи (VL) из SEQ ID NO: 458-463 соответственно; и

(ii) фармацевтически приемлемый наполнитель, при этом по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, при по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% антител или их антигенсвязывающих фрагментов в композиции являются афукозилированными.

В одном варианте осуществления изобретения

(i) антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит варибельный участок тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 464, и варибельный участок легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 42; или

(ii) антитело содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 469, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 44.

В данном изобретении также предложена фармацевтическая композиция, содержащая

(i) антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связываются с B7-H4 человека и содержат последовательности определяющего комплементарность участка (CDR) 1 варибельного участка тяжелой цепи (VH), CDR2 VH, CDR3 VH и CDR1, CDR2 и CDR3 варибельного участка легкой цепи (VL) из SEQ ID NO: 458-463 соответственно; и

(ii) фармацевтически приемлемый наполнитель, при этом по меньшей мере 95% антител или их антигенсвязывающих фрагментов в композиции являются афукозилированными.

В одном варианте осуществления данного изобретения

(i) антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат варибельный участок тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 464, и варибельный участок легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 42; или

(ii) антитело содержащее тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 469, и легкую цепи, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 44.

В данном изобретении также предложена фармацевтическая композиция, содержащая

(i) антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связываются с B7-H4 человека и содержат последовательности определяющего комплементарность участка (CDR) 1 варибельного участка тяжелой цепи (VH), CDR2 VH, CDR3 VH и CDR1, CDR2 и CDR3 варибельного участка легкой цепи (VL) из SEQ ID NO: 35-40 соответственно; и

(ii) фармацевтически приемлемый наполнитель, при этом по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, при по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% антител или их антигенсвязывающих фрагментов в композиции являются афукозилированными.

В одном варианте осуществления изобретения

(i) антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат варибельный участок тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 41, и варибельный участок легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 42; или

(ii) антитело содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 43, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 44.

В данном изобретении также предложена фармацевтическая композиция, содержащая

(i) антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связываются с В7-Н4 человека и содержат последовательности определяющего комплементарность участка (CDR) 1 варибельного участка тяжелой цепи (VH), CDR2 VH, CDR3 VH и CDR1, CDR2 и CDR3 варибельного участка легкой цепи (VL) из SEQ ID NO: 35-40 соответственно; и

(ii) фармацевтически приемлемый наполнитель, в которой по меньшей мере 95% антител или их антигенсвязывающих фрагментов находятся в композиции в афукозилированном состоянии.

В одном варианте осуществления изобретения

(i) антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат варибельный участок тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 41, и варибельный участок легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 42; или

(ii) антитело содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 43, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 44.

В данном изобретении также предложена фармацевтическая композиция, содержащая

(i) антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связываются с В7-Н4 человека и содержат последовательности определяющего комплементарность участка (CDR) 1 варибельного участка тяжелой цепи (VH), CDR2 VH, CDR3 VH и CDR1, CDR2 и CDR3 варибельного участка легкой цепи (VL) из SEQ ID NO: 65-70 соответственно; и

(ii) фармацевтически приемлемый наполнитель, при этом по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% антител или их антигенсвязывающих фрагментов в композиции являются афукозилированными.

В одном варианте осуществления изобретения

(i) антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат варибельный участок тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 71, и варибельный участок легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 72, или

(ii) причем антитело содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 73, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 74.

В данном изобретении также предложена фармацевтическая композиция, содержащая

(i) антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связываются с В7-Н4 человека и содержат последовательности определяющего комплементарность участка (CDR) 1 варибельного участка тяжелой цепи (VH), CDR2 VH, CDR3 VH и CDR1, CDR2 и CDR3 варибельного участка легкой цепи (VL) из SEQ ID NO: 65-70 соответственно; и

(ii) фармацевтически приемлемый наполнитель, в которой по меньшей мере 95% антител или их антигенсвязывающих фрагментов находятся в композиции в афукозилированном состоянии.

В одном варианте осуществления изобретения

(i) антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат варибельный участок тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 71, и варибельный участок легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 72; или

(ii) причем антитело содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 73, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 74. В одном варианте осуществления данного изобретения фукозилирование не обнаружено в композиции.

В данном изобретении также предложен способ индукции пролиферации Т-клеток, включающий приведение в контакт Т-клетки с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, представленным в данном изобретении, конъюгатом, представленным в данном изобретении, полинуклеотидом, представленным в данном изобретении, вектором, представленным в данном изобретении, клеткой-хозяином, предоставленной в данном изобретении, или фармацевтической композицией, предоставленной в данном изобретении. В одном варианте осуществления данного изобретения пролиферация Т-клеток снижается, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 70% или по меньшей мере на 80% (например, по сравнению с обработкой контрольным антителом).

В данном изобретении также предложен способ индукции пролиферации CD4+ Т-клеток, включающий приведение в контакт CD4+ Т-клетки с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, представленным в данном изобретении, конъюгатом, представленным в данном изобретении, полинуклеотидом, представленным в данном изобретении, вектором, представленным в данном изобретении, клеткой-хозяином, предоставленной в данном изобретении, или фармацевтической композицией, предоставленной в данном изобретении. В одном варианте осуществления данного изобретения пролиферация CD4+

Т-клеток снижается, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 70% или по меньшей мере на 80% (например, по сравнению с обработкой контрольным антителом).

В данном изобретении также предложен способ индукции пролиферации CD8+ Т-клеток, вклю-

чающий приведение в контакт CD8+ Т-клетки с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, представленным в данном изобретении, полинуклеотидом, представленным в данном изобретении, вектором, представленным в данном изобретении, клеткой-хозяином, предоставленной в данном изобретении, или фармацевтической композицией, предоставленной в данном изобретении. В одном варианте осуществления данного изобретения пролиферация CD8+ Т-клеток снижается, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 70% или по меньшей мере на 80% (например, по сравнению с обработкой контрольным антителом).

В данном изобретении также предложен способ индукции образования гамма-интерферона, включающий приведение в контакт Т-клетки с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, представленным в данном изобретении, полинуклеотидом, представленным в данном изобретении, вектором, представленным в данном изобретении, клеткой-хозяином, предоставленной в данном изобретении, или фармацевтической композицией, предоставленной в данном изобретении. В одном варианте осуществления данного изобретения продукция гамма-интерферона увеличивается, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 70% или по меньшей мере на 80% (например, по сравнению с обработкой контрольным антителом).

В данном изобретении также предложен способ уничтожения клетки, экспрессирующей В7-Н4, включающий приведение в контакт клетки с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, представленным в данном изобретении, полинуклеотидом, представленным в данном изобретении, вектором, представленным в данном изобретении, клеткой-хозяином, предоставленной в данном изобретении, или фармацевтической композицией, предоставленной в данном изобретении. В данном изобретении также представлен способ деплетирования В7-Н4-экспрессирующих клеток из популяции клеток, включающий приведение в контакт популяции клеток с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, представленным в данном изобретении, полинуклеотидом, представленным в данном изобретении, вектором, представленным в данном изобретении, клеткой-хозяином, предоставленной в данном изобретении, или фармацевтической композицией, предоставленной в данном изобретении. В одном варианте осуществления данного изобретения уничтожение или деплетирование происходит через АЗКЦ.

В одном варианте осуществления данного изобретения приведение в контакт происходит *in vitro*. В одном варианте осуществления данного изобретения приведение в контакт происходит у субъекта.

В данном изобретении также предложено применение для лечения рака у субъекта, включающее введение субъекту эффективного количества антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, представленного в данном изобретении, конъюгата, представленного в данном изобретении, полинуклеотида, представленным в данном изобретении, вектором, представленным в данном изобретении, клетки-хозяина, предоставленного в данном изобретении, или фармацевтической композиции, предоставленной в данном изобретении. В одном варианте осуществления данного изобретения рак выбран из группы, состоящей из рака молочной железы, такого как тройной негативный рак молочной железы или инвазивный рак протоков, рак эндометрия, рак яичников, немелкоклеточный рак легких, рак поджелудочной железы, рак щитовидной железы, рак почки и мочевого пузыря рак. В одном варианте осуществления данного изобретения рак молочной железы представляет собой тройной негативный рак молочной железы, или при этом немелкоклеточный рак легкого представляет собой плоскоклеточный рак. В одном варианте осуществления данного изобретения немелкоклеточный рак легкого представляет собой аденокарциному. В одном варианте осуществления данного изобретения рак выбран из группы, состоящей из рака головы и шеи, мелкоклеточного рака легкого, рака желудка и меланомы. В одном варианте осуществления данного изобретения рак яичника представляет собой серозную аденокарциному. В одном варианте осуществления данного изобретения рак молочной железы представляет собой аденокарциному протоков.

В одном варианте осуществления данного изобретения рак представляет собой не отвечающий требованиям ингибитора PD-1, и/или не отвечающий требованиям ингибитора PD-L1. В одном варианте осуществления данного изобретения рак экспрессирует низкий уровень PD-L1.

В одном варианте осуществления данного изобретения субъект является человеком.

Также в данном изобретении представлен способ обнаружения В7-Н4 в образце, включающий приведение в контакт указанного образца с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, представленным в данном изобретении. В одном варианте осуществления данного изобретения образец получают из рака субъекта-человека.

В данном изобретении также предоставлен набор, содержащий антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, представленный в данном изобретении, полинуклеотид, представленный в данном изобретении, вектор, представленный в данном изобретении, клетка-хозяин, представленная в данном изобретении, или фармацевтическая композиция, представленная в данном изобретении, и

- a) реагент для детекции;
- b) антиген В7-Н4;
- c) уведомление, которое отражает одобрение использования или продажи для введения человеку; или
- d) их комбинация.

В данном изобретении также предлагается выделенное антитело или его антигенсвязывающий

фрагмент, или конъюгат, представленный в данном изобретении, при этом антитело или его антигенсвязывающий фрагмент ингибирует активность блокады Т-клеточной контрольной точки В7-Н4. В одном варианте осуществления данного изобретения активность блокады Т-клеточной контрольной точки измеряют по увеличению продукции ИЛ-2 по сравнению с контрольными клетками. В данном изобретении также предлагается фармацевтическая композиция, содержащая

- (i) антитела или антигенсвязывающие фрагменты; и
- (ii) фармацевтически приемлемый наполнитель, при этом антитела или антигенсвязывающие фрагменты ингибируют активность блокады Т-клеточной контрольной точки В7-Н4.

В варианте осуществления данного изобретения активность блокады Т-клеточной контрольной точки измеряют по увеличению продукции ИЛ-2 по сравнению с контрольными клетками.

Краткое описание графических материалов

На фиг. 1А продемонстрирована экспрессия В7-Н4 в различных опухолевых тканях (см. пример 1).

На фиг. 1В продемонстрирована распространенность В7-Н4 при различных типах опухолей по данным ИГХ (см. пример 1).

На фиг. 2А продемонстрировано связывание антител В7-Н4 с клетками НЕК293Т, экспрессирующими В7-Н4 человека, яванского макака или мыши (см. пример 6).

На фиг. 2В продемонстрировано связывание антител В7-Н4 с клетками SK-BR-3 и с клетками НЕК293Т, экспрессирующими В7-Н4 мыши, яванского макака или крысы (см. пример 6).

На фиг. 3А продемонстрировано влияние антител В7-Н4 на пролиферацию CD4⁺, CD8⁺ или общего количества Т-клеток (см. пример 7).

На фиг. 3В продемонстрировано влияние антител В7-Н4 на продукцию интерферона-гамма (ИФН γ) (см. пример 7).

На фиг. 3С продемонстрировано влияние антител В7-Н4 на пролиферацию CD4⁺, CD8⁺ или общего количества Т-клеток и на продукцию интерферона-гамма (ИФН γ) (см. пример 7).

На фиг. 3D продемонстрировано влияние различных концентраций антител В7-Н4 на продукцию интерферона-гамма (ИФН γ) (см. пример 7).

На фиг. 4А-4D продемонстрировано связывание фукозилированных и афукозилированных антител с В7-Н4 на клетках SK-BR-3 (фиг. 4А) и с клетками НЕК293Т, экспрессирующими В7-Н4 мыши (фиг. 4В), яванского макака (фиг. 4С) или крысы (фиг. 4D) (см. пример 9).

На фиг. 5А и 5В продемонстрировано связывание афукозилированных и фукозилированных антител В7-Н4 (соответственно) с аллелем V158 рецептора IIIa (Fc γ RIIIa) человека Fc γ (см. пример 10).

На фиг. 6А продемонстрирована активность блокады Т-клеточной контрольной точки фукозилированных и афукозилированных антител В7-Н4 (см. пример 11).

На фиг. 6В продемонстрирована активность лиганда контрольной точки Т-клеток афукозилированных антител В7-Н4 по сравнению с клетками, обработанными изотипическим контролем, по данным продукции ИЛ-2 (см. пример 11).

На фиг. 7 продемонстрирована активность АЗКЦ фукозилированных и афукозилированных антител В7-Н4 против линии клеток, экспрессирующих В7-Н4 (см. пример 12).

На фиг. 8 продемонстрирована активность АЗКЦ фукозилированных и афукозилированных антител В7-Н4 против клеток с различными уровнями экспрессии В7-Н4 (см. пример 13).

На фиг. 9А продемонстрирована противоопухолевая эффективность *in vivo* антитела В7-Н4 20502 (см. пример 14).

На фиг. 9В продемонстрирована противоопухолевая эффективность *in vivo* антитела В7-Н4 22213 (см. пример 14).

На фиг. 10 продемонстрирована противоопухолевая эффективность *in vivo* мышинной версии антитела В7-Н4 20502 у мышей, которым имплантированы клетки 4Т1 (рак молочной железы) и В16 (меланома) (см. пример 14).

На фиг. 11 продемонстрирована противоопухолевая эффективность *in vivo* афукозилированного 20502 в модели ксенотрансплантата рака молочной железы человека МХ-1. Изображения демонстрируют экспрессию В7-Н4 человека в опухоли ксенотрансплантата МХ-1 (слева) и экспрессию мышинного В7-Н4 в опухолях 4Т1 (справа) (см. пример 14).

На фиг. 12А-12С продемонстрирована противоопухолевая эффективность *in vivo* 20502-msIgG2a-F, введенного в тот же день, что и анти-PD-1 антитело (см. пример 15). * Обозначает $p < 0,05$; и **** обозначает $p < 0,0001$.

На фиг. 13 продемонстрировано, что лечение с афукозилированным 20502 (нижние вставки) приводит к инфильтрации НК-клетками (левые вставки), инфильтрации Т-клетками (центральные вставки) и повышению уровня PD-L1 (правые вставки) по сравнению с лечением с контрольным антителом (верхние вставки) (см. пример 16).

На фиг. 14А продемонстрировано, что антитело 20502-msIgG2a-F значительно снижает рост опухоли в клетках карциномы молочной железы 4Т1 в зависимости от дозы (см. пример 17).

На фиг. 14В продемонстрировано, что антитело 20502-msIgG2a-F значительно ингибирует рост

опухоли при 30 мг/кг (p=0,0003), 20 мг/кг (p=0,0103), 10 мг/кг (p=0,0419), 3 мг/кг (p=0,0277) и 1 мг/кг (p=0,0333) согласно оценке однонаправленным ANOVA на 30-й день (см. пример 17).

На фиг. 15A продемонстрировано, что антитело 20502-msIgG2a-F значительно снижает рост B16, экспрессирующих B7-H4/H3 (см. пример 17).

На фиг. 15B продемонстрировано, что антитело 20502-msIgG2a-F значительно ингибирует рост опухоли при 30 мг/кг (p=0,0085), 20 мг/кг (p=0,0041), 10 мг/кг (p=0,0017) и 3 мг/кг (p=0,0420) согласно оценке однонаправленным ANOVA на 23-й день (см. пример 17).

Подробное описание изобретения

В данном изобретении представлены антитела (например, моноклональные антитела) и их антиген-связывающие фрагменты, которые специфически связываются с B7-H4 (например, B7-H4 человека). Анти-B7-H4 антитела и их антигенсвязывающие фрагменты могут, например, приводить к активности блокады контрольных точек Т-клеток (например, измеряемой по увеличению интерферона-гамма (ИФН γ), пролиферации CD4 Т-клеток, пролиферации CD8 Т-клеток и/или пролиферации общего количества Т-клеток) и/или обладают антителозависимой клеточной цитотоксичностью (активность АЗКЦ). Также представлены выделенные нуклеиновые кислоты (полинуклеотиды), такие как комплементарная ДНК (кДНК), кодирующая такие антитела и их антигенсвязывающие фрагменты. Кроме того, представлены векторы (например, векторы экспрессии) и клетки (например, клетки-хозяева), содержащие нуклеиновые кислоты (полинуклеотиды), кодирующие такие антитела, и их антигенсвязывающие фрагменты.

Также представлены способы получения таких антител и их антигенсвязывающих фрагментов. В других аспектах в данном изобретении предлагаются способы лечения определенных состояний, таких как рак. Также предлагаются родственные композиции (например, фармацевтические композиции), наборы и способы обнаружения.

1.1. Терминология.

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

Используемый в данном изобретении термин "PD-1" относится к полипептидам PD-1 млекопитающих, включая, но не ограничиваясь этим, нативные полипептиды PD-1 и изоформы полипептидов PD-1. PD-1 также упоминается как белок 1 запрограммированной смерти или белок 1 запрограммированной смерти клеток. "PD-1" охватывает полноразмерные необработанные полипептиды PD-1, а также формы полипептидов PD-1, которые возникают в результате процессинга в клетке. Используемый в данном изобретении термин "PD-1 человека" относится к полипептиду, содержащему аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 439.

```
PGWFLDSPDR PWNPTFSPA LLVVTEDGNA TFTCSFSNTS ESFVLNWYRM
SPSNQTDKLA AFPEDRSQPG QDCRFRTVQL PNGRDFHMSV VRARRNDSGT
YLCGAISLAP KAQIKESLRA ELRVTERRAE VPTAHPSPPSP RPAGQFQTLV
VGVVGGLLGS LVLLVWVLAV ICSRAARGTI GARRTGQPLK EDPSAVPVFS
VDYGELDFQW REKTPEPPVP CVPEQTEYAT IVFPSGMGTS SPARRGSADG
PRSAQPLRPE DGHCSWPL (SEQ ID NO: 439)
```

(зрелый PD-1 человека без сигнальной последовательности).

"Полинуклеотид PD-1", "нуклеотид PD-1" или "нуклеиновая кислота PD-1" относятся к полинуклеотиду, кодирующему PD-1.

Термин "антитело" означает молекулу иммуноглобулина, которая распознает и специфически связывается с мишенью, такой как белок, полипептид, пептид, углевод, полинуклеотид, липид или их комбинации, по меньшей мере, через один сайт распознавания антигена в вариабельном участке молекулы иммуноглобулина. Используемый в данном изобретении термин "антитело" 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 относиться к любому из пяти основных классов иммуноглобулинов: IgA, IgD, IgE, IgG и IgM или их подклассы (изотипы) (например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и IgA2) на основании идентичности их константных доменов тяжелой цепи, называемых альфа, дельта, эпсилон, гамма и му соответственно. Различные классы иммуноглобулинов имеют разные и хорошо известные структуры субъединиц и трехмерные конфигурации. Антитела могут быть обнажены 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 "антигенсв-

звывающий участок" относится к части интактного антитела, которая связывается с антигеном. Антигенсвязывающий фрагмент может содержать антигенные определяющие участки интактного антитела (например, определяющие комплементарность участки (CDR)). 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 от любых видов животных, таких как грызуны (например, мышь, крыса или хомяк), и человека, или может быть получен искусственно.

Термины "анти-B7-H4 антитело", "антитело B7-H4" и "антитело, которое связывается с B7-H4" относятся к антителу, которое способно связывать B7-H4 с достаточной аффинностью, так что антитело может быть использовано в качестве диагностического и/или терапевтического средства для нацеливания на B7-H4. Степень связывания анти-B7-H4 антитела с неродственным белком, не относящимся к B7-H4, может составлять менее чем около 10% от связывания антитела с B7-H4, измеренного, например, радиоиммуноанализом (РИА).

Термины "анти-PD-1 антитело", "антитело PD-1" и "антитело, которое связывается с PD-1" относятся к антителу, которое способно связывать PD-1 с достаточной аффинностью, так что антитело может быть использовано в качестве диагностического и/или терапевтического средства для нацеливания на PD-1. Степень связывания анти-PD-1 антитела с неродственным белком, не относящимся к PD-1, может составлять менее чем около 10% от связывания антитела с PD-1, измеренного, например, радиоиммуноанализом (РИА). "Моноклональное" антитело или его антигенсвязывающий фрагмент относится к популяции гомогенных антител или антигенсвязывающих фрагментов, участвующих в высокоспецифичном распознавании и связывании 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 сайт узнавания антигена. 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, отбор фага, рекомбинантную экспрессию и трансгенных животных.

Используемые в данном изобретении термины "вариабельный участок" или "вариабельный домен" используются взаимозаменяемо и являются общими в данной области техники. Вариабельный участок обычно относится к части антитела, обычно 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 аминокислоты в зрелой легкой цепи, которые значительно различаются по последовательности среди антител и используются в связывании и специфичности конкретного антитела к его конкретному антигену. Изменчивость в последовательности сконцентрирована в тех участках, которые называются определяющими комплементарность участками (CDR), в то время как более высоко консервативные участки в вариабельном домене называются каркасными участками (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 данного изобретения вариабельный участок представляет собой вариабельный участок человека. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения вариабельный участок включает CDR грызунов или мышей и каркасные участки человека (FR). В конкретных вариантах осуществления данного изобретения, вариабельный участок представляет собой вариабельный участок примата (например, отличного от человека). В некоторых вариантах осуществления данного изобретения вариабельный участок содержит CDR грызунов или мышей и каркасные участки (FR) приматов (например, приматов, отличных от человека). Термины "VL" и "домен VL" используются взаимозаменяемо для обозначения вариабельного участка легкой цепи антитела.

Термины "VH" и "домен VH" используются взаимозаменяемо для обозначения вариабельного участка тяжелой цепи антитела.

Термин "нумерация по Кабату" и подобные термины известны в данной области и относятся к системе нумерации аминокислотных остатков в вариабельных участках тяжелой и легкой цепи антитела или его антигенсвязывающего фрагмента. В определенных аспектах CDR могут быть определены в соответствии с системой нумерации Кабат (см., например, Kabat E.A. & Wu T.T. (1971), *Ann. NY Acad. Sci.* 190:382-391; and 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), положения аминокислот от 50 до 65 (CDR2) и положения 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 данного изобретения CDR антител, описанных в данном изобретении, были определены в соответствии со схемой нумерации по Кабату.

Хотиа ссылается вместо этого на расположение структурных петель (Chothia and Lesk, J. Mol. Biol., 196:901-917 (1987)). Конец петли CDR-H1 по Хотиа при нумерации с использованием соглашения о нумерации по Кабату варьируется между H32 и H34 в зависимости от длины петли (это связано с тем, что схема нумерации по Кабату размещает вставки в H35A и H35B; если ни 35A, ни 35B не присутствуют, петля заканчивается на 32; если присутствует только 35A, петля заканчивается на 33; если присутствует обе 35A и 35B, петля заканчивается на 34). Гипервариабельные участки AbM представляют собой компромисс между CDR по Кабату и структурными петлями по Хотиа и используются программным обеспечением для моделирования антител AbM Oxford Molecular.

Петля	Кабат	AbM	Хотиа
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
		(Нумерация по Кабат)	
H1	H31-H35	H26-H35	H26-H32
		(Нумерация по Хотиа)	
H2	H50-H65	H50-H58	H52-H56
H3	H95-H102	H95-H102	H95-H102

Используемый в данном изобретении термин "константный участок" или "константный домен" являются взаимозаменяемыми и имеют общее значение в данной области техники. Константный участок представляет собой часть антитела, например карбоксильную концевую часть легкой и/или тяжелой цепи, которая непосредственно не участвует в связывании антитела с антигеном, но которая может проявлять различные эффекторные функции, такие как взаимодействие с Fc-рецептором. Константный участок молекулы иммуноглобулина обычно имеет более консервативную аминокислотную последовательность относительно вариабельного домена иммуноглобулина. В определенных аспектах антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит константный участок или его часть, достаточный для антителозависимой клеточно-опосредованной цитотоксичности (АЗКЦ).

Используемый в данном изобретении термин "тяжелая цепь" при использовании в отношении антитела может относиться к любому отдельному типу, например, альфа (α), дельта (δ), эpsilon (ϵ), гамма (γ) и мю (μ), на основе 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 тяжелой цепи хорошо известны в данной области. В конкретных вариантах осуществления данного изобретения, тяжелая цепь представляет собой тяжелую цепь человека.

Используемый в данном изобретении, термин "легкая цепь" при использовании в отношении антитела может относиться к любому отдельному типу, например, каппа (κ) или лямбда (λ) на основе аминокислотной последовательности константных доменов. Аминокислотные последовательности легкой цепи хорошо известны в данной области. В конкретных вариантах осуществления данного изобретения, легкая цепь представляет собой легкую цепь человека.

Термин "химерные" антитела или их антигенсвязывающие фрагменты относятся к антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, при этом аминокислотная последовательность происходит из двух или более видов. Как правило, вариабельный участок легкой и тяжелой цепей соответствует вариабельному участку 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 участки гомологичны последовательностям антител или их антигенсвязывающих фрагментов, полученных от другого (обычно человека), чтобы избежать иммунного ответа у этого вида.

Термин "гуманизованное" антитело или его антигенсвязывающий фрагмент относится к формам отличных от человека (например, мышинных) антител или антигенсвязывающих фрагментов, которые представляют собой специфические цепи иммуноглобулинов, химерные иммуноглобулины или их фрагменты, которые содержат минимальное количество отличной от человека (например, мышинной) последовательности. Как правило, гуманизованное антитело или его антигенсвязывающие фрагменты представляют собой человеческие иммуноглобулины, в которых остатки из определяющего комплементарность участка (CDR) заменены остатками из CDR отличного от человека вида (например, мыши, крысы, кролика, хомяка), которые имеют желаемую специфичность, аффинность и способность ("привитая

CDR") (Jones et al., Nature, 321:522-525 (1986); Riechmann et al., Nature, 332:323-327 (1988); Verhoeyen et al., Science, 239:1534-1536 (1988)). В некоторых случаях остатки каркасного участка Fv (FR) человеческого иммуноглобулина заменяются соответствующими остатками в антителе или фрагменте отличного от человека вида, который обладает желаемой специфичностью, аффинностью и способностью. Гуманизованное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент могут быть дополнительно модифицированы путем замены дополнительных остатков либо в каркасном участке Fv, и/или внутри замещенных отличных от человека остатков, чтобы очистить и оптимизировать антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, специфичность, аффинность, и/или способность. В общем, гуманизованное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент будет содержать по существу все по меньшей мере один, и, как правило, два или три переменных домена, содержащие все или по существу все участки CDR, которые соответствуют отличному от человека иммуноглобулину, тогда как все или по существу все участки FR являются участками консенсусной последовательности человеческого иммуноглобулина. Гуманизованное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент также могут содержать по меньшей мере часть константного участка или домена иммуноглобулина (Fc), обычно иммуноглобулина человека. Примеры способов, используемых для получения 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 данного изобретения "гуманизованное антитело" представляет собой антитело с измененной поверхностью.

Термин "человеческое" антитело или его антигенсвязывающий фрагмент означает антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, имеющие аминокислотную последовательность, полученную из локуса гена иммуноглобулина человека, при этом такое антитело или антигенсвязывающий фрагмент получают с использованием любого метода, известного в данной области техники. Это определение антитела человека или его антигенсвязывающего фрагмента включает интактные или полноразмерные антитела и их фрагменты.

"Афукозилированное" антитело или его антигенсвязывающий фрагмент или антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, "лишенные фукозы", относится к антителу изотипа IgG1 или IgG3 или его антигенсвязывающему фрагменту, в котором отсутствует гликозилирование константного участка фукозы. Гликозилирование человеческого IgG1 или IgG3 происходит в Asn297 в виде гликозилирования олигосахарида центрального фукозилированного биантеннального комплекса, оканчивающегося до 2 Gal-остатков. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения афукозилированное антитело лишено фукозы в Asn297. Эти структуры обозначены как остатки гликана G0, G1 (а 1,6 или 1,3) или G2 в зависимости от количества концевых остатков Gal. См., например, Raju, T.S., BioProcess Int., 1:44-53 (2003). Гликозилирование типа CHO Fc антитела описано, например, в Routier, F.FL, Glycoconjugate J., 14:201-207 (1997).

Способы измерения фукозы включают любые способы, известные в данной области. Для целей данного изобретения фукозу обнаруживают способом, описанным в примере 1 WO 2015/017600, который полностью включен в данное описание посредством ссылки. Вкратце анализ гликанов осуществляют путем высвобождения гликанов из антитела (например, путем ферментативного высвобождения), маркировки гликанов антралиловой кислотой (2-AA) и затем очистки меченых гликанов. ВЭЖХ с нормальной фазой с флуоресцентным детектированием используют для разделения гликанов и измерения относительного количества каждого гликана в антителе. Гликаны могут быть положительно идентифицированы как лишенные или включающие фукозу с помощью масс-спектрометрии. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения фукоза не обнаруживается в композиции, содержащей множество афукозилированных антител или их антигенсвязывающих фрагментов. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения афукозилированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент обладает повышенной активностью АЗКЦ, что может быть измерено с помощью анализа, приведенного в примере 12 данного изобретения. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения афукозилированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент обладает повышенной аффинностью к Fc-гамма RIIIА. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения афукозилированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент обладает повышенной аффинностью к Fc-гамма RIIIА(V158). В некоторых вариантах осуществления данного изобретения афукозилированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент обладает повышенной аффинностью к Fc-гамма RIIIА(F158). Аффинность к Fc-гамма RIIIА или его аллелям можно измерить с помощью анализа, приведенного в примере 10 данного изобретения.

"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, как используется в данном изобретении, "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 своему партнеру Y обычно может быть представлена константой диссоциации (K_D). Аффинность может быть измерена и/или выражена несколькими способами, известными в данной области, включая, но не ограничиваясь этим, константу рав-

новесной диссоциации (K_D) и константу равновесной ассоциации (K_A). K_D рассчитывается по коэффициенту k_{off}/k_{on} , тогда как K_A рассчитывается по коэффициенту 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 из антигена. k_{on} и k_{off} могут быть определены способами, известными специалисту в данной области, такими как VIAsofe® или KinExA.

Используемый в данном изобретении термин "эпитоп" является термином в данной области и относится к локализованному участку антигена, с которым 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 участков полипептида или полипептидов (конформационный, нелинейный, прерывистый или несмежный эпитоп). В некоторых вариантах осуществления данного изобретения эпитоп, с которым связывается антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, может быть определен, например, с помощью ЯМР-спектроскопии, исследований дифракционной кристаллографии, анализов ИФА, обмена водорода/дейтерия в сочетании с масс-спектрометрией (например, жидкостная хроматография, электрораспылительная масс-спектрометрия), анализов на основе олигопептидного сканирования на основе матрицы и/или картирования мутагенеза (например, картирование сайт-направленного мутагенеза). Для рентгеновской кристаллографии кристаллизация может быть выполнена с использованием любого из известных в данной области способов (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). Антитело/его антигенсвязывающий фрагмент: кристаллы антигена 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, distributed by Molecular Simulations, Inc.; see, e.g., *Meth. Enzymol.* (1985), vol. 114 & 115, eds Wyckoff HW 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 картирования мутагенеза могут быть выполнены с использованием любого способа, известного специалисту в данной области. 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 способа мутагенеза, включая способы аланинового сканирующего мутагенеза. Антитело В7-Н4, которое "связывается с тем же эпитопом", что и эталонное антитело В7-Н4, относится к антителу, которое связывается с теми же аминокислотными остатками В7-Н4, что и эталонное антитело В7-Н4. Способность антитела В7-Н4 связываться с тем же эпитопом, что и эталонное антитело В7-4, определяется анализом обмена водорода/дейтерия (см. Coales et al., *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 2009, 23:639-647).

Используемые в данном изобретении термины "иммуноспецифически связывает", "иммуноспецифически распознает", "специфически связывает" и "специфически распознает" 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 В7-Н4 человека (SEQ ID NO: 1), может также связываться с В7-Н4 от других видов (например, обезьяны *synomolgous*, мыши и/или крысы В7-Н4), и/или В7-Н4 белками, продуцируемыми из других аллелей человека, но степень связывания с несвязанным белком, не относящимся к В7-Н4 (например, другими членами семейства белков В7, такими как PD-L1), составляет менее чем около 10% связывания антитела к В7-Н4, как измерено, например, радиоиммуноанализом (РИА).

В конкретном варианте осуществления данного изобретения представлено антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который связывается с В7-Н4 человека, яванского макака, мыши и крысы.

Считается, что антитело "конкурентно ингибирует" связывание эталонного антитела с данным эпитопом, если оно предпочтительно связывается с этим эпитопом или перекрывающимся эпитопом в той степени, в которой оно, до некоторой степени, блокирует связывание эталонного антитела с эпитопом. Конкурентное ингибирование может быть определено любым способом, известным в данной области, например, конкурентными анализами ИФА. Можно сказать, что антитело конкурентно ингибирует связывание эталонного антитела с данным эпитопом по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 60% или по меньшей мере на 50%.

Полипептид, антитело, полинуклеотид, вектор, клетка или композиция, которая "выделена", представляет собой полипептид, антитело, полинуклеотид, вектор, клетку или композицию, которая находится в форме, не встречающейся в природе. Выделенные полипептиды, антитела, полинуклеотиды, векторы, клетки или композиции включают те, которые были очищены до такой степени, что они больше не находятся в форме, в которой они встречаются в природе. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения антитело, полинуклеотид, вектор, клетка или композиция, которые выделены, являются по существу чистыми. Используемый в данном изобретении термин "по существу чистый" 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 данном изобретении взаимозаменяемо для обозначения полимеров аминокислот любой длины. Полимер может быть линейным или разветвленным, он может содержать модифицированные аминокислоты, и он может прерываться не аминокислотами. Термины также охватывают аминокислотный полимер, который был модифицирован естественным путем или путем вмешательства; например, образованием дисульфидной связи, гликозилированием, липидированием, ацелированием, фосфорилированием или любыми другими манипуляциями или модификациями, такими как конъюгация с метящим компонентом. В определение также включены, например, полипептиды, содержащие один или более аналогов аминокислоты (включая, например, неприродные аминокислоты и т.д.), а также другие модификации, известные в данной области. Понятно, что поскольку полипептиды по данному изобретению основаны на антителах, в некоторых вариантах осуществления данного изобретения полипептиды могут встречаться в виде отдельных цепей или связанных цепей.

"Процент идентичности" относится к степени идентичности между двумя последовательностями (например, аминокислотными последовательностями или последовательностями нуклеиновых кислот). Процент идентичности может быть определен путем выравнивания двух последовательностей, введения пробелов для максимизации идентичности между последовательностями. Выравнивания могут быть созданы с использованием программ, известных в данной области техники. Для целей данного описания выравнивание нуклеотидных последовательностей может быть выполнено с помощью программы blastn, установленной с параметрами по умолчанию, а выравнивание аминокислотных последовательностей может быть выполнено с программой blastp, установленной с параметрами по умолчанию (см. Национальный центр биотехнологической информации (NCBI) во всемирной сети Интернет, ncbi.nlm.nih.gov). Используемый в данном изобретении термин "клетка-хозяин" может представлять собой клетку любого типа, например, первичную клетку, клетку в культуре или клетку из клеточной линии. В конкретных вариантах осуществления данного изобретения, 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 влияний окружающей среды, которые могут возникнуть в последующих поколениях, или интеграции молекулы нуклеиновой кислоты в геном клетки-хозяина.

Термин "фармацевтическая композиция" относится к препарату, который находится в такой форме, при которой биологическая активность активного ингредиента эффективна, и который не содержит никаких дополнительных компонентов, которые являются неприемлемо токсичными для субъекта, которому будет вводиться композиция. Состав может быть стерильным.

Термины "вести", "вводить", "введение" и т.п., используемые в данном изобретении, относятся к способам, которые можно использовать для обеспечения доставки лекарственного средства, например, анти-B7-H4 антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, на желаемый сайт биологического действия (например, внутривенное введение). Способы введения, которые можно применять с агентами и способами, описанными в данном изобретении, можно найти, например, в Goodman and Gilman, *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, текущее издание, Pergamon; и Remington's, *Pharmaceutical Sciences*, текущее издание, Mack Publishing Co., Истон, Пенсильвания.

Введение "в сочетании с" одним или более дополнительными терапевтическими агентами включает одновременное (одновременное) или последовательное введение в любом порядке.

Комбинированная терапия может обеспечивать "синергизм", т.е. эффект, достигаемый, когда активные агенты, используемые вместе, больше, чем сумма эффектов, которые являются результатом использования активных агентов по отдельности. Синергетический эффект может быть достигнут, когда активными агентами являются

- (1) совместно составленные и вводимые или доставленные одновременно в комбинированной дозированной лекарственной форме;
- (2) доставленные последовательно, поочередно или параллельно в виде отдельных составов; или
- (3) по какой-либо другой схеме.

При доставке в альтернативной терапии синергетический эффект может быть достигнут, когда активные агенты вводятся или доставляются последовательно, например, посредством различных инъекций в отдельных шприцах. "Синергетическая комбинация" дает эффект, который больше, чем сумма эффектов отдельных активных агентов комбинации. Комбинированная терапия может обеспечить "аддитивный" эффект, т.е. эффект, достигаемый, когда активные агенты, используемые вместе, равен сумме эффектов, возникающих в результате использования активных агентов по отдельности. Используемые в данном изобретении термины "субъект" и "пациент" используются взаимозаменяемо. Субъектом может быть животное. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения 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 данного

изобретения субъект представляет собой яванского макака. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения субъект представляет собой человек. Термин "терапевтически эффективное количество" относится к количеству лекарственного средства, например, анти-B7-H4 антитела 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 тяжесть опухоли; ингибировать (т.е. замедлять до некоторой степени и в определенном варианте осуществления данного изобретения, останавливать) инфильтрацию раковых клеток в периферические органы; ингибировать (т.е. замедлять до некоторой степени и в определенном варианте осуществления данного изобретения, останавливать) метастазирование опухоли;

ингибировать до некоторой степени рост опухоли; облегчить до некоторой степени один или более симптомов, связанных с раком; и/или приводить к благоприятному ответу, такому как увеличение выживаемости без прогрессирования (PFS), выживаемости без заболевания (DFS) или общей выживаемости (OS), полному ответу (CR), частичному ответу (PR) или, в некоторых случаях, стабилизации заболевания (SD), уменьшения прогрессирования заболевания (PD), уменьшения времени до прогрессирования (TTP) или любой их комбинации. 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" или "лечение" или "лечить" или "облегчение" или "облегчать" относятся к терапевтическим мерам, которые излечивают, замедляют, уменьшают симптомы и/или останавливают прогрессирование диагностированного патологического состояния или расстройства. Таким образом, те, кто нуждается в лечении, включают тех, у кого уже диагностировано или есть подозрение на наличие расстройства. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения субъект успешно "лечится" от рака в соответствии со способами по данному изобретению, если пациент демонстрирует одно или более из следующего: уменьшение количества или полное отсутствие раковых клеток; уменьшение размера опухоли; ингибирование или отсутствие инфильтрации раковых клеток в периферические органы, включая, например, распространение рака в мягкие ткани и кости; ингибирование 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 неопухоловое состояние; увеличение выживаемости без прогрессирования (PFS), выживаемости без заболевания (DFS) или общей выживаемости (OS), полного ответа (CR), частичного ответа (PR), стабилизации заболевания (SD), уменьшения прогрессирования заболевания (PD), уменьшения времени до прогрессирования (TTP) или любой их комбинации.

Термины "рак" и "раковый" относятся или описывают физиологическое состояние у млекопитающих, при котором популяция клеток характеризуется нерегулируемым ростом клеток. Примеры рака включают, но не ограничиваются ими, гинекологические раковые заболевания (например, рак молочной железы (включая тройной негативный рак молочной железы, рак протоков), рак яичников и рак эндометрия), мелкоклеточный рак легких, рак поджелудочной железы, рак щитовидной железы, рак почки (например, почечно-клеточный рак) и рак мочевого пузыря (например, уротелиоцитарный рак). Немелкоклеточный рак легкого может быть, например, аденокарциномой. Дополнительные примеры рака включают, например, рак головы и шеи, мелкоклеточный рак легкого, рак желудка, меланому, холангиокарциному, мультиформную глиобластому или глиобластому (GBM) и карциному клеток Меркеля. В одном варианте осуществления данного изобретения рак яичника представляет собой серозную аденокарциному. В одном варианте осуществления данного изобретения рак молочной железы представляет собой протоковую аденокарциному. Рак может представлять собой "рак, который экспрессирует B7-H4" или "рак, экспрессирующий B7-H4". Такие термины относятся к раку, включающему клетки, которые экспрессируют B7-H4. Рак может быть первичной опухолью или может быть распространенным или метастатическим раком.

"Рефрактерный" рак - это рак, который прогрессирует, несмотря на то, что противораковое лечение, такое как химиотерапия, назначается больному раком. "Рецидивирующий" рак - это рак, который возобновился либо в начальном, либо в отдаленном месте после ответа на начальную терапию.

"Рецидивирующий" пациент - это тот, у кого есть признаки или симптомы рака после ремиссии. Необязательно, у пациента возник рецидив после адьювантной или неоадьювантной терапии.

"Активность блокады Т-клеточной контрольной точки" означает блокирование или ингибирование активности или ответа Т-клеточной контрольной точки. Активность блокады Т-клеточной контрольной точки можно измерить в анализе искусственных антигенпрезентирующих клеток (иАПК) на основе изменений в продукции ИФН γ . Первичные человеческие Т-клетки могут быть обогащены МКПК с использованием набора для обогащения Т-клеток (такого как набор для обогащения Т-клеток EasySepTM человека или аналогичный набор). Обогащенные Т-клетки инкубируют с шариками (например, анти-CD3/анти-CD28 гранулами). Через некоторое время шарики магнитно удаляют, а Т-клетки промывают и инкубируют. Затем Т-клетки промывают и инкубируют вместе с искусственными антигенпрезентирующими

клетками (иАПК) в присутствии титрования дозы антитела В7-Н4. иАПК могут быть обработаны митомицином С, а затем тщательно промыты перед добавлением к совместной культуре Т-клеток. После совместного культивирования Т-клеток, иАПК и В7-Н4 антител планшеты можно центрифугировать, а супернатанты можно собирать и оценивать на предмет продуцирования ИФН с помощью ИФА. Продукция ИФН может быть нанесена на график в зависимости от концентрации антитела, а эффективность ЕС50 может быть рассчитана с использованием подгонки кривой нелинейной регрессии. Результаты могут быть измерены как ЕС50+/-STD в нМ. Активность блокады Т-клеточной контрольной точки антителами В7-Н4 может быть продемонстрирована увеличением продукции ИФН. "Активность блокады Т-клеточной контрольной точки" также можно измерить в анализе с использованием клеток, которые эндогенно экспрессируют В7-Н4. Первичные Т-клетки человека могут быть обогащены донорскими МКПК HLA-A2+ с использованием набора для выделения Т-клеток (например, набора для выделения Т-клеток человека Pan). Экспрессирующие MART-I TCR Т-клетки могут быть получены путем первой активации обогащенных Pan Т-клеток шариками (например, анти-CD3/анти-CD28 парамагнитные частицы Dynabeads), ИЛ-2 и ИЛ-7 в течение 48 ч. Затем активированные Т-клетки могут быть трансдуцированы MART-I TCR лентивирусными частицами в присутствии ИЛ-2, ИЛ-7 и полибрена. После трансдукции MART-I TCR+ Pan Т-клетки могут размножаться в течение определенного периода времени в присутствии ИЛ-2 и ИЛ-7. Для создания линий клеток-мишеней, экспрессирующих HLA-A2, эндогенные линии раковых клеток, экспрессирующих В7-Н4, могут быть трансдуцированы лентивирусными частицами HLA-A2 в течение периода времени (например, 48 ч). Кроме того, В7-Н4 может быть нокаутирован из линии клеток HLA-A2+. Затем MART-I TCR+ Pan Т-клетки можно совместно культивировать в присутствии различных клеточных линий-мишеней в соотношении 1:1 Е:Т, пептида MART-I и антитела В7-Н4 или изотипического контроля человека. После совместной инкубации планшеты могут быть центрифугированы, а супернатанты могут быть собраны и оценены на продуцирование ИЛ-2. Продукцию ИЛ-2 можно измерить с помощью стандартного набора для иммуноанализа (такого как анализ AlphaLISA или аналогичный анализ).

Как используется в данном описании и формуле изобретения, единственные формы включают множественные ссылки, если контекст явно не диктует иное. Понятно, что везде, где варианты осуществления данного изобретения описаны в данном изобретении на языке "содержащий", в противном случае также предоставляются аналогичные варианты осуществления данного изобретения, описанные в терминах "состоящий из" и/или "состоящий по существу из". В этом описании "содержит", "содержащий", "состоящий" и "имеющий" и т.п. может иметь значение, приписываемое им в США. Патентное право и может означать "включает", "включая" и т.п.; "состоящий по существу из" или "состоит по существу" также имеет значение, приписанное в США. Патентное право и термин имеют неограниченный срок действия, допускающий присутствие большего, чем то, что указано, при условии, что основные или новые характеристики того, что указано, не изменяется при наличии более чем то, что указано, но исключает предшествующие в технике способы осуществления изобретения. Если специально не указано или не очевидно из контекста, используемый в данном изобретении термин "или" понимается как включающий. Термин "и/или", как он используется в фразе, такой как "А и/или В", в данном изобретении предназначен для обозначения "А и В", "А или В", "А" и "В". Аналогично, термин "и/или", используемый в фразе, такой как "А, В и/или С", предназначен для охвата каждого из следующих вариантов осуществления данного изобретения: 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 (только); В (только); и С (только).

Используемые в данном изобретении термины "около" и "приблизительно", 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 данном изобретении, могут быть объединены с одной или более любыми другими композициями и способами, представленными в данном изобретении.

1.2. Антитела.

В конкретном аспекте в данном изобретении представлены антитела (например, моноклональные антитела, такие как химерные, гуманизированные или человеческие антитела) и их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связываются с В7-Н4 (например, В7-Н4 человека). Аминокислотные последовательности для В7-Н4 человека, яванского макака, мыши и крысы известны в данной области и также представлены в данном изобретении, как представлено SEQ ID NO: 1-4 соответственно.

В7-Н4 человека:

MASLGQILFWSIISIIILAGAIALIGFGISGRHSITVTTVASAGNIGEDGILSCTFEPDIKLS
 IVIQWLKEGVLGLVHEFKEGKDELSEQDEMFRGRTAVFADQVIVGNASLRLKNVQLTD
 AGTYKCYIITSKGKGNANLEYKTGAFSMPEVNVNDYNASSETLRCEAPRWFQPPTVVWA
 SQVDQGANFSEVSNTSFELNSENVTMKVVSVLNVNTINNTYSCMIENDIAKATGDIKVT
 ESEIKRRSHLQLLNSKASLCVSSFFAISWALLPLSPYLMLK (SEQ ID NO:1)

В7-Н4 яванского макака:

MASLGQILFWSIISIFILAGAIALIGFGISGRHSITVTTVASAGNIGEDGILSCTFEPDIKLS
 DIVIQWLKEGVIGLVHEFKEGKDELSEQDEMFRGRTAVFADQVIVGNASLRLKNVQLTD
 AGTYKCYIITSKGKGNANLEYKTGAFSMPEVNVNDYNASSETLRCEAPRWFQPPTVVWA
 SQVDQGANFSEVSNTSFELNSENVTMKVVSVLNVNTINNTYSCMIENDIAKATGDIKVT
 ESEIKRRSHLQLLNSKASLCVSSFLAISWALLPLAPYLMLK (SEQ ID NO:2)

В7-Н4 мыши:

MASLGQIIFWSIINIILAGAIALIGFGISGKHFITVTTFTSAGNIGEDGTLSCFEPDIKLN
 IVIQWLKEGIKGLVHEFKEGKDDLSQLHEMFRGRTAVFADQVVVGNASLRLKNVQLTD
 AGTYTCYIRITSKGKGNANLEYKTGAFSMPEINVDYNASSESLRCEAPRWFQPPTVAVAS
 QVDQGANFSEVSNTSFELNSENVTMKVVSVLNVNTINNTYSCMIENDIAKATGDIKVT
 SEVKRRSQLQLLNSGSPCVFSSAFVAGWALLSLSCCLMLR (SEQ ID NO:3)

В7-Н4 крысы:

MASLGQIIFWSIINVIILAGAIVLIIGFGISGKHFITVTTFTSAGNIGEDGTLSCFEPDIKLN
 GIVIQWLKEGIKGLVHEFKEGKDDLSQLHEMFRGRTAVFADQVVVGNASLRLKNVQLT
 DAGTYTCYIHTSKGKGNANLEYKTGAFSMPEINVDYNASSESLRCEAPRWFQPPTVAW
 ASQVDQGANFSEVSNTSFELNSENVTMKVVSVLNVNTINNTYSCMIENDIAKATGDIKV
 TDSEVKRRSQLELLNSGSPCVSSVSAAGWALLSLSCCLMLR (SEQ ID NO:4)

В определенных вариантах осуществления данного изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанный в данном изобретении, связывается с В7-Н4 человека. В некоторых вариантах осуществления данного изобретении, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с

В7-Н4 человека и яванского макака. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с В7-Н4 человека, мыши и крысы. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с В7-Н4 человека, яванского макака, мыши и крысы. В7-Н4 содержит эктодомен IgC (аминокислоты 153-241 SEQ ID NO: 1) и домен IgV (аминокислоты 35-146 SEQ ID NO: 1).

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанный в данном изобретении, связывается с доменом IgV В7-Н4 человека. Соответственно, в данном изобретении представлены антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые связываются с полипептидом, состоящим из аминокислот 35-146 SEQ ID NO: 1.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанный в данном изобретении, связывается с В7-Н4 человека и содержит шесть CDR антитела, перечисленных в табл. 1 и 2 (т.е. три CDR VH антитела, перечисленных в табл. 1, и три CDR VL одного и того же антитела перечислены в табл. 2).

Аминокислотные последовательности CDR VH 1

Антигено	CDR1 VH (SEQ ID NO:)	CDR2 VH (SEQ ID NO:)	CDR3 VH (SEQ ID NO:)
15461	GSISSSYYWG (SEQ ID NO:5)	NIYYSGSTYYNPSLKS (SEQ ID NO:6)	AREGSYPNWFDP (SEQ ID NO:7)
20500	GSIKSGSHYWG (SEQ ID NO:15)	NIYYSGSTYYNPSLRS (SEQ ID NO:16)	AREGSYPNWFDP (SEQ ID NO:17)
20501	GSIKSGSHYWG (SEQ ID NO:25)	NIYYSGSTYYNPSLKS (SEQ ID NO:26)	AREGSYPNWLDP (SEQ ID NO:27)
20502	GSIKSGSYYWG (SEQ ID NO:458)	NIYYSGSTYYNPSLRS (SEQ ID NO: 459)	AREGSYPNQFDP (SEQ ID NO: 460)
20502 1	GSIKSGSYYWG (SEQ ID NO: 35)	NIYYSGSTYYNPSLKS (SEQ ID NO: 36)	AREGSYPNQFDP (SEQ ID NO: 37)
22208	GSIKSGSHYWG (SEQ ID NO: 45)	NIYYSGSTYYNPSLKS (SEQ ID NO: 46)	AREGSYPNWFDP (SEQ ID NO: 47)
15462	GSISSSYYWG (SEQ ID NO: 55)	NIYYSGSTYYNPSLKS (SEQ ID NO: 56)	AREGSYTTVLNV (SEQ ID NO: 57)
22213	GSIGRGSYYWG (SEQ ID NO: 65)	NIYYSGSTYYNPSLKS (SEQ ID NO: 66)	AREGSYTTVLNV (SEQ ID NO: 67)
15465	GSISSGGYYWS (SEQ ID NO: 75)	NIYYSGSTYYNPSLKS (SEQ ID NO: 76)	ARESSTISADFDL (SEQ ID NO: 77)
20506	GSISHGGYYWS (SEQ ID NO: 85)	NIYYSGSTYYNPSLKS (SEQ ID NO: 86)	ARESSTISADFDL (SEQ ID NO: 87)
15483	GSISSGGYYWS (SEQ ID NO: 95)	NIYYSGSTYYNPSLKS (SEQ ID NO: 96)	ARGLSTIDEAFDP (SEQ ID NO: 97)
20513	GSISDGSYYWS (SEQ ID NO: 105)	NIYYSGSTYYNPSLRS (SEQ ID NO: 106)	ARGLSTIDEAFDP (SEQ ID NO: 107)
22216	GSISDGSYYWS (SEQ ID NO: 115)	NIYYSGSTYYNPSLRS (SEQ ID NO: 116)	ARGLSTIDEAFDP (SEQ ID NO: 117)
15489	GSISSYYWS (SEQ ID NO: 125)	YIYSSGSTNYNPSLKS (SEQ ID NO: 126)	ARGSGQYAAPDYG MDV (SEQ ID NO:
20516	GSIISSYYWG (SEQ ID NO: 135)	YIYSSGSTSYNPSLKS (SEQ ID NO: 136)	ARGSGLYAAPDYG LDV (SEQ ID NO:
15472	FTFSSYAMS (SEQ ID NO: 145)	TISGSGGSTYYADSVKG (SEQ ID NO: 146)	ARGAGHYDLVGR Y (SEQ ID NO: 147)
15503	FTFSSYAMS (SEQ ID NO: 155)	AISGSGGSTYYADSVKG (SEQ ID NO: 156)	ARVGFRALNY (SEQ ID NO: 157)
15495	GTFSSYAIS (SEQ ID NO: 165)	GIPIFGTASYAQKFQG (SEQ ID NO: 166)	ARQQYDGRRYFGL (SEQ ID NO: 167)
15478	GTFSSYAIS (SEQ ID NO: 175)	GIPIFGTANYAQKFQG (SEQ ID NO: 176)	ARGGPWFDP (SEQ ID NO: 177)
15441	FTFSSYAMS (SEQ ID NO: 185)	AISGSGGSTSYADSVKG (SEQ ID NO: 186)	AKPSLATMLAFDI (SEQ ID NO: 187)
20496	GSISSSVYYWS (SEQ ID NO: 195)	SILVSGSTYYNPSLKS (SEQ ID NO: 196)	ARAVSFLDV (SEQ ID NO: 197)

¹ CDR VH в табл. 1 определяются по Кабату.

Таблица 2

Аминокислотные последовательности CDR VL²

Антитело	CDR1 VL (SEQ ID NO:)	CDR2 VL (SEQ ID NO:)	CDR3 VL (SEQ ID NO:)
15461	RASQSVSSNLA (SEQ ID NO: 8)	GASTRAT (SEQ ID NO: 9)	QQYHSFPFT (SEQ ID NO: 10)
20500	RASQSVSSNLA (SEQ ID NO: 18)	GASTRAT (SEQ ID NO: 19)	QQYHSFPFT (SEQ ID NO: 20)
20501	RASQSVSSNLA (SEQ ID NO: 28)	GASTRAT (SEQ ID NO: 29)	QQYHSFPFT (SEQ ID NO: 30)
20502	RASQSVSSNLA (SEQ ID NO: 461)	GASTRAT (SEQ ID NO: 462)	QQYHSFPFT (SEQ ID NO: 463)
20502,1	RASQSVSSNLA (SEQ ID NO: 38)	GASTRAT (SEQ ID NO: 39)	QQYHSFPFT (SEQ ID NO: 40)
22208	RASQSVSTNLA (SEQ ID NO: 48)	DASARVT (SEQ ID NO: 49)	QQYHSFPFT (SEQ ID NO: 50)
15462	RASQSVSSSYLA (SEQ ID NO: 58)	GASSRAT (SEQ ID NO: 59)	QQAASYPLT (SEQ ID NO: 60)
22213	RASQSVASSHLA (SEQ ID NO: 68)	DAVSRAT (SEQ ID NO: 69)	QQAASYPLT (SEQ ID NO: 70)
15465	RASQGISRWLA (SEQ ID NO: 78)	AASSLQS (SEQ ID NO: 79)	QQAHTFPYT (SEQ ID NO: 80)
20506	RASQGISRWLA (SEQ ID NO: 88)	AASSLQS (SEQ ID NO: 89)	QQAHTFPYT (SEQ ID NO: 90)
15483	RASQSISSWLA (SEQ ID NO: 98)	KASSLES (SEQ ID NO: 99)	QQDNSYPYT (SEQ ID NO: 100)
20513	RASQSISSWLA (SEQ ID NO: 108)	KASSLES (SEQ ID NO: 109)	QQDNSYPYT (SEQ ID NO: 110)
22216	RASKSISSWLA (SEQ ID NO: 118)	EASSLHS (SEQ ID NO: 119)	QQDNSYPYT (SEQ ID NO: 120)
15489	RASQSISSWLA (SEQ ID NO: 128)	KASSLES (SEQ ID NO: 129)	QQDNSFPFT (SEQ ID NO: 130)
20516	RASQSISSWLA (SEQ ID NO: 138)	KASSLES (SEQ ID NO: 139)	QQDNSFPFT (SEQ ID NO: 140)
15472	RASQSISSYLN (SEQ ID NO: 148)	AASSLQS (SEQ ID NO: 149)	QQLYSLPPT (SEQ ID NO: 150)
15503	RASQDISSWLA (SEQ ID NO: 158)	AASSLQS (SEQ ID NO: 159)	QQATSYPPWT (SEQ ID NO: 160)
15495	RASQSVSSNLA (SEQ ID NO: 168)	SASTRAT (SEQ ID NO: 169)	QQVNVWPPT (SEQ ID NO: 170)
15478	RASQSISSWLA (SEQ ID NO: 178)	KASSLES (SEQ ID NO: 179)	QQYNSYPPFT (SEQ ID NO: 180)
15441	RASQSISSWLA (SEQ ID NO: 188)	DASSLES (SEQ ID NO: 189)	QQSKSYPRT (SEQ ID NO: 190)
20496	RASQSISSYLN (SEQ ID NO: 198)	GASSLQS (SEQ ID NO: 199)	QQSYDPPWT (SEQ ID NO: 200)

² CDR VL в табл. 2 определяются по Кабату.

В определенных вариантах осуществления данного изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанный в данном изобретении, связывается с B7-H4 человека и содержит VH антитела, указанного в табл. 3.

Таблица 3

Аминокислотные последовательности с варибельной тяжелой цепью (VH)

Антитело	Аминокислотная последовательность VH (SEQ ID NO)
15461	QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSSSYWGWIRQPPGK GLEWIGNIYYSGSTYYNPSLRSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTA DTAVYYCAREGSYPNWFDPWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO:11)
20500	QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSIKSGSHYWGWIRQPPG KGLEWIGNIYYSGSTYYNPSLRSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTA ADTAVYYCAREGSYPNWFDPWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO:21)
20501	QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSIKSGSHYWGWIRQPPG KGLEWIGNIYYSGSTYYNPSLRSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTA ADTAVYYCAREGSYPNWLDPWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO:31)
20502	QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSIKSGSYWGWIRQPPG KGLEWIGNIYYSGSTYYNPSLRSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTA ADTAVYYCAREGSYPNQFDPWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO:464)
20502,1	QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSIKSGSYWGWIRQPPG KGLEWIGNIYYSGSTYYNPSLRSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTA ADTAVYYCAREGSYPNQFDPWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO:41)
22208	QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSIKSGSHYWGWIRQPPG KGLEWIGNIYYSGSTYYNPSLRSRVTMSVDTSKNQFSLKLSSVT AADTAVYYCAREGSYPNWFDPWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO:51)
15462	QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSSSYWGWIRQPPGK GLEWIGNIYYSGSTYYNPSLRSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTA DTAVYYCAREGSYTTVLNVWGQGMVTVSS (SEQ ID NO:61)
22213	QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSIGRGSYWGWIRQPPG KGLEWIGNIYYSGSTYYNPSLRSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTA ADTAVYYCAREGSYTTVLNVWGQGMVTVSS (SEQ ID NO:71)

15465	QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGGSISSGGYYWSWIRQHPG KGLEWIGNIYYSGSTYYNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLSVTA ADTAVYYCARESSTISADFDLWGRGTLTVSS (SEQ ID NO:81)
20506	QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTASGGSSISHGGYYWSWIRQHPG KGLEWIGNIYYSGSTYYNPSLKSRTMSVDTSKNQFSLKLSVTA AADTAVYYCARESSTISADFDLWGRGTLTVSS (SEQ ID NO:91)
15483	QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGGSISSGGYYWSWIRQHPG KGLEWIGNIYYSGSTYYNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLSVTA ADTAVYYCARGLSTIDEAFDPWGQGTTLTVSS (SEQ ID NO:101)
20513	QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISDGSYYWSWIRQHPG KGLEWIGNIYYSGSTYYNPSLRSRTMSVDTSKNQFSLKLSVTA AADTAVYYCARGLSTIDEAFDPWGQGTTLTVSS (SEQ ID NO:111)
22216	QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGGSISDGSYYWSWIRQHPG KGLEWIGNIYYSGSTYYNPSLRSRTMSVDTSKNQFSLKLSVTA AADTAVYYCARGLSTIDEAFDPWGQGTTLTVSS (SEQ ID NO:121)
15489	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSYYWSWIRQPPGKG LEWIGYIYSSGSTNYNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLSVTAAD TAVYYCARGSGQYAAPDYGMDVWGQGTTLTVSS (SEQ ID NO:131)
20516	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISYIYWGWIRQPPGKG LEWIGYIYSSGSTSYNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLSVTAAD TAVYYCARGSGLYAAPDYGLDVWGQGTTLTVSS (SEQ ID NO:141)
15472	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGK GLEWVSTISGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLR AEDTAVYYCARGAGHYDLVGRYWGQGTTLTVSS (SEQ ID NO:151)
15503	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGK GLEWVSAISGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSL RAEDTAVYYCARVGFALNYWGQGTTLTVSS (SEQ ID NO:161)
15495	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFSSYAIWVRQAPGQ GLEWMGGIPIFGTASYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRS
	EDTAVYYCARQQYDGRRYFGLWGRGTLTVSS (SEQ ID NO:171)
15478	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFSSYAIWVRQAPGQ GLEWMGGIPIFGTANYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLR SEDTAVYYCARGGPWFDPWGQGTTLTVSS (SEQ ID NO:181)
15441	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGK GLEWVSAISGGSTSYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLR AEDTAVYYCAKPSLATMLAFDIWGQGTMTVTVSS (SEQ ID NO:191)
20496	QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSVYYWSWIRQPPGK GLEWIGSILVSGSTYYNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLSVTA ADTAVYYCARAVSFLDVWGQGTMTVTVSS (SEQ ID NO:201)

В определенных вариантах осуществления данного изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанный в данном изобретении, связывается с B7-H4 человека и содержит VL ан-

титела, указанного в табл. 4.

Таблица 4

Аминокислотные последовательности варибельной легкой цепи (VL)

Антитело	Аминокислотная последовательность VL (SEQ ID NO)
15461	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSNLAWYQQKPGQAP RLLIYGASTRATGIPARFSGSGSGTEFTLTISLQSEDFAVYYCQQ YHSFPFTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:12)
20500	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSNLAWYQQKPGQAP RLLIYGASTRATGIPARFSGSGSGTEFTLTISLQSEDFAVYYCQQ YHSFPFTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:22)
20501	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSNLAWYQQKPGQAP RLLIYGASTRATGIPARFSGSGSGTEFTLTISLQSEDFAVYYCQQ YHSFPFTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:32)
20502 и 20502,1	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSNLAWYQQKPGQAP RLLIYGASTRATGIPARFSGSGSGTEFTLTISLQSEDFAVYYCQQ YHSFPFTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:42)
22208	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSTNLAWYQQKPGQAP RLLIYDASARVTGIPARFSGSGSGTEFTLTISLQSEDFAVYYCQ QYHSFPFTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:52)
15462	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQA PRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQ QAASYPLTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:62)
22213	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVASSHLAWYQQKPGQA PRLLIYDAVSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYC QQAASYPLTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:72)
15465	DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISRWLAWYQQKPGKA PKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQ QAHTFPYTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:82)
20506	DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISRWLAWYQQKPGKA PKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQ QAHTFPYTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:92)
15483	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQSISSWLAWYQQKPGKAP KLLIYKASSLESGVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPDDEFATYYCQQ DNSYPYTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:102)
20513	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQSISSWLAWYQQKPGKAP KLLIYKASSLESGVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPDDEFATYYCQQ DNSYPYTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:112)
22216	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASKSISSWLAWYQQKPGKAP KLLIYEASSLHSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPDDEFATYYCQQ DNSYPYTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:122)
15489	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQSISSWLAWYQQKPGKAP KLLIYKASSLESGVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPDDEFATYYCQQ DNSFPFTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:132)

20516	DIQMTQSPSTLSASVGDRVITICRASQSISSWLAWYQQKPGKAP KLLIYKASSLESGVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPDDEFATYYCQQ DNSFPFTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:142)
15472	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASQSISSYLNWYQQKPGKAP KLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYCQ QLYSLPPTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:152)
15503	DIQLTQSPSSVSASVGDRVITICRASQDISSWLAWYQQKPGKAP KLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYCQ QATSYPPWTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:162)
15495	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSNLAWYQQKPGQAP
	RLLIYSASTRATGIPARFSGSGSGTEFTLTISLQSEDFAVYYCQQ VNVWPPTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:172)
15478	DIQMTQSPSTLSASVGDRVITICRASQSISSWLAWYQQKPGKAP KLLIYKASSLESGVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPDDEFATYYCQQ YNSYPPFTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:182)
15441	DIQMTQSPSTLSASVGDRVITICRASQSISSWLAWYQQKPGKAP KLLIYDASSLESGVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPDDEFATYYCQQ SKSYPRTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:192)
20496	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASQSISSYLNWYQQKPGKAP KLLIYGASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYCQ QSYDPPWTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:202)

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанный в данном изобретении, связывается с B7-H4 человека и содержит VH и VL антитела, перечисленного в табл. 3 и 4 (т.е. VH антитела, указанного в табл. 3, и VL того же антитела, перечисленные в табл. 4). В определенных вариантах осуществления данного изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанный в данном изобретении, связывается с B7-H4 человека и содержит каркасные участки VH антитела, указанного в табл. 5.

Таблица 5

Аминокислотные последовательности FR VH³

Антитело	FR1 VH (SEQ ID NO:)	FR2 VH (SEQ ID NO:)	FR3 VH (SEQ ID NO:)	FR4 VH (SEQ ID NO :)
15461	QLQLQESGPGLVK PSETLSLTCTVSG (SEQ ID NO:205)	WIRQPPGKGLE WIG (SEQ ID NO: 206)	RVTISVDTSKN QFSLKLSSVTA ADTAVYYC (SEQ ID NO:207)	WGQGLVT VSS (SEQ ID NO:208)
20500	QLQLQESGPGLVK PSETLSLTCTVSG (SEQ ID NO: 215)	WIRQPPGKGLE WIG (SEQ ID NO: 216)	RVTISVDTSKN QFSLKLSSVTA ADTAVYYC (SEQ ID NO: 217)	WGQGLVT VSS (SEQ ID NO: 218)
20501	QLQLQESGPGLVK PSETLSLTCTVSG	WIRQPPGKGLE WIG (SEQ ID	RVTISVDTSKN QFSLKLSSVTA	WGQGLVT VSS (SEQ ID

	(SEQ ID NO: 225)	NO: 226)	ADTAVYYC (SEQ ID NO: 227)	NO: 228)
20502	QLQLQESGPGLVK PSETLSLTCTVSG (SEQ ID NO: 465)	WIRQPPGKGLE WIG (SEQ ID NO: 466)	RVTISVDTSKN QFSLKLSSVTA ADTAVYYC (SEQ ID NO: 467)	WGQGLVT VSS (SEQ ID NO: 468)
20502, 1	QLQLQESGPGLVK PSETLSLTCTVSG (SEQ ID NO: 235)	WIRQPPGKGLE WIG (SEQ ID NO: 236)	RVTISVDTSKN QFSLKLSSVTA ADTAVYYC (SEQ ID NO: 237)	WGQGLVT SS (SEQ ID NO: 238)
22208	QLQLQESGPGLVK PSETLSLTCTVSG (SEQ ID NO: 245)	WIRQPPGKGLE WIG (SEQ ID NO: 246)	RVTMSVDTSK NQFSLKLSSVT AADTAVYYC (SEQ ID NO: 247)	WGQGLVT VSS (SEQ ID NO: 248)
15462	QLQLQESGPGLVK PSETLSLTCTVSG (SEQ ID NO: 255)	WIRQPPGKGLE WIG (SEQ ID NO: 256)	RVTISVDTSKN QFSLKLSSVTA ADTAVYYC (SEQ ID NO: 257)	WGQGMVT VSS (SEQ ID NO: 258)
22213	QLQLQESGPGLVK PSETLSLTCTVSG (SEQ ID NO: 265)	WIRQPPGKGLE WIG (SEQ ID NO: 266)	RVTISVDTSKN QFSLKLSSVTA ADTAVYYC (SEQ ID NO: 267)	WGQGMVT VSS (SEQ ID NO: 268)
15465	QVQLQESGPGLVK PSQTLSTCTVSG (SEQ ID NO: 275)	WIRQHPGKGLE WIG (SEQ ID NO: 276)	RVTISVDTSKN QFSLKLSSVTA ADTAVYYC (SEQ ID NO: 277)	WGRGLVT VSS (SEQ ID NO: 278)
20506	QLQLQESGPGLVK	WIRQHPGKGLE	RVTMSVDTSK	WGRGLVT

046814

	PSETLSLTCTASG (SEQ ID NO: 285)	WIG (SEQ ID NO: 286)	NQFSLKLSSVT AADTAVYYC (SEQ ID NO: 287)	VSS (SEQ ID NO: 288)
15483	QVQLQESGPGLVK PSQTLSLTCTVSG (SEQ ID NO: 295)	WIRQHPGKGLE WIG (SEQ ID NO: 296)	RVTISVDTSKN QFSLKLSSVTA ADTAVYYC (SEQ ID NO: 297)	WGQGTLVT VSS (SEQ ID NO: 298)
20513	QLQLQESGPGLVK PSETLSLTCTVSG (SEQ ID NO: 305)	WIRQHPGKGLE WIG (SEQ ID NO: 306)	RVTMSVDTSK NQFSLKLSSVT AADTAVYYC (SEQ ID NO: 307)	WGQGTLVT VSS (SEQ ID NO: 308)
22216	QVQLQESGPGLVK PSQTLSLTCTVSG (SEQ ID NO: 315)	WIRQHPGKGLE WIG (SEQ ID NO: 316)	RVTMSVDTSK NQFSLKLSSVT AADTAVYYC (SEQ ID NO: 317)	WGQGTLVT VSS (SEQ ID NO: 318)
15489	QVQLQESGPGLVK PSETLSLTCTVSG (SEQ ID NO: 325)	WIRQPPGKGLE WIG (SEQ ID NO: 326)	RVTISVDTSKN QFSLKLSSVTA ADTAVYYC (SEQ ID NO: 327)	WGQGTTVT VSS (SEQ ID NO: 328)
20516	QVQLQESGPGLVK PSETLSLTCTVSG (SEQ ID NO: 335)	WIRQPPGKGLE WIG (SEQ ID NO: 336)	RVTISVDTSKN QFSLKLSSVTA ADTAVYYC (SEQ ID NO: 337)	WGQGTTVT VSS (SEQ ID NO: 338)
15472	EVQLLES GGGLVQ PGGSLRLS CAASG (SEQ ID NO: 345)	WVRQAPGKGL EWVS (SEQ ID NO: 346)	RFTISRDN SKN TLYLQMNSLR AEDTAVYYC (SEQ ID NO: 347)	WGQGTLVT VSS (SEQ ID NO: 348)

15503	EVQLLESGGGLVQ PGGSLRLSCAASG (SEQ ID NO: 355)	WVRQAPGKGL EWVS (SEQ ID NO: 356)	RFTISRDN SKN TLYLQMNSLR AEDTAVYYC (SEQ ID NO: 357)	WGQGTTVT VSS (SEQ ID NO: 358)
15495	QVQLVQSGAEVK KPGSSVKV SCKAS G (SEQ ID NO: 365)	WVRQAPGQGL EWMG (SEQ ID NO: 366)	RVTITADESTS TAYMELSSLRS EDTAVYYC (SEQ ID NO: 367)	WGRGTLVT VSS (SEQ ID NO: 368)
15478	QVQLVQSGAEVK KPGSSVKV SCKAS G (SEQ ID NO: 375)	WVRQAPGQGL EWMG (SEQ ID NO: 376)	RVTITADESTS TAYMELSSLRS EDTAVYYC (SEQ ID NO: 377)	WGQGTTLVT VSS (SEQ ID NO: 378)
15441	EVQLLESGGGLVQ PGGSLRLSCAASG (SEQ ID NO: 385)	WVRQAPGKGL EWVS (SEQ ID NO: 386)	RFTISRDN SKN TLYLQMNSLR AEDTAVYYC (SEQ ID NO: 387)	WGQGTMTVT VSS (SEQ ID NO: 388)
20496	QLQLQESG PGLVK PSETLSLTCTVSG (SEQ ID NO: 395)	WIRQPPGKGLE WIG (SEQ ID NO: 396)	RVTISVDTSKN QFSLKLSSVTA ADTAVYYC (SEQ ID NO: 397)	WGQGTMTVI VSS (SEQ ID NO: 398)

³ Каркасные участки VH, описанные в табл. 5, определяются на основе границ системы нумерации по Кабату для CDR. Другими словами, CDR VH определяются с помощью Кабата, а каркасные участки представляют собой аминокислотные остатки, окружающие CDR в варибельном участке в формате FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 и FR4.

В определенных вариантах осуществления данного изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанный в данном изобретении, связывается с B7-H4 человека и содержит каркасные участки VL антитела, указанного в табл. 6.

Аминокислотные последовательности FR VL⁴

Антитело	FR1 VL (SEQ ID NO :)	FR2 VL (SEQ ID NO :)	FR3 VL (SEQ ID NO:)	FR4 VL (SEQ ID NO :)
15461	EIVMTQSPATLSVS PGERATLSC (SEQ ID NO: 209)	WYQQKPGQAP RLLIY (SEQ ID NO: 210)	GIPARFSGSGS GTEFTLTISSLQ SEDFAVYYC (SEQ ID NO: 211)	FGGGTKVEI K (SEQ ID NO: 212)
20500	EIVMTQSPATLSVS PGERATLSC (SEQ ID NO: 219)	WYQQKPGQAP RLLIY (SEQ ID NO: 220)	GIPARFSGSGS GTEFTLTISSLQ SEDFAVYYC (SEQ ID NO: 221)	FGGGTKVEI K (SEQ ID NO: 222)
20501	EIVMTQSPATLSVS PGERATLSC (SEQ ID NO: 229)	WYQQKPGQAP RLLIY (SEQ ID NO: 230)	GIPARFSGSGS GTEFTLTISSLQ SEDFAVYYC (SEQ ID NO: 231)	FGGGTKVEI K (SEQ ID NO: 232)
20502 и 20502,1	EIVMTQSPATLSVS PGERATLSC (SEQ ID NO: 239)	WYQQKPGQAP RLLIY (SEQ ID NO: 240)	GIPARFSGSGS GTEFTLTISSLQ SEDFAVYYC (SEQ ID NO: 241)	FGGGTKVEI K (SEQ ID NO: 242)
22208	EIVMTQSPATLSVS PGERATLSC (SEQ ID NO:249)	WYQQKPGQAP RLLIY (SEQ ID NO: 250)	GIPARFSGSGS GTEFTLTISSLQ SEDFAVYYC (SEQ ID NO: 251)	FGGGTKVEI K (SEQ ID NO: 252)
15462	EIVLTQSPGTLTSL PGERATLSC (SEQ ID NO: 259)	WYQQKPGQAP RLLIY (SEQ ID NO: 260)	GIPDRFSGSGS GTEFTLTISSLQ PEDFAVYYC (SEQ ID NO: 261)	FGGGTKVEI K (SEQ ID NO: 262)

22213	EIVLTQSPGTL SLS PGERATLSC (SEQ ID NO: 269)	WYQQKPGQAP RLLIY (SEQ ID NO: 270)	GIPDRFSGSGS GTDFTLTISRLE PEDFAVYYC (SEQ ID NO: 271)	FGGGTKVEI K (SEQ ID NO: 272)
15465	DIQMTQSPSSVSAS VGDRVITC (SEQ ID NO: 279)	WYQQKPGKAP KLLIY (SEQ ID NO: 280)	GVPSRFSGSGS GTDFTLTISLQ PEDFATYYC (SEQ ID NO: 281)	FGGGTKVEI K (SEQ ID NO: 282)
20506	DIQMTQSPSSVSAS VGDRVITC (SEQ ID NO: 289)	WYQQKPGKAP KLLIY (SEQ ID NO: 290)	GVPSRFSGSGS GTDFTLTISLQ PEDFATYYC (SEQ ID NO: 291)	FGGGTKVEI K (SEQ ID NO: 292)
15483	DIQMTQSPSTLSAS VGDRVITC (SEQ ID NO: 299)	WYQQKPGKAP KLLIY (SEQ ID NO: 300)	GVPSRFSGSGS GTEFTLTISLQ PDDFATYYC (SEQ ID NO: 301)	FGGGTKVEI K (SEQ ID NO: 302)
20513	DIQMTQSPSTLSAS VGDRVITC (SEQ ID NO: 309)	WYQQKPGKAP KLLIY (SEQ ID NO: 310)	GVPSRFSGSGS GTEFTLTISLQ PDDFATYYC (SEQ ID NO: 311)	FGGGTKVEI K (SEQ ID NO: 312)
22216	DIQMTQSPSTLSAS VGDRVITC (SEQ ID NO: 319)	WYQQKPGKAP KLLIY (SEQ ID NO: 320)	GVPSRFSGSGS GTEFTLTISLQ PDDFATYYC (SEQ ID NO: 321)	FGGGTKVEI K (SEQ ID NO: 322)
15489	DIQMTQSPSTLSAS VGDRVITC (SEQ ID NO: 329)	WYQQKPGKAP KLLIY (SEQ ID NO: 330)	GVPSRFSGSGS GTEFTLTISLQ PDDFATYYC (SEQ ID NO: 331)	FGGGTKVEI K (SEQ ID NO: 332)

20516	DIQMTQSPSTLSAS VGDRVITIC (SEQ ID NO: 339)	WYQQKPGKAP KLLIY (SEQ ID NO: 340)	GVPSRFSGSGS GTEFTLTISLQ PDDFATYYC (SEQ ID NO: 341)	FGGGTKVEI K (SEQ ID NO: 342)
15472	DIQMTQSPSSLSAS VGDRVITIC (SEQ ID NO: 349)	WYQQKPGKAP KLLIY (SEQ ID NO: 350)	GVPSRFSGSGS GTDFLTISLQ PEDFATYYC (SEQ ID NO: 351)	FGGGTKVEI K (SEQ ID NO: 352)
15503	DIQLTQSPSSVSAS VGDRVITIC (SEQ ID NO: 359)	WYQQKPGKAP KLLIY (SEQ ID NO: 360)	GVPSRFSGSGS GTDFLTISLQ PEDFATYYC (SEQ ID NO: 361)	FGGGTKVEI K (SEQ ID NO: 362)
15495	EIVMTQSPATLSVS PGERATLSC (SEQ ID NO: 369)	WYQQKPGQAP RLLIY (SEQ ID NO: 370)	GIPARFSGSGS GTEFTLTISLQ SEDFAVYYC (SEQ ID NO: 371)	FGGGTKVEI K (SEQ ID NO: 372)
15478	DIQMTQSPSTLSAS VGDRVITIC (SEQ ID NO: 379)	WYQQKPGKAP KLLIY (SEQ ID NO: 380)	GVPSRFSGSGS GTEFTLTISLQ PDDFATYYC (SEQ ID NO: 381)	FGGGTKVEI K (SEQ ID NO: 382)
15441	DIQMTQSPSTLSAS VGDRVITIC (SEQ ID NO: 389)	WYQQKPGKAP KLLIY (SEQ ID NO: 390)	GVPSRFSGSGS GTEFTLTISLQ PDDFATYYC (SEQ ID NO: 391)	FGGGTKVEI K (SEQ ID NO: 392)
20496	DIQMTQSPSSLSAS VGDRVITIC (SEQ ID NO: 399)	WYQQKPGKAP KLLIY (SEQ ID NO: 400)	GVPSRFSGSGS GTDFLTISLQ PEDFATYYC (SEQ ID NO: 401)	FGGGTKVEI K (SEQ ID NO: 402)

⁴ Каркасные участки VL, описанные в табл. 6, определяются на основе границ системы нумерации по Кабату для CDR. Другими словами, CDR VL определяются с помощью Кабата, а каркасные участки представляют собой аминокислотные остатки, окружающие CDR в варибельном участке в формате FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 и FR4.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанный в данном изобретении, связывается с B7-H4 человека и содержит четыре каркасных участка VH и четыре каркасных участка VL антитела, перечисленных в табл. 5 и 6 (т.е. четыре каркасных участка VH антитела, указанного в табл. 5, и четырех каркасных участка VL того же антитела, указанного в табл. 6).

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанный в данном изобретении, связывается с B7-H4 человека и содержит последовательность тяжелой цепи антитела, указанного в табл. 7.

Полноразмерные аминокислотные последовательности тяжелой цепи

Антитело	Полноразмерная аминокислотная последовательность тяжелой цепи (SEQ ID NO)
15461	QLQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSISSSSYWGWIRQPP GKGLEWIGNIYYSGSTYYNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLSS VTAADTAVYYCAREGSYPNWFDPWGQGLTVTVSSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHNKPSNT KVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLM ISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:13)
20500	QLQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSIKSGSHYWGWIRQPP GKGLEWIGNIYYSGSTYYNPSLRSRTISVDTSKNQFSLKLSS VTAADTAVYYCAREGSYPNWFDPWGQGLTVTVSSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHNKPSNT KVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLM
	ISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:23)
20501	QLQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSIKSGSHYWGWIRQPP GKGLEWIGNIYYSGSTYYNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLSS VTAADTAVYYCAREGSYPNWLDPWGQGLTVTVSSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHNKPSNT KVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLM ISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:33)

20502	<p>QLQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSIKSGSYWGWIRQPP GKGLEWIGNIYSGSTYYNPSLRSRVTISVDTSKNQFSLKLSS VTAADTAVYYCAREGSYPNQFDPWGQGLVTVSSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHNKPSNT KVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLM ISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:469)</p>
20502,1	<p>QLQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSIKSGSYWGWIRQPP GKGLEWIGNIYSGSTYYNPSLRSRVTISVDTSKNQFSLKLSS VTAADTAVYYCAREGSYPNQFDPWGQGLVTVSSASTKGPSV FPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV HTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHNKPSNTK VDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI</p>
	<p>SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:43)</p>
22208	<p>QLQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSIKSGSHYWGWIRQPP GKGLEWIGNIYSGSTYYNPSLRSRVTMSVDTSKNQFSLKLSS VTAADTAVYYCAREGSYPNWFDPWGQGLVTVSSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHNKPSNT KVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLM ISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:53)</p>
15462	<p>QLQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSISSSYWGWIRQPP GKGLEWIGNIYSGSTYYNPSLRSRVTISVDTSKNQFSLKLSS VTAADTAVYYCAREGSYTVLNVWGQGMVTVSSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHNKPSNT KVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLM ISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:63)</p>

22213	<p>QLQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSIGRGSYYWGWIRQPP GKGLEWIGNIYYSGSTYYNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLSS VTAADTAVYYCAREGSYTTVLNVWGQGTMTVSSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT KVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLM ISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ</p>
	QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:73)
15465	<p>QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGGSISSGGYYWSWIRQHP GKGLEWIGNIYYSGSTYYNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLSS VTAADTAVYYCARESSTISADFDLWGRGTLTVSSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT KVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLM ISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:83)</p>
20506	<p>QLQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTASGGSSISHGGYYWSWIRQHP GKGLEWIGNIYYSGSTYYNPSLKSRTMSVDTSKNQFSLKLSS VTAADTAVYYCARESSTISADFDLWGRGTLTVSSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT KVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLM ISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:93)</p>
15483	<p>QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGGSISSGGYYWSWIRQHP GKGLEWIGNIYYSGSTYYNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLSS VTAADTAVYYCARGLSTIDEAFDPWGQGTMTVSSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT KVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLM ISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:103)</p>
20513	QLQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSISDGSYYWSWIRQHP

	GKGLEWIGNIYYSGSTYYNPSLRSRVTMSVDTSKNQFSLKLSS VTAADTAVYYCARGLSTIDEAFDPWGQGLTVTVSSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT KVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLM ISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:113)
22216	QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGGSISDGSYYWSWIRQHP GKGLEWIGNIYYSGSTYYNPSLRSRVTMSVDTSKNQFSLKLSS VTAADTAVYYCARGLSTIDEAFDPWGQGLTVTVSSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT KVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLM ISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:123)
15489	QVQLQESGPGLVKPSETLSLCTVSGGSISSYYWSWIRQPPGK GLEWIGYIYSSGSTNYNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLSSVTA ADTAVYYCARGSGQYAAPDYGMVWVGQTTTVTVSSASTKG PSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN TKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:133)
20516	QVQLQESGPGLVKPSETLSLCTVSGGSIISSYYWGWIRQPPGK GLEWIGYIYSSGSTSYNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLSSVTA ADTAVYYCARGSLYAAPDYGLDVWVGQTTTVTVSSASTKG

	<p>PSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN TKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:143)</p>
15472	<p>EVQLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPG KGLEWVSTISGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCARGAGHYDLVGRYWGGTLVTVSSASTK GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS NTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:153)</p>
15503	<p>EVQLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPG KGLEWVSAISGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCARVGFALNYWGQTTVTVSSASTKGPSV FPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK VDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:163)</p>
15495	<p>QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGFTFSSYAISWVRQAPG QGLEWMGGIPIFGTASYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSS LRSEDTAVYYCARQQYDGRRYFGLWGRGTLVTVSSASTKGP SVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT</p>

	KVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLM ISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:173)
15478	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAISWVRQAPG QGLEWMGGIPIFGTANYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSS LRSEDTAVYYCARGGPWFDPWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPL APSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF PAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK KVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTP EVTVCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:183)
15441	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTSSYAMSWVRQAPG KGLEWVSAISGSGGSTSYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCAKPSLATMLAFDIWGQGMVTVSSASTKG PSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN TKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:193)
20496	QLQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSISSSVYYWSWIRQPP GKGLEWIGSILVSGSTYYNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLSV TAADTAVYYCARAVSFLDVWGQGMVIVSSASTKGPSVFPL APSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF PAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK KVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTP EVTVCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN
	STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:203)

В определенных вариантах осуществления данного изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанный в данном изобретении, связывается с B7-H4 человека и содержит последовательность легкой цепи антитела, приведенную в табл. 8.

Таблица 8

Полноразмерный аминокислотные последовательности легкой цепи

Антитело	Полноразмерная аминокислотная последовательность легкой цепи (SEQ ID NO)
15461	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSNLAWYQQKPGQA PRLLIYGASTRATGIPARFSGSGSGTEFTLTISLQSEDFAVYYC QQYHSFPFTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV VCLLNNFYPRKAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYS LSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:14)
20500	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSNLAWYQQKPGQA PRLLIYGASTRATGIPARFSGSGSGTEFTLTISLQSEDFAVYYC QQYHSFPFTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV VCLLNNFYPRKAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYS LSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:24)
20501	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSNLAWYQQKPGQA PRLLIYGASTRATGIPARFSGSGSGTEFTLTISLQSEDFAVYYC QQYHSFPFTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV VCLLNNFYPRKAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYS LSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:34)
20502 и 20502,1	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSNLAWYQQKPGQA PRLLIYGASTRATGIPARFSGSGSGTEFTLTISLQSEDFAVYYC QQYHSFPFTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV VCLLNNFYPRKAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYS LSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:44)

22208	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSTNLAWYQQKPGQA PRLLIYDASARVTGIPARFSGSGSGTEFTLTISLQSEDFAVYYC QQYHSFPFTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV VCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYS LSSTLTLKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:54)
15462	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQA PRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYC QQAASYPLTFGGGKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV VCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYS LSSTLTLKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:64)
22213	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVASSHLAWYQQKPGQ APRLLIYDAVS RATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYY CQQAASYPLTFGGGKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTAS VVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTY SLSSTLTLKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:74)
15465	DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISRWLAWYQQKPGKA PKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC QQAHTFPYTFGGGKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV VCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYS LSSTLTLKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:84)
20506	DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISRWLAWYQQKPGKA PKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC QQAHTFPYTFGGGKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV VCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYS LSSTLTLKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:94)
15483	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQSISSWLAWYQQKPGKA PKLLIYKASSLESGVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPDFFATYYC QQDNSYPYTFGGGKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV VCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYS LSSTLTLKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

	(SEQ ID NO:104)
20513	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTTICRASQSISWLAZYQQKPGKA PKLLIYKASSLESGVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPDFFATYYC QQDNSYPYTFGGGKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV VCLLNNFYPRKAVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYS LSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:114)
22216	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTTICRASKSISWLAZYQQKPGKA PKLLIYEASSLHSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPDFFATYYC QQDNSYPYTFGGGKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV VCLLNNFYPRKAVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYS LSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:124)
15489	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTTICRASQSISWLAZYQQKPGKA PKLLIYKASSLESGVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPDFFATYYC QQDNSFPFTFGGGKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV VCLLNNFYPRKAVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYS LSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:134)
20516	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTTICRASQSISWLAZYQQKPGKA PKLLIYKASSLESGVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPDFFATYYC QQDNSFPFTFGGGKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV VCLLNNFYPRKAVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYS LSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:144)
15472	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTTICRASQSISYLNWYQQKPGKAP KLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQ QLYSLPPTFGGGKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV VCLLNNFYPRKAVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYS LSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:154)
15503	DIQLTQSPSSVSASVGDRVTTICRASQDISWLAZYQQKPGKA PKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC QQATSYPWTFGGGKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTAS VVCLLNNFYPRKAVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYS

	SLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:164)
15495	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSNLAWYQQKPGQA PRLLIYSASTRATGIPARFSGSGSGTEFTLTISLQSEDFAVYYC QQVNVWPPTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV VCLLNNFYPPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYS LSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:174)
15478	DIQMTQSPSTLSASVGDRTITCRASQSISSWLAWYQQKPGKA PKLLIYKASSLESGVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPDFATYYC QQYNSYPPTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTAS VVCLLNNFYPPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTY LSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:184)
15441	DIQMTQSPSTLSASVGDRTITCRASQSISSWLAWYQQKPGKA PKLLIYDASSLESGVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPDFATYYC QQSKSYPRTFGGGKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV VCLLNNFYPPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYS LSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:194)
20496	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAP KLLIYGASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPDFATYYCQ QSYDPPWTFGGGKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVV CLLNNFYPPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYSL SSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:204)

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанный в данном изобретении, связывается с B7-H4 человека и содержит последовательность тяжелой цепи и последовательность легкой цепи антитела, перечисленного в табл. 7 и 8 (т.е. последовательность тяжелой цепи антитела перечислены в табл. 7, а последовательность легкой цепи того же антитела приведена в табл. 8).

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанный в данном изобретении, связывается с B7-H4 человека, содержит шесть CDR антитела, перечисленных в табл. 1 и 2 (т.е. три CDR VH антитела, перечисленных в табл. 1, и три CDR VL одного и того же антитела, перечисленные в табл. 2), и содержит VH, содержащую последовательность по меньшей мере на 80% идентичную последовательности VH того же антитела в табл. 3, и VL, содержащую последовательность по меньшей мере на 80% идентичную последовательности VL последовательность того же антитела в табл. 4. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанный в данном изобретении, связывается с B7-H4 человека, содержит шесть CDR антитела, перечисленных в табл. 1 и 2 (т.е. три CDR VH антитела, перечисленных в табл. 1, и три CDR VL одного и того же антитела, перечисленные в табл. 2), и содержит VH, содержащую последовательность по меньшей мере на 85% идентичную последовательности VH того же антитела в табл. 3, и VL, содержащую последовательность по меньшей мере на 85% идентичную последовательности VL последовательность того же антитела в табл. 4.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанный в данном изобретении, связывается с B7-H4 человека, содержит шесть CDR антитела, перечисленных в табл. 1 и 2 (т.е. три CDR VH антитела, перечисленных в табл. 1, и три CDR VL одного и того же антитела, перечисленные в табл. 2), и содержит VH, содержащую последовательность по меньшей мере на 90% идентичную последовательности VH того же антитела в табл. 3, и VL, содержащую последовательность по меньшей мере на 90% идентичную последовательности VL последовательность того же антитела в табл. 4. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанный в данном изобретении, связывается с B7-H4 человека, содержит шесть CDR антитела, перечисленных в табл. 1 и 2 (т.е. три CDR VH антитела, перечисленных в табл. 1, и три CDR VL одного и того же антитела, перечисленные в табл. 2), и содержит VH,

ность того же антитела в табл. 4, увеличивает пролиферацию Т-клеток, увеличивает продукцию ИФН γ и опосредует активность АЗКЦ против В7-Н4-экспрессирующих клеток. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанный в данном изобретении, связывается с В7-Н4 человека, содержит шесть CDR антитела, перечисленных в табл. 1 и 2 (т.е. три CDR VH антитела, перечисленных в табл. 1, и три CDR VL одного и того же антитела, перечисленные в табл. 2), содержит VH, содержащую последовательность по меньшей мере на 97% идентичную последовательности VH того же антитела в табл. 3, и VL, содержащую последовательность по меньшей мере на 97% идентичную последовательности VL последовательности того же антитела в табл. 4, увеличивает пролиферацию Т-клеток, увеличивает продукцию ИФН γ и опосредует активность АЗКЦ против В7-Н4-экспрессирующих клеток. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанный в данном изобретении, связывается с В7-Н4 человека, содержит шесть CDR антитела, перечисленных в табл. 1 и 2 (т.е. три CDR VH антитела, перечисленных в табл. 1, и три CDR VL одного и того же антитела, перечисленные в табл. 2), содержит VH, содержащую последовательность по меньшей мере на 98% идентичную последовательности VH того же антитела в табл. 3, и VL, содержащую последовательность по меньшей мере на 98% идентичную последовательности VL последовательности того же антитела в табл. 4, увеличивает пролиферацию Т-клеток, увеличивает продукцию ИФН γ и опосредует активность АЗКЦ против В7-Н4-экспрессирующих клеток. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанный в данном изобретении, связывается с В7-Н4 человека, содержит шесть CDR антитела, перечисленных в табл. 1 и 2 (т.е. три CDR VH антитела, перечисленных в табл. 1, и три CDR VL одного и того же антитела, перечисленные в табл. 2), содержит VH, содержащую последовательность по меньшей мере на 99% идентичную последовательности VH того же антитела в табл. 3, и VL, содержащую последовательность по меньшей мере на 99% идентичную последовательности VL последовательности того же антитела в табл. 4, увеличивает пролиферацию Т-клеток, увеличивает продукцию ИФН γ и опосредует активность АЗКЦ против В7-Н4-экспрессирующих клеток.

В определенных аспектах антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в данном изобретении, могут быть описаны только его VL-доменом или только его VH-доменом или только его 3 CDR VL или только его 3 CDR VH. См., например, Rader C. et al. (1998), PNAS, 95:8910-8915, который включен в данное описание в качестве ссылки во всей своей полноте и описывает гуманизацию мышиного анти- $\alpha\text{v}\beta 3$ -антитела путем идентификации комплементарной легкой цепи или тяжелой цепи, соответственно, из библиотеки легкой или тяжелой цепи человека, что приводит к гуманизованным вариантам антитела, имеющим аффинность как высокую или более высокую, чем аффинность исходного антитела. См. также Clackson T. et al. (1991), Nature, 352:624-628, который включен в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте, описывающей способы получения антител, которые связывают специфический антиген, с использованием конкретного домена VL (или домена VH) и скрининга библиотеки для комплементарных переменных доменов. Скрининг произвел 14 новых партнеров для конкретного домена VH и 13 новых партнеров для конкретного домена VL, которые были сильными связывающими, как определено методом ИФА. См. также Kim S.J. & Hong H.J. (2007), J. Microbiol., 45:572-577, который полностью включен в данное описание посредством ссылки, описывающий способы получения антител, которые связывают специфический антиген, с использованием конкретного домена VH и скрининга библиотеки (например, библиотеки VL человека) на наличие комплементарных доменов VL; выбранные домены VL, в свою очередь, могут использоваться для направления выбора дополнительных комплементарных (например, человеческих) доменов VH.

В определенных аспектах CDR антитела или его антигенсвязывающего фрагмента можно определять по схеме нумерации Хотиа, которая относится к расположению 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 пат. США № 7709226). Как правило, при использовании соглашения о нумерации по Кабату петля CDR-H1 по Хотиа присутствует в аминокислотах тяжелой цепи 26-32, 33 или 34, петля CDR-H2 по Хотиа присутствует в аминокислотах тяжелой цепи 52-56, и петля CDR-H3 по Хотиа присутствует в аминокислотах тяжелой цепи с 95 по 102, в то время как петля CDR-L1 по Хотиа присутствует в аминокислотах легкой цепи 24-34, петля CDR-L2 по Хотиа присутствует в аминокислотах легкой цепи от 50 до 56 и петля CDR-L3 по Хотиа присутствует в аминокислотах легкой цепи 89-97. Конец петли CDR-H1 по Хотиа при нумерации с использованием соглашения о нумерации по Кабату варьируется между H32 и H34 в зависимости от длины петли (это связано с тем, что схема нумерации по Кабату размещает вставки в H35A и H35B; если ни 35A, ни 35B не присутствуют, петля заканчивается на 32; если присутствует только 35A, петля заканчивается на 33; если присутствует обе 35A и 35B, петля заканчивается на 34).

В определенных аспектах в данном изобретении представлены антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связываются с В7-Н4 (например, В7-Н4 человека) и содержат CDR VH и VL антитела по Хотиа, перечисленного в табл. 3 и 4. В некоторых вариантах осуществления данно-

го изобретения антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связываются с В7-Н4 (например, В7-Н4 человека), содержат одну или более CDR, в которых CDR по Хотиа и Кабат имеют одинаковую аминокислотную последовательность. В определенных вариантах осуществления в данном изобретении представлены антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связываются с В7-Н4 (например, В7-Н4 человека) и содержат комбинации CDR по Кабату и CDR по Хотиа.

В определенных аспектах CDR антитела или его антигенсвязывающего фрагмента могут быть определены в соответствии с системой нумерации IMGT, как описано в Lefranc M.P. (1999), *Immunologist*, 7:132-136; Lefranc M-P et al. (1999), *Nucleic Acids Res.*, 27:209-212. Согласно схеме нумерации IMGT, VH-CDR1 находится в положениях с 26 по 35, VH-CDR2 находится в положениях с 51 по 57, VH-CDR3 находится в положениях с 93 по 102, VL-CDR1 находится в положениях с 27 по 32, VL-CDR2 находится в положениях с 50 по 52, и VL-CDR3 находится в положениях с 89 по 97. В конкретном варианте осуществления данного изобретения представлены антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связываются с В7-Н4 (например, В7-Н4 человека) и включают в себя CDR VH и VL антитела по IMGT, перечисленного, например, 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 and Dübel, eds., chapter 31, p. 422-439, Springer-Verlag, Берлин (2001). В конкретном варианте осуществления данного изобретения представлены антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связываются с В7-Н4 (например, В7-Н4 человека) и содержат CDR VH и VL антитела, перечисленного в табл. 3 и 4, как определено способом по MacCallum R.M. et al. В определенных аспектах CDR антитела или его антигенсвязывающего фрагмента можно определять согласно схеме нумерации AbM, которая относится к гипервариабельным участкам AbM, которые представляют собой компромисс между CDR по Кабату и структурными петлями по Хотиа, и используются программным обеспечением для моделирования антител AbM Oxford Molecular (Oxford Molecular Group, Inc.). В конкретном варианте осуществления данного изобретения представлены антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связываются с В7-Н4 (например, В7-Н4 человека) и содержат CDR VH и VL антитела, перечисленного в табл. 3 и 4, как определено схемой нумерации AbM. В конкретных аспектах в данном изобретении представлены антитела, которые содержат тяжелую цепь и легкую цепь. Что касается тяжелой цепи, в конкретном варианте осуществления данного изобретения тяжелая цепь антитела, описанного в данном изобретении, может представлять собой тяжелую цепь альфа (α), дельта (δ), эpsilon (ϵ), гамма (γ) или мю (μ). В другом конкретном варианте осуществления данного изобретения, тяжелая цепь описанного антитела может содержать тяжелую цепь альфа (α), дельта (δ), эpsilon (ϵ), гамма (γ) или мю (μ) человека. В конкретном варианте осуществления данного изобретения антитело, описанное в данном изобретении, которое иммуноспецифично связывается с В7-Н4 (например, В7-Н4 человека), содержит тяжелую цепь, при этом аминокислотная последовательность домена VH содержит аминокислотную последовательность, представленную в табл. 3, и при этом константный участок тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность константного участка тяжелой цепи гамма (γ) человека. В конкретном варианте осуществления данного изобретения антитело, описанное в данном изобретении, которое специфически связывается с В7-Н4 (например, В7-Н4 человека), содержит тяжелую цепь, при этом аминокислотная последовательность домена VH содержит последовательность, представленную в табл. 3, и при этом константный участок тяжелой цепи содержит аминокислоту тяжелой цепи человека, описанную в данном изобретении или известную в данной области техники. Неограничивающие примеры последовательностей константного участка человека были описаны в данной области техники; например, см. пат. США № 5693780; и Kabat E.A. et al. (1991) выше.

Что касается легкой цепи, в конкретном варианте осуществления данного изобретения легкая цепь антитела, описанного в данном изобретении, представляет собой легкую цепь каппа. Константный участок легкой цепи каппа человека может содержать следующую аминокислотную последовательность:

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS

QESVTEQDSKDYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

(SEQ ID NO: 405).

Константный участок легкой цепи каппа человека может кодироваться следующей нуклеотидной последовательностью:

CGGACCGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAG
 TTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAG
 GCCAAAGTACAGTGGAAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAG
 TGTCACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGC
 TGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAG
 GGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT (SEQ ID NO:406).

В другом конкретном варианте осуществления данного изобретения, легкая цепь антитела, описанного в данном изобретении, представляет собой легкую цепь лямбда. В еще одном конкретном варианте осуществления данного изобретения, легкая цепь антитела, описанного в данном изобретении, представляет собой легкую цепь каппа человека или легкую цепь лямбда человека. В конкретном варианте осуществления данного изобретения антитело, описанное в данном изобретении, которое иммуноспецифично связывается с полипептидом В7-Н4 (например, В7-Н4 человека), содержит легкую цепь, в которой аминокислотная последовательность домена VL содержит последовательность, приведенную в табл. 4, при этом константный участок легкой цепи содержит аминокислотную последовательность константного участка легкой цепи каппа человека. В другом конкретном варианте осуществления данного изобретения, антитело, описанное в данном изобретении, которое иммуноспецифично связывается с В7-Н4 (например, В7-Н4 человека), содержит легкую цепь, в которой аминокислотная последовательность домена VL содержит последовательность, приведенную в табл. 4, и в которой константный участок легкой цепи содержит аминокислотную последовательность константного участка легкой цепи лямбда человека. В конкретном варианте осуществления данного изобретения антитело, описанное в данном изобретении, которое иммуноспецифично связывается с В7-Н4 (например, В7-Н4 человека), содержит легкую цепь, в которой аминокислотная последовательность домена VL содержит последовательность, приведенную в табл. 4, и в которой константный участок легкой цепи содержит аминокислотную последовательность константного участка легкой цепи каппа или лямбда человека. Неограничивающие примеры последовательностей константного участка человека были описаны в данной области техники; например, см. пат. США № 5693780; и Kabat E.A. et al. (1991) выше.

В конкретном варианте осуществления данного изобретения антитело, описанное в данном изобретении, которое иммуноспецифично связывается с В7-Н4 (например, В7-Н4 человека), содержит домен VH и домен VL, содержащий любую аминокислотную последовательность, описанную в данном изобретении, и при этом константные участки содержат аминокислоту последовательности константных участков молекулы иммуноглобулина IgG, IgE, IgM, IgD, IgA или IgY или молекулы иммуноглобулина IgG, IgE, IgM, IgD, IgA или IgY человека. В другом конкретном варианте осуществления данного изобретения, антитело, описанное в данном изобретении, которое иммуноспецифично связывается с В7-Н4 (например, В7-Н4 человека), содержит домен VH и домен VL, содержащий любую аминокислотную последовательность, описанную в данном изобретении, и при этом константные участки содержат аминокислотные последовательности константных участков молекулы иммуноглобулина IgG, IgE, IgM, IgD, IgA или IgY любого класса (например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и IgA2) или молекулы иммуноглобулина любого подкласса (например, IgG2a и IgG2b). В конкретном варианте осуществления данного изобретения, константные участки содержат аминокислотные последовательности константных участков молекулы иммуноглобулина IgG, IgE, IgM, IgD, IgA или IgY человека любого класса (например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, и IgA2) или молекулы иммуноглобулина любого подкласса (например, IgG2a и IgG2b). Константный участок тяжелой цепи IgG1 человека может содержать следующую аминокислотную последовательность:

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSQVHTFPAVLQSS
 GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG
 PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY
 NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSR
 DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDK
 SRWQQGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 407).

Константный участок тяжелой цепи IgG 1 человека может кодироваться следующей нуклеотидной последовательностью:

```
GCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCTCCTCCAAGAGCACCTCT
GGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGAC
GGTGTCTGTGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGTGTCTCT
ACAGTCCTCAGGACTTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTT
GGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGG
ACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCCA
GCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCTTCCCCCAAAAACCAAGGAC
ACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCAC
GAAGACCCTGAGGTCAAGTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGC
CAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGGGTGGTACGCGTC
CTCACCGTCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGAAGGTCTC
CAACAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGC
CCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAAC
CAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAG
TGGGAGAGCAATGGGCAGCCGAGAACAACATAAGACCACGCCTCCCGTGTCTGGA
CTCCGACGGCTCCTTCTTCTTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCA
GCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACAC
GCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTA AAA.(SEQ ID NO: 408)
```

Неограничивающие примеры константных участков человека описаны в данной области техники; например, см. Kabat E.A. et al. (1991) выше.

В определенных вариантах осуществления данного изобретения одну, две или более мутаций (например, аминокислотные замены) вводят в Fc участка антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, описанного в данном изобретении (например, домен CH2 (остатки 231-340 IgG 1 человека) и/или домен CH3 (остатки 341-447 человеческого IgG₁) и/или шарнирный участок с нумерацией в соответствии с системой нумерации по Кабату (например, индекс ЕС по Кабату)) для изменения одного или более функциональных свойств антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, такого как период полужизни в сыворотке, фиксации комплемента, связывания с Fc рецептора и/или антигензависимой клеточной цитотоксичности.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения одну, две или более мутаций (например, аминокислотных замен) вводят в шарнирный участок Fc участка (домен CH1) так, что количество остатков цистеина в шарнирном участке изменяется (например, увеличивается или уменьшается) как описано, например, в пат. США № 5677425. Количество остатков цистеина в шарнирном участке домена CH1 может быть изменено, например, для облегчения сборки легкой и тяжелой цепей или для изменения (например, увеличения или уменьшения) стабильности антитела или его антигенсвязывающего фрагмента.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения одну, две или более мутаций (например, аминокислотные замены) вводят в Fc участка антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, описанного в данном изобретении (например, домен CH2 (остатки 231-340 IgG1 человека), и/или домен CH3 (остатки 341-447 IgG1 человека) и/или шарнирный участок с нумерацией в соответствии с системой нумерации по Кабату (например, индекс ЕС по Кабату)) для увеличения или уменьшения аффинности антитела или его антиген-связывающего фрагмента для Fc-рецептора (например, активированного Fc-рецептора) на поверхности эффекторной клетки. Мутации в Fc участке, которые уменьшают или увеличивают аффинность к Fc-рецептору, и способы введения таких мутаций в Fc-рецептор или его фрагмент известны специалисту в данной области техники. Примеры мутаций в Fc-рецепторе, которые могут быть сделаны для изменения аффинности антитела или его антигенсвязывающего фрагмента к Fc-рецептору, описаны, например, в Smith P et al. (2012), PNAS, 109:6181-6186; пат. США № 6737056; и международные публикации № WO 02/060919; WO 98/23289; и WO 97/34631, которые включены в данный документ посредством ссылки.

В конкретном варианте осуществления данного изобретения одну, две или более аминокислотных мутаций (т.е. замен, вставок или делеций) вводят в константный домен IgG или его FcRn-связывающий фрагмент (предпочтительно фрагмент домена Fc или шарнирный-Fc) для изменения (например, уменьшить или увеличить) периода полужизни антитела или его антигенсвязывающего фрагмента *in vivo*. См., например, международные публикации № WO 02/060919; WO 98/23289; и WO 97/34631; и пат. США № 5869046, 6121022, 6277375 и 6165745 приведены примеры мутаций, которые изменяют (например, уменьшают или увеличивают) период полужизни антитела или его антигенсвязывающего фрагмента *in vivo*. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения одну, две или

более аминокислотных мутаций (т.е. замен, вставок или делеций) вводят в константный домен IgG или его FcRn-связывающий фрагмент (предпочтительно фрагмент домена Fc или шарнирный-Fc) для уменьшения периода полужизни антитела или его антигенсвязывающего фрагмента *in vivo*. В других вариантах осуществления данного изобретения, одну, две или более аминокислотных мутаций (т.е. замен, вставок или делеций) вводят в константный домен IgG или его FcRn-связывающий фрагмент (предпочтительно фрагмент домена Fc или шарнирный-Fc) для увеличения периода полужизни антитела или его антигенсвязывающего фрагмента *in vivo*. В конкретном варианте осуществления данного изобретения антитела или их антигенсвязывающие фрагменты могут иметь одну или более аминокислотных мутаций (например, замен) во втором константном (CH2) домене (остатки 231-340 IgG1 человека) и/или в третьем константном (CH3) домене (остатки 341-447 IgG1 человека) с нумерацией в соответствии с индексом ЕС по Кабату (Kabat EA et al., (1991) выше). В конкретном варианте осуществления данного изобретения константный участок IgG1 содержит замену метионина (M) на тирозин (Y) в положении 252, замену серина (S) на треонин (T) в положении 254, и замену треонина (T) на глутаминовую кислоту (E) в положении 256, пронумерованные в соответствии с индексом ЕС по Кабату. См., например, пат. № 7658921, который включен в данный документ посредством ссылки. Было показано, что этот тип мутантного IgG, называемого "YTE мутантом", демонстрирует четырехкратное увеличение периода полужизни по сравнению с версиями дикого типа того же антитела (см. Dall'Acqua WF et al. (2006), J. Biol. Chem., 281:23514-24). В некоторых вариантах осуществления данного изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат константный домен IgG, содержащий одну, две, три или более аминокислотных замен аминокислотных остатков в положениях 251-257, 285-290, 308-314, 385-389 и 428-436, пронумерованных в соответствии с индексом ЕС по Кабату.

В дополнительном варианте осуществления данного изобретения, одну, две или более аминокислотных замен вводят в Fc участок константного домена IgG, чтобы изменить эффекторную функцию(и) антитела или его антигенсвязывающего фрагмента. Например, одна или более аминокислот, выбранных из аминокислотных остатков 234, 235, 236, 237, 297, 318, 320 и 322, пронумерованных в соответствии с индексом ЕС по Кабату, могут быть заменены другим аминокислотным остатком, так что антитело или его антигенсвязывающий фрагмент имеют измененную аффинность к эффекторному лиганду, но сохраняют антигенсвязывающую способность исходного антитела. Эффекторный лиганд, к которому изменяется аффинность, может представлять собой, например, Fc рецептор или C1 компонент комплемента. Этот подход более подробно описан в пат. США № 5624821 и 5648260. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения делеция или инактивация (посредством точечных мутаций или других средств) домена константного участка может снижать связывание Fc-рецептора циркулирующего антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, тем самым увеличивая локализацию опухоли. См., например, пат. № 5585097 и 8591886 для описания мутаций, которые удаляют или инактивируют константный домен и тем самым увеличивают локализацию опухоли. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения одна или более аминокислотных замен могут быть введены в Fc участок для удаления потенциальных сайтов гликозилирования в Fc участке, которые могут снижать связывание с Fc рецептором (см., например, Shields R.L. et al. (2001), J. Biol. Chem., 276:6591-604).

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения одна или более аминокислот, выбранных из аминокислотных остатков 329, 331 и 322 в константном участке, пронумерованных в соответствии с индексом ЕС по Кабату, могут быть заменены другим аминокислотным остатком, так что антитело или его антиген-связывающий фрагмент имеют измененное связывание C1q и/или пониженную или аннулированную цитотоксичность, зависящую от комплемента (CDC). Этот подход более подробно описан в пат. США № 6194551 (Idusogie et al.). В некоторых вариантах осуществления данного изобретения один или более аминокислотных остатков в аминокислотных положениях с 231 по 238 в N-концевом участке домена CH2 изменены, чтобы тем самым изменить способность антитела фиксировать комплемент. Этот подход описан далее в международной публикации № WO 94/29351. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения Fc участок модифицируют для увеличения способности антитела или его антигенсвязывающего фрагмента опосредовать антителозависимую клеточную цитотоксичность (АЗКЦ) и/или для увеличения сродства антитела или его антигенсвязывающего фрагмента к Fcγ рецептору путем мутации одной или более аминокислот (например, путем введения аминокислотных замен) в следующих положениях: 238, 239, 248, 249, 252, 254, 255, 256, 258, 265, 267, 268, 269, 270, 272, 276, 278, 280, 283, 285, 286, 289, 290, 292, 293, 294, 295, 296, 298, 301, 303, 305, 307, 309, 312, 315, 320, 322, 324, 326, 327, 328, 329, 330, 331, 333, 334, 335, 337, 338, 340, 360, 373, 376, 378, 382, 388, 389, 398, 414, 416, 419, 430, 434, 435, 437, 438 или 439, пронумерованные в соответствии с индексом ЕС по Кабату. Этот подход описан далее в международной публикации № WO 00/42072.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в данном изобретении, содержат константный домен IgG1 с мутацией (например, замещением) в положении 267, 328 или их комбинацией, пронумерованной в соответствии с индексом ЕС по Кабату. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанный в данном изобретении, содержат константный домен IgG1 с мутацией (например, замещением), выбранной из группы, состоящей из S267E, L328F и их комбинации. В некото-

рых вариантах осуществления данного изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанный в данном изобретении, содержат константный домен IgG1 с мутацией S267E/L328F (например, замещением). В некоторых вариантах осуществления данного изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанный в данном изобретении, содержащие константный домен IgG1 с мутацией S267E/L328F (например, замещение), обладают повышенной аффинностью связывания с FcγRIIA, FcγRIIB или FcγRIIA и FcγRIIB.

Сообщалось, что антитела с пониженным содержанием фукозы обладают повышенной аффинностью к Fc рецепторам, таким как, например, FcγRIIA. Соответственно в определенных вариантах осуществления данного изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в данном изобретении, имеет пониженное содержание фукозы или лишено фукозы (т.е. является "афукозилированным"). Такие антитела или их антигенсвязывающие фрагменты могут быть получены с использованием методик, известных специалисту в данной области техники. Например, они могут быть экспрессированы в клетках с дефицитом или отсутствием способности к фукозилрованию. В конкретном примере клеточные линии с нокаутом обоих аллелей α1,6-фукозилтрансферазы можно использовать для получения антител или их антигенсвязывающих фрагментов с пониженным содержанием фукозы. Система Potelligent® (Lonza) является примером такой системы, которую можно использовать для получения антител и их антигенсвязывающих фрагментов с пониженным содержанием фукозы. Альтернативно антитела или их антигенсвязывающие фрагменты с пониженным содержанием фукозы или без содержания фукозы могут быть получены, например, путем

- (i) культивирования клеток в условиях, которые предотвращают или уменьшают фукозилрование;
- (ii) посттрансляционного удаления фукозы (например, с помощью фермента фукозидазы);
- (iii) посттрансляционного добавления желаемого углевода, например, после рекомбинантной экспрессии негликозилированного гликопротеина; или
- (iv) очистки гликопротеина с целью отбора антител или их антигенсвязывающих фрагментов, которые не являются фукозилированными.

См., например, Longmore G.D. & Schachter H. (1982), *Carbohydr. Res.*, 100:365-92; Imai-Nishiya H. et al. (2007), *BMC Biotechnol.*, 7:84 для способов получения их антител без содержания фукозы или с пониженным содержанием фукозы. См. также пример 8 в данном изобретении, описывающий получение афукозилированных антител B7-H4.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения антитело B7-H4 или его антигенсвязывающий фрагмент имеют повышенную активность АЗКЦ *in vitro* по сравнению с фукозилированными антителами B7-H4 или их антигенсвязывающими фрагментами, имеющими одинаковую аминокислотную последовательность. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения афукозилированные антитела B7-H4 или их антигенсвязывающие фрагменты вызывают специфический лизис, который составляет по меньшей мере 10, по меньшей мере 15, по меньшей мере 20, по меньшей мере 25, по меньшей мере 30, по меньшей мере 35, по меньшей мере 40, по меньшей мере 45, по меньшей мере 50, по меньшей мере 60, по меньшей мере 65, по меньшей мере 70 или по меньшей мере на 75 процентных пунктов больше, чем специфический лизис с фукозилированными антителами B7-H4.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения антитело B7-H4 или его антигенсвязывающий фрагмент имеют повышенную аффинность к Fc-гамма RIIIА по сравнению с фукозилированными антителами B7-H4 или их антигенсвязывающими фрагментами, имеющими одинаковую аминокислотную последовательность. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения афукозилированные антитела B7-H4 или их антигенсвязывающие фрагменты связываются с Fc-гамма RIIIА по меньшей мере в 2 раза, по меньшей мере в 3 раза, по меньшей мере в 4 раза, по меньшей мере в 5 раз, по меньшей мере в 7 раз, по меньшей мере в 10 раз, по меньшей мере в 12 раз, по меньшей мере в 15 раз, по меньшей мере в 17 раз или по меньшей мере в 20 раз большей аффинностью, чем у фукозилированных антител B7-H4 или их антигенсвязывающих фрагментов. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения аффинность к Fc-гамма RIIIА определяют с использованием поверхностного плазмонного резонанса. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения Fc-гамма RIIIА выбран из Fc-гамма RIIIА (V158) и Fc-гамма RIIIА (F158). В некоторых вариантах осуществления данного изобретения Fc-гамма RIIIА представляет собой Fc-гамма RIIIА (V158). В некоторых вариантах осуществления данного изобретения присутствие фукозы может быть определено способом, включающим высокоэффективную жидкостную хроматографию (ВЭЖХ), капиллярный электрофорез или масс-спектрометрию MALDI-TOF.

В конкретных вариантах осуществления данного изобретения, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент

- (i) содержат последовательности CDR 20502 (например, аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 458-463), последовательности VH и VL 20502 (аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 464 и 42 соответственно) или последовательности тяжелой и легкой цепей 20502 (аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 469 и 44 соответственно); и
- (ii) являются афукозилированными.

В конкретных вариантах осуществления данного изобретения, композиция содержит антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые

(i) содержат последовательности CDR 20502 (например, аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 458-463), последовательности VH и VL 20502 (аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 464 и 42 соответственно) или последовательности тяжелой и легкой цепей 20502 (аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 469 и 44 соответственно); и

(ii) являются афукозилированными, например, при этом по меньшей мере 95% антител в композиции являются афукозилированными или в которых фукозилирование не обнаружено в композиции.

В конкретных вариантах осуществления данного изобретения, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент

(i) содержат последовательности CDR 20502.1 (например, аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 35-40), последовательности VH и VL 20502.1 (аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 41 и 42 соответственно) или последовательности тяжелой и легкой цепей 20502.1 (аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 43 и 44 соответственно); и

(ii) являются афукозилированными.

В конкретных вариантах осуществления данного изобретения, композиция содержит антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые

(i) содержат последовательности CDR 20502.1 (например, аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 35-40), последовательности VH и VL 20502.1 (аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 41 и 42 соответственно) или последовательности тяжелой и легкой цепей 20502.1 (аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 43 и 44 соответственно); и

(ii) являются афукозилированными, например, при этом по меньшей мере 95% антител в композиции являются афукозилированными или в которых фукозилирование не обнаружено в композиции.

В конкретных вариантах осуществления данного изобретения, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент

(i) содержат последовательности CDR 22213 (например, аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 65-70), последовательности VH и VL 22213 (аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 71 и 72 соответственно) или последовательности тяжелой и легкой цепей 22213 (аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 73 и 74 соответственно); и

(ii) являются афукозилированными.

В конкретных вариантах осуществления данного изобретения, композиция содержит антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые

(i) содержат последовательности CDR 22213 (например, аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 65-70), последовательности VH и VL 22213 (аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 71 и 72 соответственно) или последовательности тяжелой и легкой цепей 22213 (аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 73 и 74 соответственно); и

(ii) являются афукозилированными, например, при этом по меньшей мере 95% антител в композиции являются афукозилированными или в которых фукозилирование не обнаружено в композиции.

Инженерные гликоформы могут быть полезны для различных целей, включая, но не ограничиваясь ими, усиление или уменьшение эффекторной функции. Способы получения сконструированных гликоформ в антителе или его антигенсвязывающем фрагменте, описанные в данном изобретении, включают, но не ограничиваются описанными, например, в Umana P. et al. (1999), *Nat Biotechnol.*, 17:176-180; Davies J. et al. (2001), *Biotechnol. Bioeng.*, 74:288-294; Shields R.L. et al. (2002), *J. Biol. Chem.*, 277:26733-26740; Shinkawa T. et al. (2003), *J. Biol. Chem.*, 278:3466-3473; Niwa R. et al. (2004), *Clin. Cancer Res.*, 1:6248-6255; Presta L.G. et al. (2002), *Biochem. Soc. Trans.*, 30:487-490; Kanda Y. et al. (2007), *Glycobiology*, 17:104-118; пат. США № 6602684; 6946292; и 7214775; патентные публикации США № 2007/0248600; 2007/0178551; 2008/0060092; и 2006/0253928; международная публикация № WO 00/61739; WO 01/292246; WO 02/311140; и WO 02/30954; Технология Potillegent™ (Biowa, Inc., Принстон, Нью-Джерси); и технология гликозилирования GlycoMAb® (Glycart biotechnology AG, Цюрих, Швейцария). См. также, например, Ferrara C. et al. (2006), *Biotechnol. Bioeng.*, 93:851-861; международная публикация № WO 07/039818; WO 12/130831; WO 99/054342; WO 03/011878; и WO 04/065540.

В определенных вариантах осуществления данного изобретения любая из мутаций или модификаций константного участка, описанные в данном изобретении, может быть введены в один или обе константных участка тяжелой цепи антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, описанных в данном изобретении, имеющих два константных участка тяжелой цепи.

В другом конкретном варианте осуществления данного изобретения, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в данном изобретении, которые иммуноспецифично связываются с B7-N4 (например, B7-N4 человека), содержат тяжелую цепь и легкую цепь, при этом

(i) тяжелая цепь содержит домен VH, содержащий аминокислотные последовательности CDR1 VH, CDR2 VL и CDR3 VL антитела, перечисленного в табл. 1 (например, SEQ ID NO: 458-460, 35-37 или 65-67);

(ii) легкая цепь содержит домен VL, содержащий аминокислотные последовательности CDR1 VL,

CDR2 VH и CDR3 VH того же антитела, перечисленного в табл. 2 (например, SEQ ID NO: 461-463, 38-40 или 68-70); и

(iii) тяжелая цепь дополнительно содержит константный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность константного домена тяжелой цепи IgG1 человека;

(iv) легкая цепь дополнительно содержит домен константной легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность константного домена легкой цепи каппа человека.

В другом конкретном варианте осуществления данного изобретения, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в данном изобретении, которые иммуноспецифично связываются с B7-H4 (например, человеческим B7-H4), содержат тяжелую цепь и легкую цепь, при этом

(i) тяжелая цепь содержит домен VH, содержащий аминокислотную последовательность антитела, указанного в табл. 3 (например, SEQ ID NO: 464, 41 или 71);

(ii) легкая цепь содержит домен VL, содержащий аминокислотную последовательность того же антитела, указанного в табл. 4 (например, SEQ ID NO: 42 или 73); и

(iii) тяжелая цепь дополнительно содержит константный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность константного домена тяжелой цепи человеческого IgG1;

(iv) легкая цепь дополнительно содержит домен константной легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность константного домена легкой цепи каппа человека.

В конкретных вариантах осуществления данного изобретения, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в данном изобретении, которые иммуноспецифично связываются с B7-H4 (например, B7-H4 человека), проявляет активность блокады Т-клеточной контрольной точки. Иллюстративные способы измерения активности блокады Т-клеточной контрольной точки представлены в примерах 7 и 11. В конкретных вариантах осуществления данного изобретения, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в данном изобретении, которые иммуноспецифично связываются с B7-H4 (например, B7-H4 человека), увеличивает продукцию гамма-интерферона (ИФН γ) в Т-клетках. Иллюстративные способы измерения продукции ИФН γ представлены в данном изобретении в примерах 7 и 11. В конкретных вариантах осуществления данного изобретения, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в данном изобретении, которые иммуноспецифично связываются с B7-H4 (например, B7-H4 человека), увеличивает пролиферацию Т-клеток. Иллюстративные способы измерения пролиферации Т-клеток представлены в данном изобретении в примере 7. В конкретных вариантах осуществления данного изобретения, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в данном изобретении, которые иммуноспецифично связываются с B7-H4 (например, B7-H4 человека), увеличивает пролиферацию CD4 $^{+}$ Т-клеток. Иллюстративные способы измерения пролиферации CD4 $^{+}$ Т-клеток представлены в данном изобретении в примере 7. В конкретных вариантах осуществления данного изобретения, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в данном изобретении, которые иммуноспецифично связываются с B7-H4 (например, B7-H4 человека), увеличивает пролиферацию CD8 $^{+}$ Т-клеток. Иллюстративные способы измерения пролиферации CD8 $^{+}$ Т-клеток представлены в данном изобретении в примере 7.

В конкретных вариантах осуществления данного изобретения, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в данном изобретении, которые иммуноспецифично связываются с B7-H4 (например, B7-H4 человека), проявляет активность антителозависимой клеточной цитотоксичности (АЗКЦ). В конкретных вариантах осуществления данного изобретения, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в данном изобретении, которые иммуноспецифично связываются с B7-H4 (например, B7-H4 человека), проявляет активность антителозависимой клеточной цитотоксичности (АЗКЦ) в клеточных линиях с по меньшей мере 300000 молекул B7-H4 клеточной поверхности (например, SK-BR-3 клеток). В конкретных вариантах осуществления данного изобретения, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в данном изобретении, которые иммуноспецифично связываются с B7-H4 (например, B7-H4 человека), проявляют активность антителозависимой клеточной цитотоксичности (АЗКЦ) в клеточных линиях с по меньшей мере 100000 молекул B7-H4 клеточной поверхности (например, HCC 1569 клеток). В конкретных вариантах осуществления данного изобретения, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в данном изобретении, которые иммуноспецифично связываются с B7-H4 (например, B7-H4 человека), проявляют активность антителозависимой клеточной цитотоксичности (АЗКЦ) в клеточных линиях с по меньшей мере 50000 молекул B7-H4 клеточной поверхности (например, ZR-75-1 клеток). В конкретных вариантах осуществления данного изобретения, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в данном изобретении, которые иммуноспецифично связываются с B7-H4 (например, B7-H4 человека), проявляют активность антителозависимой клеточной цитотоксичности (АЗКЦ) в клеточных линиях с по меньшей мере 30000 молекул B7-H4 клеточной поверхности (например, MDA-MB-468 клеток). В конкретных вариантах осуществления данного изобретения, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в данном изобретении, которые иммуноспецифично связываются с B7-H4 (например, B7-H4 человека), проявляют активность антителозависимой клеточной цитотоксичности (АЗКЦ) в клеточных линиях с по меньшей мере 15000 молекул B7-H4 клеточной поверхности (например, HCC1964 клеток). Иллюстративные способы измерения активности

АЗКЦ представлены в данном изобретении в примере 13.

В конкретных вариантах осуществления данного изобретения, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в данном изобретении, которые иммуноспецифично связываются с В7-Н4 (например, В7-Н4 человека), содержат каркасные участки (например, каркасные участки домена VH и/или домена VL), которые являются каркасными участками человека или получены из каркасных участков человека. Неограничивающие примеры каркасных участков человека описаны в данной области техники; например, см. Kabat E.A. et al. (1991) выше. В определенном варианте осуществления данного изобретения, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в данном изобретении, содержат каркасные участки (например, каркасные участки домена VH и/или домена VL), которые являются каркасными участками приматов (например, приматов отличных от человека) или получены от каркасных участков приматов (например, приматов отличных от человека).

В определенных вариантах осуществления данного изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в данном изобретении, которые специфически связываются с В7-Н4 (например, В7-Н4 человека), содержат один, два или более каркасных участков VH (FR), имеющих аминокислотные последовательности, описанные в данном изобретении, для антитела, представленного в табл. 5 выше (например, SEQ ID NO: 465, 466, 467 и/или 469; SEQ ID NO: 235, 236, 237 и/или 238; или SEQ ID NO: 265, 266, 267 и/или 268). В некоторых вариантах осуществления данного изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в данном изобретении, которые специфически связываются с В7-Н4 (например, В7-Н4 человека), содержат один, два или более каркасных участков VL (FR), имеющих аминокислотные последовательности, описанные в данном изобретении, для антитела, указанного в табл. 6 выше (например, SEQ ID NO: 239, 240, 241 и/или 242 или SEQ ID NO: 269, 270, 271 и/или 272). В конкретных вариантах осуществления данного изобретения, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в данном изобретении, которые специфически связываются с В7-Н4 (например, В7-Н4 человека), содержит один, два или более каркасных участков VH, имеющих аминокислотные последовательности, описанные в данном изобретении, для антитела, указанного в табл. 5 выше, и один, два или более каркасных участков VL, имеющих аминокислотные последовательности, описанные в данном изобретении, для того же антитела, указанного в табл. 6 выше (например, (i) SEQ ID NO: 465, 466, 467 и/или 469 и SEQ ID NO: 239, 240, 241 и/или 242; (ii) SEQ ID NO: 235, 236, 237 и/или 238 и SEQ ID NO: 239, 240, 241 и/или 242; или (iii) SEQ ID NO: 265, 266, 267 и/или 268 и SEQ ID NO: 269, 270, 271 и/или 272).

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в данном изобретении, которые специфически связываются с В7-Н4 (например, В7-Н4 человека), содержат каркасные участки 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 последовательностей с каркасными участками VH, описанными в данном изобретении в табл. 5 выше. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в данном изобретении, которые специфически связываются с В7-Н4 (например, В7-Н4 человека), содержат каркасные участки 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 последовательностей с каркасными участками VL, описанными в данном изобретении в табл. 6 выше. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в данном изобретении, которые специфически связываются с В7-Н4 (например, В7-Н4 человека), содержит каркасные участки 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 участками VH, описанными в данном изобретении табл. 5, выше, и каркасные участки 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 участками VL, описанными в данном изобретении табл. 6, выше.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанный в данном изобретении, которое иммуноспецифично связывается с В7-Н4 (например, В7-Н4 человека), содержит домен VH, имеющий 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 аминокислотной последовательностью домена VH 20502 или 22213 (например, SEQ ID NO: 464 или 71), при этом антитело содержит CDR VH, которые идентичны CDR VH 20502 или 22213 (например, SEQ ID NO: 458-460 или 65-67). В некоторых вариантах осуществления данного изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанный в данном изобретении, которое иммуноспецифично связывается с В7-Н4 (например, В7-Н4 человека), содержит домен VL, имеющий 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 аминокислотной последовательностью домена VL 20502 или 22213 (например, SEQ ID NO: 42 или 72), при этом антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит CDR VL, которые идентич-

ны CDR VL 20502 или 22213 (например, SEQ ID NO: 461-463 или 68-70).

В определенных вариантах осуществления данного изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в данном изобретении, которые иммуноспецифично связываются с B7-H4 (например, B7-H4 человека), содержат

(i) домен VH, имеющий 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 аминокислотной последовательностью домен VH 20502 или 22213 (например, SEQ ID NO: 464 или 71); и

(ii) домен VL, имеющий 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 аминокислотной последовательностью домена VL 20502 или 22213 (например, SEQ ID NO: 42 или 72), при этом антитело содержит CDR VH и CDR VL, которые идентичны CDR VH и CDR VL 20502 или 22213 (например, SEQ ID NO: 458-463 или SEQ ID NO: 65-70).

В другом аспекте в данном изобретении представлены антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые связывают тот же эпитоп B7-H4 (например, эпитоп B7-H4 человека), что и антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанный в данном изобретении (например, 20502 или 22213).

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанный в данном изобретении, которое иммуноспецифично связывается с B7-H4 (например, B7-H4 человека), содержит домен VH, имеющий 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 аминокислотной последовательностью домена VH 20502.1 или 22213 (например, SEQ ID NO: 41 или 71), при этом антитело содержит CDR VH, которые идентичны CDR VH 20502.1 или 22213 (например, SEQ ID NO: 35-37 или 65-67).

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанный в данном изобретении, которое иммуноспецифично связывается с B7-H4 (например, B7-H4 человека), содержит домен VL, имеющий 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 аминокислотной последовательностью домена VL 20502.1 или 22213 (например, SEQ ID NO: 42 или 72), при этом антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит CDR VL, которые идентичны CDR VL 20502.1 или 22213 (например, SEQ ID NO: 38-40 или 68-70).

В определенных вариантах осуществления данного изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в данном изобретении, которые иммуноспецифично связываются с B7-H4 (например, B7-H4 человека), содержат

(i) домен VH, имеющий 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 аминокислотной последовательностью домен VH 20502.1 или 22213 (например, SEQ ID NO: 41 или 71); и

(ii) домен VL, имеющий 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 аминокислотной последовательностью домена VL 20502.1 или 22213 (например, SEQ ID NO: 42 или 72), при этом антитело содержит CDR VH и CDR VL, которые идентичны CDR VH и CDR VL 20502.1 или 22213 (например, SEQ ID NO: 35-40 или SEQ ID NO: 65-70).

В другом аспекте в данном изобретении представлены антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые связывают тот же эпитоп B7-H4 (например, эпитоп B7-H4 человека), что и антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанный в данном изобретении (например, 20502.1 или 22213).

Анализ конкурентного связывания можно использовать для определения того, связываются ли два антитела с перекрывающимися эпитопами. Конкурентное связывание может быть определено в анализе, в котором тестируемый иммуноглобулин ингибирует специфическое связывание эталонного антитела с общим антигеном, таким как B7-H4. Известны многочисленные типы анализов конкурентного связывания, например: твердофазный прямой или непрямой радиоиммуноанализ (РИА), твердофазный прямой или непрямой иммуноферментный анализ (ИФА), анализ сэндвич-конкуренции (см. Stahli C. et al. (1983), *Methods Enzymol.*, 9:242-253); твердофазный прямой биотин-авидин ИФА (см. Kirkland T.N. et al. (1986), *J. Immunol.*, 137:3614-9); твердофазный прямой меченый анализ, твердофазный прямой меченый сэндвич-анализ (см. Harlow E. & Lane D. (1988), *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press); твердофазный РИА с прямой меткой с использованием метки I-125 (см. Morel G.A. et al. (1988), *Mol. Immunol.*, 25(1):7-15); твердофазный прямой биотин-авидин ИФА (Cheung R.C. et al. (1990), *Virology*, 176:546-52); и РИА с прямой меткой. (Moldenhauer G. et al. (1990), *Scand. J. Immunol.*, 32:77-82). Как правило, такой анализ включает использование очищенного антигена (например, B7-H4, такого как B7-H4 человека), связанного с твердой поверхностью, или клеток, несущих любой из них, немеченый тестовый иммуноглобулин и меченый эталонный иммуноглобулин. Конкурентное ингибирование может быть измерено путем определения количества метки, связанной с твердой поверхностью или клетками в присутствии тестируемого иммуноглобулина. Обычно тестируемый иммуноглобулин присутствует в избытке. Обыч-

но, 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 больше. Анализ конкурентного связывания может быть сконфигурирован в большом количестве различных форматов с использованием либо меченого антигена, либо меченого антитела. В обычной версии этого анализа антиген иммобилизован на 96-луночном планшете. Способность немеченых антител блокировать связывание меченых антител с антигеном затем измеряют с использованием радиоактивных или ферментных меток. 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; и *Antibodies: A Laboratory Manual*, Ed Harlow E. & Lane D. editors supra, p. 386-389.

В одном варианте осуществления данного изобретения конкурентный анализ проводят с использованием поверхностного плазмонного резонанса (BIAcore®), например, с использованием "тандемного подхода", такого как описанный в Abdiche Y.N. et al. (2009), *Analytical. Biochem.*, 386:172-180, в результате чего антиген В7-Н4 иммобилизуется на поверхности чипа, например, сенсорный чип CM5 и анти-В7-Н4 антитело затем прогоняют через чип. Чтобы определить, конкурирует ли антитело или его антигенсвязывающий фрагмент с анти-В7-Н4 антителом, описанным в данном изобретении, анти-В7-Н4 антитело сначала наносят на поверхность чипа для достижения насыщения, а затем добавляют потенциальное конкурирующее антитело. Связывание конкурирующего антитела или его антигенсвязывающего фрагмента может быть затем определено и количественно определено относительно неконкурентного контроля.

В одном варианте осуществления данного изобретения конкурентное связывание Fortebio Octet (например, как описано в примере 2 ниже) используется для определения того, что антитело В7-Н4 или его антигенсвязывающий фрагмент конкурентно ингибируют связывание другого антитела В7-Н4 или его антигенсвязывающего фрагмента с В7-Н4.

В другом аспекте в данном изобретении представлены антитела, которые конкурентно ингибируют (например, в зависимости от дозы) антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в данном изобретении (например, 20502, 20502.1 или 22213), от связывания с В7-Н4 (например, В7-Н4 человека), как определено с использованием анализов, известных специалисту в данной области техники или описанных в данном изобретении (например, конкурентные анализы ИФА или анализ массива суспензий или поверхностного плазмонного резонанса).

В конкретных аспектах в данном изобретении представлено антитело или антигенсвязывающий фрагмент, который конкурентно ингибирует (например, в зависимости от дозы) связывание с В7-Н4 (например, В7-Н4 человека) антитела, содержащего домен VH, имеющий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 464, и домен VL, имеющий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 42.

В конкретных аспектах в данном изобретении представлено антитело или антигенсвязывающий фрагмент, который конкурентно ингибирует (например, в зависимости от дозы) связывание с В7-Н4 (например, В7-Н4 человека) антитела, содержащего домен VH, имеющий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 41, и домен VL, имеющий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 42.

В конкретных аспектах в данном изобретении представлено антитело или антигенсвязывающий фрагмент, который конкурентно ингибирует (например, в зависимости от дозы) связывание с В7-Н4 (например, В7-Н4 человека) антитела, содержащего домен VH, имеющий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 71, и домен VL, имеющий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 72.

В конкретных аспектах в данном изобретении представлено антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который конкурентно ингибирует (например, в зависимости от дозы) связывание с В7-Н4 (например, В7-Н4 человека), причем антитело содержит

(i) домен VH, содержащий CDR1 VH, CDR2 VH и CDR3 VH, имеющие аминокислотные последовательности CDR VH, перечисленные в табл. 1; и

(ii) домен VL, содержащий CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL, имеющие аминокислотные последовательности CDR, перечисленные в табл. 2.

В конкретных аспектах в данном изобретении представлено антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который иммуноспецифично связывается с тем же эпитопом В7-Н4 (например, В7-Н4 человека), что и эпитоп 20502, 20502.1 или 22213. В другом конкретном варианте осуществления данного изобретения, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанный в данном изобретении, иммуноспецифично связывается с тем же эпитопом В7-Н4 (например, В7-Н4 человека), что и антитело, содержащее

(i) домен VH, содержащий CDR1 VH, CDR2 VH и CDR3 VH, имеющие аминокислотные последовательности CDR, перечисленных в табл. 1; и

(ii) домен VL, содержащий CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL, имеющий аминокислотные последова-

тельности CDR, перечисленные в табл. 2.

В конкретном аспекте описанный в данном изобретении антигенсвязывающий фрагмент, который иммуноспецифически связывается с В7-Н4 (например, В7-Н4 человека), выбран из группы, состоящей из Fab, Fab', F(ab')₂ и scFv, где Fab, Fab', F(ab')₂ или scFv содержат последовательность варибельного участка тяжелой цепи и последовательность варибельного участка легкой цепи анти-В7-Н4 антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, как описано в данном изобретении. Fab, Fab', F(ab')₂ или scFv могут быть получены любым способом, известным специалистам в данной области техники, включая, но не ограничиваясь этим, рассмотренный в разделе 5.3 ниже. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения Fab, Fab', F(ab')₂ или scFv дополнительно содержат фрагмент, который продлевает период полужизни антитела *in vivo*. Фрагмент также называют "фрагмент, продлевающий период полужизни". Может быть использован любой фрагмент, известный специалистам в данной области техники, для продления периода полужизни Fab, Fab', F(ab')₂ или scFv *in vivo*. Например, фрагмент, продлевающий период полужизни, может включать Fc-участок, полимер, альбумин или белок, связывающий альбумин, или соединение. Полимер может содержать природный или синтетический, необязательно замещенный прямой или разветвленный полиалкилен, полиалкенилен, полиоксилалкилен, полисахарид, полиэтиленгликоль, полипропиленгликоль, поливиниловый спирт, метоксиполиэтиленгликоль, лактозу, амилозу, декстран, гликоген или их производное. Заместители могут включать одну или более гидроксильные, метил или метоксигруппы. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения Fab, Fab', F(ab')₂ или scFv могут быть модифицированы путем добавления одной или более С-концевых аминокислот для присоединения фрагмента, увеличивающего период полужизни. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения фрагмент, увеличивающий период полужизни представляет собой полиэтиленгликоль или человеческий сывороточный альбумин. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения Fab, Fab', F(ab')₂ или scFv сливаются с Fc участком.

Анти-В7-Н4 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент могут быть слиты или конъюгированы (например, ковалентно или нековалентно связаны) с детектируемой меткой или веществом. Примеры обнаруживаемых меток или веществ включают 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 и родамин, и биотин. Такие меченые антитела или их антигенсвязывающие фрагменты можно использовать для обнаружения белка В7-Н4 (например, В7-Н4 человека). См., например, раздел 5.5.2, 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 данном изобретении, используют, если не указано иное, общепринятые способы в области молекулярной биологии, микробиологии, генетического анализа, рекомбинантной ДНК, органической химии, биохимии, ПЦР, синтеза и модификации олигонуклеотидов, гибридизации нуклеиновых кислот и смежных областей техники. Эти методики описаны, например, в ссылках, цитируемых в данном документе, 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 F.M. 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 данном изобретении предлагается способ получения антитела или антигенсвязывающего фрагмента, который иммуноспецифически связывается с В7-Н4 (например, В7-Н4 человека), включающий культивирование клетки или клетки-хозяина, описанных в данном изобретении. В определенном аспекте в данном изобретении предлагается способ получения антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, который иммуноспецифически связывается с В7-Н4 (например, В7-Н4 человека), включающий экспрессию (например, рекомбинантную экспрессию) антитела или антигенсвязывающего фрагмента с использованием клетки или клетки-хозяина, описанных в данном изобретении (например, клетки или клетки-хозяина, содержащих полинуклеотиды, кодирующие антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в данном изобретении). В конкретном варианте осуществления данного изобретения, клетка представляет собой выделенную клетку. В конкретном варианте осуществления данного изобретения, экзогенные полинуклеотиды были введены в клетку. В конкретном варианте осуществления данного изобретения, способ дополнительно включает стадию очистки антитела или антигенсвязывающего фрагмента, полученного 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, Нью-Йорк).

Моноклональные антитела или их антигенсвязывающие фрагменты могут быть получены с исполь-

зованием широкого спектра методов, известных в данной области техники, включая использование гибридных, рекомбинантных и фаговых технологий отображения, технологий презентации на основе дрожжей или их комбинации. Например, моноклональные антитела или их антигенсвязывающие фрагменты могут быть получены с использованием гибридных методов, включая те, которые известны в данной области техники и описаны, 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*, 563, 681 (Elsevier, N.Y., 1981); или как описано в Kohler G. & Milstein C. (1975), *Nature*, 256:495. Примеры способов презентации на основе дрожжей, которые можно использовать для отбора и генерирования антител, описанных в данном изобретении, включают способы, описанные, например, в WO 2009/036379 A2; WO 2010/105256; и WO 2012/009568, каждый из которых включен в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

В конкретных вариантах осуществления данного изобретения, моноклональное антитело или антигенсвязывающий фрагмент представляет собой антитело или антигенсвязывающий фрагмент, продуцируемый клональной клеткой (например, гибридомой или клеткой-хозяином, продуцирующим рекомбинантное антитело или антигенсвязывающий фрагмент), при этом антитело или антигенсвязывающий фрагмент иммуноспецифически связываются с B7-H4 (например, B7-H4 человека), как определено, например, с помощью ИФА или других антигенсвязывающих анализов, известных в данной области техники или в примерах, представленных в данном изобретении. В конкретных вариантах осуществления данного изобретения, моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент может представлять собой химерное или гуманизованное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент может быть фрагментом Fab или фрагментом F(ab')₂. Моноклональные антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, описанные в данном изобретении, могут, например, быть получены гибридным способом, как описано в Kohler G. & Milstein C. (1975), *Nature*, 256:495 или могут быть, например, выделены из фаговых библиотек, например, с использованием описанных в данном изобретении методик. 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).

Описанные в данном изобретении антигенсвязывающие фрагменты антител могут быть получены любым способом, известным специалистам в данной области техники. Например, описанные в данном изобретении фрагменты Fab и F(ab')₂ могут быть получены путем протеолитического расщепления молекул иммуноглобулина с использованием ферментов, таких как папаин (для получения фрагментов Fab) или пепсин (для получения фрагментов F(ab')₂). Фрагмент Fab соответствует одному из двух идентичных плеч молекулы тетрамерного антитела и содержит полную легкую цепь в паре с доменами VH и CH1 тяжелой цепи. Фрагмент F(ab')₂ содержит два антигенсвязывающих плеча молекулы тетрамерного антитела, связанных дисульфидными связями в шарнирном участке. Кроме того, антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, описанные в данном изобретении, также могут быть получены с использованием различных методов фагового дисплея и/или дрожжевого представления, известных в данной области. В способах фагового дисплея белки отображают на поверхности частиц фага, которые несут кодирующие их полинуклеотидные последовательности. В частности, последовательности ДНК, кодирующие домены VH и VL, амплифицируются из библиотек кДНК животных (например, пораженных тканей библиотек кДНК человека или мыши). ДНК, кодирующая домены VH и VL, рекомбинируется вместе с линкером scFv с помощью ПНР и клонируется в фагмидный вектор. Вектор электропорирован в *E.coli*, и *E.coli* инфицируется хэлперным фагом. Фаг, используемый в этих способах, обычно представляет собой нитевидный фаг, включая fd и M13, и домены VH и VL обычно рекомбинантно сливаются с геном III или геном VIII фага. Фаг, экспрессирующий антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с конкретным антигеном, может быть выбран или идентифицирован с антигеном, например, с использованием меченого антигена или антигена, связанного или захваченного на твердой поверхности или грануле. Примеры способов фагового дисплея, которые можно использовать для получения антител или фрагментов, описанных в данном изобретении, включают способы, описанные в 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; заявка PCT № PCT/GB91/001134; международные публикации № 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; и пат. США № 5698426, 5223409, 5403484, 5580717, 5427908, 5750753, 5821047, 5571698, 5427908, 5516637, 5780225, 5658727, 5733743 и 5969108.

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

1.2.1. Полинуклеотиды.

В определенных аспектах в данном изобретении представлены полинуклеотиды, содержащие нуклеотидную последовательность, кодирующую антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описан-

ный в данном изобретении, или его домен (например, переменный участок легкой цепи и/или переменный участок тяжелой цепи), который иммуноспецифично связывается с В7-Н4 антигеном (например, В7-Н4 человека), и векторы, например, векторы, содержащие такие полинуклеотиды для рекомбинантной экспрессии в клетках-хозяевах (например, в клетках *E.coli* и млекопитающих). В конкретных аспектах в данном изобретении представлены полинуклеотиды, содержащие нуклеотидные последовательности, кодирующие антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые иммуноспецифично связываются с полипептидом В7-Н4 (например, В7-Н4 человека) и содержат аминокислотную последовательность, как описано в данном изобретении, а также антитела или антигенсвязывающие фрагменты, которые конкурируют с такими антителами или антигенсвязывающими фрагментами за связывание с полипептидом В7-Н4 (например, в зависимости от дозы), или которые связываются с тем же эпитопом, что и эпитоп такого антитела или антигенсвязывающих фрагментов.

В данном изобретении также представлен полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид, содержащий последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 11, 12, 21, 22, 31, 32, 41, 464, 42, 51, 52, 61, 62, 71, 72, 81, 82, 91, 92, 101, 102, 111, 112, 121, 122, 131, 132, 141, 142, 151, 152, 161, 162, 171, 172, 181, 182, 191, 192, 201 и 202. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащий полипептид, иммуноспецифично связываются с В7-Н4.

В данном изобретении также представлен полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид, содержащий последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 13, 14, 23, 24, 33, 34, 43, 469, 44, 53, 54, 63, 64, 73, 74, 83, 84, 93, 94, 103, 104, 113, 114, 123, 124, 133, 134, 143, 144, 153, 154, 163, 164, 173, 174, 183, 184, 193, 194, 203 и 204. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащий полипептид, иммуноспецифично связываются с В7-Н4.

В данном изобретении также представлены полинуклеотиды, содержащие нуклеотидную последовательность, кодирующую переменную тяжелую цепь, показанную в табл. 9, например, при этом антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие кодируемую переменную тяжелую цепь, связываются с В7-Н4.

Таблица 9

Полинуклеотидные последовательности, кодирующие переменную тяжелую цепь

Антитело	Полинуклеотидные последовательности, кодирующие переменную тяжелую цепь (SEQ ID NO)
15461	CAGCTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCAGGACTGGTGAAGCCTTCG GAGACCCTGTCCCTCACCTGCACTGTCTCTGGTGGCTCCATCAGCA GTAGTAGTTACTACTGGGGCTGGATCCGCCAGCCCCAGGGAAGG GGCTGGAGTGGATTGGGAACATCTATTATAGTGGGAGCACCTACT
	ACAACCCGTCCCTCAAGAGTCGAGTCACCATATCCGTAGACACGT CCAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGTTCTGTGACCGCCGCAG ACACGGCGGTGTACTACTGCGCCAGAGAAGGATCTTACCCCAATT GGTTTGATCCATGGGGACAGGGTACATTGGTCACCGTCTCCTCA (SEQ ID NO:213)
20500	CAGCTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCAGGACTGGTGAAGCCTTCG GAGACCCTGTCCCTCACCTGCACTGTCTCTGGTGGCTCCATCAAGA GTGGTAGTCACTACTGGGGCTGGATCCGCCAGCCCCAGGGAAGG GGCTGGAGTGGATTGGGAACATCTATTATAGTGGGAGCACCTACT ACAACCCGTCCCTCAGGAGTCGAGTCACCATATCCGTAGACACGT CCAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGTTCTGTGACCGCCGCAG ACACGGCGGTGTACTACTGCGCCAGGGAAGGATCTTACCCCAATT GGTTTGATCCATGGGGACAGGGTACATTGGTCACCGTCTCCTCA (SEQ ID NO:223)

20501	CAGCTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCAGGACTGGTGAAGCCTTCG GAGACCCTGTCCCTCACCTGCACTGTCTCTGGTGGCTCCATCAAGA GTGGTAGTCACTACTGGGGCTGGATCCGCCAGCCCCAGGGAAGG GGCTGGAGTGGATTGGGAACATCTATTATAGTGGGAGCACCTACT ACAACCCGTCCCTCAAGAGTCGAGTCACCATATCCGTAGACACGT CCAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGTTCTGTGACCGCCGCAG ACACGGCGGTGTACTACTGCGCCAGAGAAGGATCTTACCCCAATT GGTTGGATCCATGGGGACAGGGTACATTGGTCACCGTCTCCTCA (SEQ ID NO:233)
20502	CAGCTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCAGGACTGGTGAAGCCTTCG GAGACCCTGTCCCTCACCTGCACTGTCTCTGGTGGCTCCATCAAAA GTGGTAGTTACTACTGGGGCTGGATCCGCCAGCCCCAGGGAAGG GGCTGGAGTGGATTGGGAACATCTATTATAGTGGGAGCACCTACT ACAACCCGTCCCTCAGAAGTCGAGTCACCATATCCGTAGACACGT CCAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGTTCTGTGACCGCCGCAG ACACGGCGGTGTACTACTGCGCCAGAGAAGGATCTTACCCCAATC AGTTTGATCCATGGGGACAGGGTACATTGGTCACCGTCTCCTCA (SEQ ID NO:470)
20502,1	CAGCTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCAGGACTGGTGAAGCCTTCG GAGACCCTGTCCCTCACCTGCACTGTCTCTGGTGGCTCCATCAAGA GTGGTAGTTACTACTGGGGCTGGATCCGCCAGCCCCAGGGAAGG
	GGCTGGAGTGGATTGGGAACATCTATTATAGTGGGAGCACCTACT ACAACCCGTCCCTCAAGAGTCGAGTCACCATATCCGTAGACACGT CCAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGTTCTGTGACCGCCGCAG ACACGGCGGTGTACTACTGCGCCAGAGAAGGATCTTACCCCAATC AGTTTGATCCATGGGGACAGGGTATATTGGTCACCGTCTCCTCA (SEQ ID NO:243)
22208	CAGCTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCAGGACTGGTGAAGCCTTCG GAGACCCTGTCCCTCACCTGCACTGTCTCTGGTGGCTCCATCAAGA GTGGTAGTCACTACTGGGGCTGGATCCGCCAGCCCCAGGGAAGG GGCTGGAGTGGATTGGGAACATCTATTATAGTGGGAGCACCTACT ACAACCCGTCCCTCAAGAGTCGAGTCACCATGTCCGTAGACACGT CCAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGTTCTGTGACCGCCGCAG ACACGGCGGTGTACTACTGCGCCAGAGAAGGATCTTACCCCAATT GGTTTGATCCATGGGGACAGGGTACATTGGTCACCGTCTCCTCA (SEQ ID NO:253)
15462	CAGCTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCAGGACTGGTGAAGCCTTCG GAGACCCTGTCCCTCACCTGCACTGTCTCTGGTGGCTCCATCAGCA GTAGTAGTTACTACTGGGGCTGGATCCGCCAGCCCCAGGGAAGG GGCTGGAGTGGATTGGGAACATCTATTATAGTGGGAGCACCTACT ACAACCCGTCCCTCAAGAGTCGAGTCACCATATCCGTAGACACGT CCAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGTTCTGTGACCGCCGCAG ACACGGCGGTGTACTACTGCGCCAGAGAAGGATCTTACACAACCG TGTTAAACGTATGGGGTCAGGGTACAATGGTCACCGTCTCCTCA (SEQ ID NO:263)

22213	CAGCTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCAGGACTGGTGAAGCCTTCG GAGACCCTGTCCCTCACCTGACTGTCTCTGGTGGCTCCATCGGGA GGGGGAGTTACTACTGGGGCTGGATCCGCCAGCCCCAGGGAAG GGGCTGGAGTGGATTGGGAACATCTATTATAGTGGGAGCACCTAC TACAACCCGTCCCTCAAGAGTCGAGTCACCATATCCGTAGACACG TCCAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGTTCTGTGACCGCCGCA GACACGGCGGTGTACTACTGCGCCAGAGAAGGATCTTACACAACC GTGTTAAACGTATGGGGTCAGGGTACAATGGTCACCGTCTCCTCA (SEQ ID NO:273)
15465	CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCAGGACTGGTGAAGCCTTCA CAGACCCTGTCCCTCACCTGTACTGTCTCTGGTGGCTCCATCAGCA
	GTGGTGGTTACTACTGGAGCTGGATCCGCCAGCACCCAGGGAAGG GCCTGGAGTGGATTGGGAACATCTATTACAGTGGGAGCACCTACT ACAACCCGTCCCTCAAGAGTCGAGTTACCATATCAGTAGACACGT CTAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGTTCTGTGACCGCCGAG ACACGGCGGTGTACTACTGCGCCAGAGAATCTAGCACCATATCTG CCGACTTCGACCTATGGGGGAGAGGTACCTTGGTCACCGTCTCCT CA (SEQ ID NO:283)
20506	CAGCTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCAGGACTGGTGAAGCCTTCG GAGACCCTGTCCCTCACCTGTACTGCCTCTGGTGGCTCCATCAGCC ATGGTGGTACTACTGGAGCTGGATCCGCCAGCACCCAGGGAAG GGCCTGGAGTGGATTGGGAACATCTATTACAGTGGGAGCACCTAC TACAATCCGTCCCTCAAGAGTCGAGTTACCATGTCAGTAGACACG TCTAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGTTCTGTGACCGCCGCA GACACGGCGGTGTACTACTGCGCCAGAGAATCTAGCACCATATCT GCCGACTTCGACCTATGGGGGAGAGGTACCTTGGTCACCGTCTCC TCA (SEQ ID NO:293)
15483	CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCAGGACTGGTGAAGCCTTCA CAGACCCTGTCCCTCACCTGTACTGTCTCTGGTGGCTCCATCAGCA GTGGTGGTTACTACTGGAGCTGGATCCGCCAGCACCCAGGGAAGG GCCTGGAGTGGATTGGGAACATCTATTACAGTGGGAGCACCTACT ACAACCCGTCCCTCAAGAGTCGAGTTACCATATCAGTAGACACGT CTAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGTTCTGTGACCGCCGAG ACACGGCGGTGTACTACTGCGCCAGAGGGTTGAGCACCATAGACG AGGCATTCGACCCATGGGGACAGGGTACATTGGTCACCGTCTCCT CA (SEQ ID NO:303)
20513	CAGCTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCAGGACTGGTGAAGCCTTCG GAGACCCTGTCCCTCACCTGACTGTCTCTGGTGGCTCCATCAGCG ATGGTAGTTACTACTGGAGCTGGATCCGCCAGCACCCAGGGAAGG GCCTGGAGTGGATTGGGAACATCTATTACAGTGGGAGCACCTACT ACAACCCGTCCCTCAGGAGTCGAGTTACCATGTCAGTAGACACGT CTAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGTTCTGTGACCGCCGAG ACACGGCGGTGTACTACTGCGCCAGAGGGTTGAGCACCATAGACG AGGCATTCGACCCATGGGGACAGGGTACATTGGTCACCGTCTCCT CA (SEQ ID NO:313)
22216	CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCAGGACTGGTGAAGCCTTCA

	<p>CAGACCCTGTCCCTCACCTGTACTGTCTCTGGTGGCTCCATCAGCG ATGGTAGTTACTACTGGAGCTGGATCCGCCAGCACCCAGGGAAGG GCCTGGAGTGGATTGGGAACATCTATTACAGTGGGAGCACCTACT ACAACCCGTCCCTCAGGAGTCGAGTTACCATGTGACAGTAGACACGT CTAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGTTCTGTGACCGCCGAG ACACGGCGGTGTACTACTGCGCCAGAGGGTTGAGCACCATAGACG AGGCATTCGACCCATGGGGACAGGGTACATTGGTCACCGTCTCCT CA (SEQ ID NO:323)</p>
15489	<p>CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCAGGACTGGTGAAGCCTTCG GAGACCCTGTCCCTCACCTGCACTGTCTCTGGTGGCTCCATCAGTA GTTACTACTGGAGCTGGATCCGGCAGCCCCAGGGAAGGGACTGG AGTGGATTGGGTATATCTATAGTAGTGGGAGCACCAACTACAACC CCTCCCTCAAGAGTCGAGTCACCATATCAGTAGACACGTCCAAGA ACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGTTCTGTGACCGCCGAGACACGG CGGTGTACTACTGCGCCAGAGGCTCTGGACAGTATGCAGCTCCTG ATTATGGAATGGACGTATGGGGCCAGGGAACAACCTGTCACCGTCT CCTCA (SEQ ID NO:333)</p>
20516	<p>CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCAGGACTGGTGAAGCCTTCG GAGACCCTGTCCCTCACCTGCACTGTCTCTGGTGGCTCCATCATT GTTACTACTGGGGGTGGATCCGGCAGCCCCAGGGAAGGGACTG GAGTGGATTGGGTATATCTATTCTAGTGGGAGCACCTCGTACAAC CCCTCCCTCAAGAGTCGAGTCACCATATCAGTAGACACGTCCAAG AACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGTTCTGTGACCGCCGAGACACG GCGGTGTACTACTGCGCCAGAGGCTCTGGACTGTATGCAGCTCCT GATTATGGACTTGACGTATGGGGTCAGGGAACAACCTGTCACCGTC TCCTCA (SEQ ID NO:343)</p>
15472	<p>GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGG GGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTTAGCA GCTATGCCATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGG AGTGGGTCTCAACCATTAGTGGTAGTGGTGGTAGCACATACTACG CAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCAGAGACAATTCCA AGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGAC ACGGCGGTGTACTACTGCGCCAGAGGTGCCGGACACTACGACCTC GTCGGACGATACTGGGGACAGGGTACATTGGTCACCGTCTCCTCA (SEQ ID NO:353)</p>

15503	GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGG GGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACCTTTAGCA GCTATGCCATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGG AGTGGGTCTCAGCTATTAGTGGTAGTGGTGGTAGCACATACTACG CAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCAGAGACAATTCCA AGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGAC ACGGCGGTGTACTACTGCGCCAGAGTGGGATTCAGAGCATTAAAC TACTGGGGACAGGGTACAACCTGTCACCGTCTCCTCA (SEQ ID NO:363)
15495	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGG GTCCTCGGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGAGGCACCTTCAG CAGCTATGCTATCAGCTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCT TGAGTGGATGGGAGGGATCATCCCTATCTTTGGTACAGCAAAGCTA CGCACAGAAGTTCAGGGCAGAGTCACGATTACCGCGGACGAAT CCACGAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAG GACACGGCGGTGTACTACTGCGCAAGACAGCAATACGACGGTAG ACGATACTTCGGCCTATGGGGGAGAGGTACCTTGGTCACCGTCTC CTCA (SEQ ID NO:373)
15478	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGG GTCCTCGGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGAGGCACCTTCAG CAGCTATGCTATCAGCTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCT TGAGTGGATGGGAGGGATCATCCCTATCTTTGGTACAGCAAATA CGCACAGAAGTTCAGGGCAGAGTCACGATTACCGCGGACGAAT CCACGAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAG GACACGGCGGTGTACTACTGCGCCAGAGGTGGGCCTTGGTTTGAT CCATGGGGACAGGGTACATTGGTCACCGTCTCCTCA (SEQ ID NO:383)
15441	GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGG GGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACCTTTAGCA GCTATGCCATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGG AGTGGGTCTCAGCTATTAGTGGTAGTGGTGGTAGCACATCCTACG CAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCAGAGACAATTCCA AGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGAC ACGGCGGTGTACTACTGCGCCAAGCCTTCTTTGGCAACAATGTTA GCCTTCGATATCTGGGGTCAGGGTACAATGGTCACCGTCTCCTCA (SEQ ID NO:393)
20496	CAGCTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCAGGACTGGTGAAGCCTTCG GAGACCCTGTCCCTCACCTGCACTGTCTCTGGTGGCTCCATCAGCA GTAGTGTTTACTACTGGAGTTGGATCCGCCAGCCCCAGGGAAGG GGTTGGAGTGGATTGGGAGTATCCTGGTGGTGGGAGCACCTACT ACAACCCGTCCCTCAAGAGTCGAGTCACCATATCCGTAGACACGT CCAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGTTCTGTGACCGCCGAG ACACGGCGGTGTACTACTGCGCCAGAGCTGTATCCTTCTTAGACG TATGGGGTCAGGGTACAATGGTCATCGTCTCCTCA (SEQ ID NO:403)

В данном изобретении также представлены полинуклеотиды, содержащие нуклеотидную последо-

вательность, кодирующую переменную легкую цепь, показанную в табл. 10, например, при этом анти-тело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие закодированную переменную легкую цепь, связываются с В7-Н4.

Таблица 10

Полинуклеотидные последовательности, кодирующие переменную легкую цепь

Антитело	Полинуклеотидные последовательности, кодирующие переменную легкую цепь (SEQ ID NO)
15461	GAAATAGTGATGACGCAGTCTCCAGCCACCCTGTCTGTGTCTCCA GGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAG CAGCAACTTAGCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCA GGCTCCTCATCTATGGTGCATCCACCAGGGCCACTGGTATCCCAG CCAGGTTCACTGGCAGTGGGTCTGGGACAGAGTTCCTCTCACC ATCAGCAGCCTGCAGTCTGAAGATTTTGCAGTTTATTACTGTCAG CAGTACCACTCCTCCCTTTCCTTTTGGCGGAGGGACCAAGGTT GAGATCAAA (SEQ ID NO:214)
20500	GAAATAGTGATGACGCAGTCTCCAGCCACCCTGTCTGTGTCTCCA GGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAG CAGCAACTTAGCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCA GGCTCCTCATCTATGGTGCATCCACCAGGGCCACTGGTATCCCAG CCAGGTTCACTGGCAGTGGGTCTGGGACAGAGTTCCTCTCACC ATCAGCAGCCTGCAGTCTGAAGATTTTGCAGTTTATTACTGTCAG CAGTACCACTCCTCCCTTTCCTTTTGGCGGAGGGACCAAGGTT GAGATCAAA (SEQ ID NO:224)
20501	GAAATAGTGATGACGCAGTCTCCAGCCACCCTGTCTGTGTCTCCA GGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAG CAGCAACTTAGCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCA GGCTCCTCATCTATGGTGCATCCACCAGGGCCACTGGTATCCCAG CCAGGTTCACTGGCAGTGGGTCTGGGACAGAGTTCCTCTCACC ATCAGCAGCCTGCAGTCTGAAGATTTTGCAGTTTATTACTGTCAG CAGTACCACTCCTCCCTTTCCTTTTGGCGGAGGGACCAAGGTT GAGATCAAA (SEQ ID NO:234)
20502 и 20502,1	GAAATAGTGATGACGCAGTCTCCAGCCACCCTGTCTGTGTCTCCA GGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAG CAGCAACTTAGCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCA GGCTCCTCATCTATGGTGCATCCACCAGGGCCACTGGTATCCCAG CCAGGTTCACTGGCAGTGGGTCTGGGACAGAGTTCCTCTCACC ATCAGCAGCCTGCAGTCTGAAGATTTTGCAGTTTATTACTGTCAG CAGTACCACTCCTCCCTTTCCTTTTGGCGGAGGGACCAAGGTT GAGATCAAA (SEQ ID NO:244)

22208	GAAATAGTGATGACGCAGTCTCCAGCCACCCTGTCTGTGTCTCCA GGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGTCCGTTAG CACCAACTTAGCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCA GGCTCCTCATCTATGACGCATCCGCCAGGGTCACTGGTATCCAG CCAGGTTCACTGGCAGTGGGTCTGGGACAGAGTTCCTCACC ATCAGCAGCCTGCAGTCTGAAGATTTTGCAGTTTATTACTGTCAG CAGTACCCTCCTCCCTTTCACTTTTGGCGGAGGGACCAAGGTT GAGATCAAA (SEQ ID NO:254)
15462	GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTGTCTCCA GGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAG CAGCAGCTACTTAGCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTC CCAGGCTCCTCATCTATGGTGCATCCAGCAGGGCCACTGGCATCC CAGACAGGTTCACTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTC ACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTTGCAGTGTATTACTGT CAGCAGGCCGCCAGTTACCCTCTCACTTTTGGCGGAGGGACCAA GGTTGAGATCAAA (SEQ ID NO:264)
22213	GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTGTCTCCA GGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTGC CAGCAGCCACTTAGCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTC
	CCAGGCTCCTCATCTATGACGCAGTCAGCAGGGCCACTGGCATCC CAGACAGGTTCACTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTC ACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTTGCAGTGTATTACTGT CAGCAGGCCGCCAGTTACCCTCTCACTTTTGGCGGAGGGACCAA GGTTGAGATCAAA (SEQ ID NO:274)
15465	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCTTCCGTGTCTGCATCTGTA GGAGACAGAGTCACCATCACTTGTCTGGGCGAGTCAGGGTATTAG CAGGTGGTTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTA AGCTCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTTGCAAAGTGGGGTCCCAT CAAGGTTCACTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACC ATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGCAGTTTATTACTGTCAG CAGGCACACACCTTCCCTTACACTTTTGGCGGAGGGACCAAGGTT GAGATCAAA (SEQ ID NO:284)
20506	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCTTCCGTGTCTGCATCTGTA GGAGACAGAGTCACCATCACTTGTCTGGGCGAGTCAGGGTATTAG CAGGTGGTTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTA AGCTCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTTGCAAAGTGGGGTCCCAT CAAGGTTCACTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACC ATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGCAGTTTATTACTGTCAG CAGGCACACACCTTCCCTTACACTTTTGGCGGAGGGACCAAGGTT GAGATCAAA (SEQ ID NO:294)

15483	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCTTCCACCCTGTCTGCATCTGTA GGAGACAGAGTCACCATCACTTGCCGGGCCAGTCAGAGTATTAG TAGCTGGTTGGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTA AGCTCCTGATCTATAAAGCCTCCAGTTTGGAAAGTGGGGTCCCAT CAAGGTTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGAATTCACTCTCACC ATCAGCAGCCTGCAGCCTGATGATTTTGCAACTTATTACTGCCAG CAGGACAACAGTTACCCTTACACTTTTGGCGGAGGGACCAAGGT TGAGATCAAA (SEQ ID NO:304)
20513	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCTTCCACCCTGTCTGCATCTGTA GGAGACAGAGTCACCATCACTTGCCGGGCCAGTCAGAGTATTAG TAGCTGGTTGGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTA AGCTCCTGATCTATAAAGCCTCCAGTTTGGAAAGTGGGGTCCCAT CAAGGTTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGAATTCACTCTCACC ATCAGCAGCCTGCAGCCTGATGATTTTGCAACTTATTACTGCCAG
	CAGGACAACAGTTACCCTTACACTTTTGGCGGAGGGACCAAGGT TGAGATCAAA (SEQ ID NO:314)
22216	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCTTCCACCCTGTCTGCATCTGTA GGAGACAGAGTCACCATCACTTGCCGGGCCAGTAAAAGTATTAG TTCTGGTTGGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGAAAAGCCCCTA AGCTCCTGATCTATGAAGCCTCCTCCTTGCACAGTGGGGTCCCAT CAAGGTTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGAATTCACTCTCACC ATCAGCAGCCTGCAGCCTGATGATTTTGCAACTTATTACTGCCAG CAGGACAACAGTTACCCTTACACTTTTGGCGGAGGGACCAAGGT TGAGATCAAA (SEQ ID NO:324)
15489	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCTTCCACCCTGTCTGCATCTGTA GGAGACAGAGTCACCATCACTTGCCGGGCCAGTCAGAGTATTAG TAGCTGGTTGGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTA AGCTCCTGATCTATAAAGCCTCCAGTTTGGAAAGTGGGGTCCCAT CAAGGTTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGAATTCACTCTCACC ATCAGCAGCCTGCAGCCTGATGATTTTGCAACTTATTACTGCCAG CAGGACAATAGCTTCCCTTTCACCTTTTGGCGGAGGGACCAAGGTT GAGATCAAA (SEQ ID NO:334)
20516	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCTTCCACCCTGTCTGCATCTGTA GGAGACAGAGTCACCATCACTTGCCGGGCCAGTCAGAGTATTAG TAGCTGGTTGGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTA AGCTCCTGATCTATAAAGCCTCCAGTTTGGAAAGTGGGGTCCCAT CAAGGTTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGAATTCACTCTCACC ATCAGCAGCCTGCAGCCTGATGATTTTGCAACTTATTACTGCCAG CAGGACAATAGCTTCCCTTTCACCTTTTGGCGGAGGGACCAAGGTT GAGATCAAA (SEQ ID NO:344)

15472	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTA GGAGACAGAGTCACCATCACTTGCCGGGCAAGTCAGAGCATTAG CAGCTATTTAAATTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTA AGCTCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTTGCAAAGTGGGGTCCCAT CAAGGTTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCA TCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTGCAACTTACTACTGTCAGC AACTATACAGTCTCCCTCCTACTTTTGCGGAGGGACCAAGGTTG AGATCAAA (SEQ ID NO:354)
15503	GACATCCAGTTGACCCAGTCTCCATCTTCCGTGTCTGCATCTGTA
	GGAGACAGAGTCACCATCACTTGTCGGGCGAGTCAGGATATTAG CAGCTGGTTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTA AGCTCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTTGCAAAGTGGGGTCCCAT CAAGGTTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACC ATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGCAACTTATTACTGTCAG CAGGCAACCAGTTACCCTCCTTGGACTTTTGCGGAGGGACCAA GGTTGAGATCAAA (SEQ ID NO:364)
15495	GAAATAGTGATGACGCAGTCTCCAGCCACCCTGTCTGTGTCTCCA GGGGAAAGAGCCACCCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAG CAGCAACTTAGCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCA GGCTCCTCATCTATAGCGCATCCACCAGGGCCACTGGTATCCAG CCAGGTTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGAGTTCCTCTCACC ATCAGCAGCCTGCAGTCTGAAGATTTTGCACTTTATTACTGTCAG CAGGTCAACGTCTGGCCTCCTACTTTTGCGGAGGGACCAAGGTT GAGATCAAA (SEQ ID NO:374)
15478	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCTTCCACCCTGTCTGCATCTGTA GGAGACAGAGTCACCATCACTTGCCGGGCCAGTCAGAGTATTAG TAGCTGGTTGGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTA AGCTCCTGATCTATAAAGCCTCCAGTTTGGAAGTGGGGTCCCAT CAAGGTTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGAATTCCTCTCACC ATCAGCAGCCTGCAGCCTGATGATTTTGCAACTTATTACTGCCAG CAGTACAAATAGCTACCCTCCTTTCACTTTTGCGGAGGGACCAAG GTTGAGATCAAA (SEQ ID NO:384)
15441	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCTTCCACCCTGTCTGCATCTGTA GGAGACAGAGTCACCATCACTTGCCGGGCCAGTCAGAGTATTAG TAGCTGGTTGGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTA AGCTCCTGATCTATGATGCCTCCAGTTTGGAAGTGGGGTCCCAT CAAGGTTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGAATTCCTCTCACC ATCAGCAGCCTGCAGCCTGATGATTTTGCAACTTATTACTGCCAG CAGTCCAAAAGTTACCCTAGGACTTTTGCGGAGGGACCAAGGT TGAGATCAAA (SEQ ID NO:394)
20496	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTA GGAGACAGAGTCACCATCACTTGCCGGGCAAGTCAGAGCATTAG CAGCTATTTAAATTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTA AGCTCCTGATCTATGGTGCATCCAGTTTGCAAAGTGGGGTCCCAT

	CAAGGTTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCA TCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTGAACCTACTACTGTCAGC AAAGCTACGACCCCCCTTGGACTTTTGGCGGAGGGACCAAGTT GAGATCAAA (SEQ ID NO:404)
--	--

В данном изобретении также представлены полинуклеотиды, содержащие нуклеотидную последовательность из SEQ ID NO: 213, 214, 223, 224, 233, 234, 243, 470, 244, 253, 254, 263, 264, 273, 274, 283, 284, 293, 294, 303, 304, 313, 314, 323, 324, 333, 334, 343, 344, 353, 354, 363, 364, 373, 374, 383, 384, 393, 394, 403 или 404.

В данном изобретении также представлены полинуклеотиды, содержащие

(i) нуклеотидную последовательность из SEQ ID NO: 213, 214, 223, 224, 233, 234, 243, 470, 244, 253, 254, 263, 264, 273, 274, 283, 284, 293, 294, 303, 304, 313, 314, 323, 324, 333, 334, 343, 344, 353, 354, 363, 364, 373, 374, 383, 384, 393, 394, 403 или 404; и

(ii) нуклеотидную последовательность из SEQ ID NO: 408 или 406.

В данном изобретении также представлены полинуклеотиды, содержащие нуклеотидную последовательность, которая кодирует SEQ ID NO: 11, 12, 21, 22, 31, 32, 41, 464, 42, 51, 52, 61, 62, 71, 72, 81, 82, 91, 92, 101, 102, 111, 112, 121, 122, 131, 132, 141, 142, 151, 152, 161, 162, 171, 172, 181, 182, 191, 192, 201 или 202, и на по меньшей мере около 80, 85 или 90% идентичные SEQ ID NO: 213, 214, 223, 224, 233, 234, 243, 470, 244, 253, 254, 263, 264, 273, 274, 283, 284, 293, 294, 303, 304, 313, 314, 323, 324, 333, 334, 343, 344, 353, 354, 363, 364, 373, 374, 383, 384, 393, 394, 403 или 404 соответственно.

В данном изобретении также представлены полинуклеотиды, содержащие нуклеотидную последовательность, которая кодирует SEQ ID NO: 11, 12, 21, 22, 31, 32, 41, 464, 42, 51, 52, 61, 62, 71, 72, 81, 82, 91, 92, 101, 102, 111, 112, 121, 122, 131, 132, 141, 142, 151, 152, 161, 162, 171, 172, 181, 182, 191, 192, 201 или 202, и на по меньшей мере около 95 % идентичные SEQ ID NO: 213, 214, 223, 224, 233, 234, 243, 470, 244, 253, 254, 263, 264, 273, 274, 283, 284, 293, 294, 303, 304, 313, 314, 323, 324, 333, 334, 343, 344, 353, 354, 363, 364, 373, 374, 383, 384, 393, 394, 403 или 404 соответственно.

В данном изобретении также представлены полинуклеотиды, содержащие нуклеотидную последовательность, которая кодирует SEQ ID NO: 11, 12, 21, 22, 31, 32, 41, 464, 42, 51, 52, 61, 62, 71, 72, 81, 82, 91, 92, 101, 102, 111, 112, 121, 122, 131, 132, 141, 142, 151, 152, 161, 162, 171, 172, 181, 182, 191, 192, 201 или 202, и на по меньшей мере около 96 % идентичные SEQ ID NO: 213, 214, 223, 224, 233, 234, 243, 470, 244, 253, 254, 263, 264, 273, 274, 283, 284, 293, 294, 303, 304, 313, 314, 323, 324, 333, 334, 343, 344, 353, 354, 363, 364, 373, 374, 383, 384, 393, 394, 403 или 404 соответственно.

В данном изобретении также представлены полинуклеотиды, содержащие нуклеотидную последовательность, которая кодирует SEQ ID NO: 11, 12, 21, 22, 31, 32, 41, 464, 42, 51, 52, 61, 62, 71, 72, 81, 82, 91, 92, 101, 102, 111, 112, 121, 122, 131, 132, 141, 142, 151, 152, 161, 162, 171, 172, 181, 182, 191, 192, 201 или 202, и на по меньшей мере около 97 % идентичные SEQ ID NO: 213, 214, 223, 224, 233, 234, 243, 470, 244, 253, 254, 263, 264, 273, 274, 283, 284, 293, 294, 303, 304, 313, 314, 323, 324, 333, 334, 343, 344, 353, 354, 363, 364, 373, 374, 383, 384, 393, 394, 403 или 404 соответственно.

В данном изобретении также представлены полинуклеотиды, содержащие нуклеотидную последовательность, которая кодирует SEQ ID NO: 11, 12, 21, 22, 31, 32, 41, 464, 42, 51, 52, 61, 62, 71, 72, 81, 82, 91, 92, 101, 102, 111, 112, 121, 122, 131, 132, 141, 142, 151, 152, 161, 162, 171, 172, 181, 182, 191, 192, 201 или 202, и на по меньшей мере около 98 % идентичные SEQ ID NO: 213, 214, 223, 224, 233, 234, 243, 470, 244, 253, 254, 263, 264, 273, 274, 283, 284, 293, 294, 303, 304, 313, 314, 323, 324, 333, 334, 343, 344, 353, 354, 363, 364, 373, 374, 383, 384, 393, 394, 403 или 404 соответственно.

В данном изобретении также представлены полинуклеотиды, содержащие нуклеотидную последовательность, которая кодирует SEQ ID NO: 11, 12, 21, 22, 31, 32, 41, 464, 42, 51, 52, 61, 62, 71, 72, 81, 82, 91, 92, 101, 102, 111, 112, 121, 122, 131, 132, 141, 142, 151, 152, 161, 162, 171, 172, 181, 182, 191, 192, 201 или 202, и на по меньшей мере около 99 % идентичные SEQ ID NO: 213, 214, 223, 224, 233, 234, 243, 470, 244, 253, 254, 263, 264, 273, 274, 283, 284, 293, 294, 303, 304, 313, 314, 323, 324, 333, 334, 343, 344, 353, 354, 363, 364, 373, 374, 383, 384, 393, 394, 403 или 404 соответственно.

В определенных аспектах в данном изобретении представлены полинуклеотиды, содержащие нуклеотидную последовательность, кодирующую легкую или тяжелую цепь антитела или антигенсвязывающий фрагмент, описанный в данном изобретении. Полинуклеотиды могут содержать нуклеотидные последовательности, кодирующие тяжелую цепь, содержащую FR и CDR VH антител, описанных в данном (см., например, табл. 1 и 5). Полинуклеотиды могут содержать нуклеотидные последовательности, кодирующие легкую цепь, содержащую FR и CDR VL антител, описанных в данном (см., например, табл. 2 и 6).

В конкретных вариантах осуществления данного изобретения, полинуклеотид, описанный в данном изобретении, кодирует домен VH, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 464. В конкретных вариантах осуществления данного изобретения, полинуклеотид, описанный в данном изобретении, кодирует домен VL, содержащий аминокислотную последовательность,

комбинацию нуклеотидных последовательностей, кодирующих антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые иммуноспецифически связываются с В7-Н4 (например, В7-Н4 человека), при этом антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат легкую цепь, при этом легкая цепь содержит переменный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в табл. 4 (например, SEQ ID NO: 42 или 72), и константный участок, содержащий аминокислотную последовательность константного участка легкой цепи лямбда человека.

В конкретном варианте осуществления данного изобретения полинуклеотид или комбинация полинуклеотидов, представленных в данном изобретении, содержит нуклеотидную последовательность или комбинацию нуклеотидных последовательностей, кодирующих антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые иммуноспецифически связываются с В7-Н4 (например, В7-Н4 человека), при этом антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат

(i) тяжелую цепь, при этом тяжелая цепь содержит переменный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в табл. 3 (например, SEQ ID NO: 464, 41 или 71), и константный участок, содержащий аминокислотную последовательность константного участка тяжелой цепи гамма (γ) человека; и

(ii) легкую цепь, при этом легкая цепь содержит переменный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в табл. 4 (например, SEQ ID NO: 42 или 72), и константный участок, содержащий аминокислотную последовательность константного участка легкой цепи лямбда человека.

В одном варианте осуществления данного изобретения комбинация полинуклеотидов, представленная в данном изобретении, содержит полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность из SEQ ID NO: 470, и полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность из SEQ ID NO: 244.

В одном варианте осуществления данного изобретения комбинация полинуклеотидов, представленная в данном изобретении, содержит полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность из SEQ ID NO: 243, и полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность из SEQ ID NO: 244. В одном варианте осуществления данного изобретения комбинация полинуклеотидов, представленная в данном изобретении, содержит полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность из SEQ ID NO: 273, и полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность из SEQ ID NO: 274.

В конкретном варианте осуществления данного изобретения представлены полинуклеотиды, содержащие нуклеотидную последовательность, кодирующую анти-В7-Н4 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, или его домен, обозначенные в данном изобретении; см., например, табл. 1-8. В данном изобретении также представлены полинуклеотиды, кодирующие анти-В7-Н4 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в данном изобретении, или его домен, которые оптимизируются, например, путем оптимизации кодона/РНК, замены гетерологичными сигнальными последовательностями и удаления элементов нестабильности мРНК. Способы получения оптимизированных нуклеиновых кислот, кодирующих анти-В7-Н4 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент или его домен (например, тяжелую цепь, легкую цепь, домен VH или домен VL) для рекомбинантной экспрессии путем введения изменений кодонов (например, изменение кодона, которое кодирует ту же аминокислоту из-за вырожденности генетического кода) и/или устранения ингибирующих участков в мРНК, могут быть выполнены путем адаптации способов оптимизации, описанных, например, в пат. США № 5965726; 6174666; 6291664; 6414132; и 6794498 соответственно.

Полинуклеотид, кодирующий антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в данном изобретении, или его домен, могут быть получены из нуклеиновой кислоты из подходящего источника (например, гибридомы) с использованием способов, хорошо известных в данной области техники (например, ПЦР и другие способы молекулярного клонирования). Например, амплификация ПЦР с использованием синтетических праймеров, гибридизующихся с 3' и 5' концами известной последовательности, может быть выполнена с использованием геномной ДНК, полученной из клеток гибридомы, продуцирующих антитело, представляющее интерес. Такие способы ПНР-амплификации можно использовать для получения нуклеиновых кислот, содержащих последовательность, кодирующую легкую цепь и/или тяжелую цепь антитела или его антигенсвязывающего фрагмента. Такие способы амплификации ПЦР можно использовать для получения нуклеиновых кислот, содержащих последовательность, кодирующую переменный участок легкой цепи и/или переменный участок тяжелой цепи антитела или его антигенсвязывающего фрагмента. Амплифицированные нуклеиновые кислоты могут быть клонированы в векторы для экспрессии в клетках-хозяевах и для дальнейшего клонирования, например, для генерирования химерных и гуманизированных антител или их антигенсвязывающих фрагментов.

Полинуклеотиды, представленные в данном изобретении, могут быть, например, в форме РНК или в форме ДНК. ДНК включает кДНК, геномную ДНК и синтетическую ДНК, и ДНК может быть двухцепочечной или одноцепочечной. Если одноцепочечная, ДНК может быть кодирующей или не кодирующей (антисмысловой) цепью. В определенных вариантах осуществления данного изобретения полинуклеотид представляет собой кДНК или ДНК, лишенные еще одного эндогенного интрона. В определенных вариантах осуществления данного изобретения полинуклеотид представляет собой не встречающийся в природе полинуклеотид. В определенных вариантах осуществления данного изобретения полинуклеотид

продуцируется рекомбинантно. В определенных вариантах осуществления данного изобретения полинуклеотиды являются выделенными. В определенных вариантах осуществления данного изобретения полинуклеотиды являются по существу чистыми. В определенных вариантах осуществления данного изобретения полинуклеотид очищают от природных компонентов.

1.2.2. Клетки и векторы.

В определенных аспектах в данном изобретении представлены векторы (например, векторы экспрессии), содержащие полинуклеотиды, содержащие нуклеотидные последовательности, кодирующие анти-В7-Н4 антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, или их домен для рекомбинантной экспрессии в клетках-хозяевах, предпочтительно в клетках млекопитающих. В данном изобретении также представлены клетки, например, клетки-хозяева, содержащие такие векторы для рекомбинантной экспрессии анти-В7-Н4 антител или их антигенсвязывающих фрагментов, описанных в данном изобретении (например, человеческие или гуманизированные антитела или их антигенсвязывающие фрагменты). В конкретном аспекте в данном изобретении представлены способы получения антитела или его антигенсвязывающих фрагментов, описанных в данном изобретении, включающие экспрессию такого антитела или его антигенсвязывающего фрагмента в клетке-хозяине.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения рекомбинантная экспрессия антитела или его антигенсвязывающего фрагмента или его домена, описанные в данном изобретении (например, тяжелой или легкой цепи, описанной в данном изобретении), которые специфически связываются с В7-Н4 (например, В7-Н4 человека), включает конструирование вектора экспрессии, содержащего полинуклеотид, который кодирует антитело или его антигенсвязывающий фрагмент или его домен. Как только полинуклеотид, кодирующий антитело или его антигенсвязывающий фрагмент или его домен (например, переменный домен тяжелой или легкой цепи), описанные в данном изобретении, получены, вектор для получения антитела или его антигенсвязывающего фрагмента могут быть получены рекомбинантной ДНК технологией с использованием методов, хорошо известных в данной области техники. Таким образом, способы получения белка путем экспрессии полинуклеотида, содержащего антитело или его антигенсвязывающий фрагмент или его домен (например, легкую цепь или тяжелую цепь), кодирующей нуклеотидную последовательность, описаны в данном изобретении. Способы, которые хорошо известны специалистам в данной области техники, могут быть использованы для конструирования векторов экспрессии, содержащих антитела или их антигенсвязывающий фрагмент или их кодирующие последовательности (например, легкую цепь или тяжелую цепь) и соответствующие сигналы контроля транскрипции и трансляции. Эти способы включают, например, методы рекомбинантной ДНК *in vitro*, методы синтеза и генетическую рекомбинацию *in vivo*. Также предоставлены реплицируемые векторы, содержащие нуклеотидную последовательность, кодирующую антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в данном изобретении, тяжелую или легкую цепь, переменный домен тяжелой или легкой цепи или CDR тяжелой или легкой цепи, функционально связанные с промотором. Такие векторы могут, например, включать нуклеотидную последовательность, кодирующую константный участок антитела или его антигенсвязывающий фрагмент (см., например, международные публикации № WO 86/05807 и WO 89/01036; и пат. США № 5122464) и переменные 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 легкой цепи. Вектор экспрессии может быть перенесен в клетку (например, клетку-хозяина) обычными методами, и полученные клетки могут быть затем культивированы традиционными методами для получения антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, описанного в данном изобретении (например, антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, содержащего шесть CDR, VH, VL, VH и VL, тяжелую цепь, легкую цепь или тяжелую и легкую цепь 20502, 20502.1 или 22213) или их домен (например, VH, VL, VH и VL, тяжелая цепь или легкая цепь 20502, 20502.1 или 22213). Таким образом, в данном изобретении представлены клетки-хозяева, содержащие полинуклеотид, кодирующий антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в данном изобретении (например, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие шесть CDR, VH, VL, VH и VL, тяжелая цепь, легкая цепь или тяжелая и легкая цепь 20502, 20502.1 или 22213) или их домен (например, VH, VL, VH и VL, тяжелая цепь или легкая цепь 20502, 20502.1 или 22213), функционально связанные с промотором для экспрессии таких последовательностей в клетке-хозяине. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения для экспрессии антител с двойной цепью или их антигенсвязывающих фрагментов векторы, кодирующие как тяжелую, так и легкую цепи, по отдельности, можно совместно экспрессировать в клетке-хозяине для экспрессии всего иммуноглобулина, как подробно описано ниже. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения клетка-хозяин содержит вектор, содержащий полинуклеотид, кодирующий как тяжелую цепь, так и легкую цепь антитела, описанного в данном изобретении (например, тяжелую и легкую цепь 20502, 20502.1 или 22213), или его домен (например, VH и VL 20502, 20502.1 или 22213). В конкретных вариантах осуществления данного изобретения, клетка-хозяин содержит два разных вектора, первый вектор, содержащий полинуклеотид, кодирующий тяжелую цепь или переменный участок тяжелой цепи антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, описанные в данном изобретении, и второй вектор, содержащий полинуклеотид, кодирующий легкую цепь или переменный участок легкой цепи антитела описанного в данном изобретении (например, антитело,

содержащее шесть CDR 20502, 20502.1 или 22213) или его домен. В других вариантах осуществления данного изобретения, первая клетка-хозяин содержит первый вектор, содержащий полинуклеотид, кодирующий тяжелую цепь или вариабельный участок тяжелой цепи антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, описанных в данном изобретении, и вторая клетка-хозяин содержит второй вектор, содержащий полинуклеотид, кодирующий легкую цепь или вариабельный участок легкой цепи антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, описанного в данном изобретении (например, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие шесть CDR 20502, 20502.1 или 22213). В конкретных вариантах осуществления данного изобретения, тяжелая цепь/вариабельный участок тяжелой цепи экспрессируется первой клеткой, ассоциированной с легкой цепью/вариабельным участком легкой цепи второй клетки, с образованием анти-В7-Н4 антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, описанных в данном изобретении (например, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие шесть CDR 20502, 20502.1 или 22213). В определенных вариантах осуществления данного изобретения представлена популяция клеток-хозяев, включающая такую первую клетку-хозяин и такую вторую клетку-хозяин. В конкретном варианте осуществления данного изобретения представлена популяция векторов, содержащая первый вектор, содержащий полинуклеотид, кодирующий легкую цепь/вариабельный участок легкой цепи анти-В7-Н4 антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, описанных в данном изобретении, и второй вектор, содержащий полинуклеотид, кодирующий тяжелую цепь/вариабельный участок тяжелой цепи анти-В7-Н4 антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, описанных в данном изобретении (например, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие CDR 20502, 20502.1 или 22213). Альтернативно можно использовать один вектор, который кодирует и способен экспрессировать полипептиды как тяжелой, так и легкой цепи.

Для экспрессии антител и их антигенсвязывающих фрагментов, описанных в данном изобретении, можно использовать множество систем векторов экспрессии хозяина (например, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащий CDR 20502, 20502.1 или 22213) (см., например, пат. США № 5807715). Такие системы экспрессии хозяина представляют собой носители, с помощью которых представляющие интерес кодирующие последовательности могут быть получены и впоследствии очищены, но также представляют собой клетки, которые при трансформации или трансфекции соответствующими нуклеотидными кодирующими последовательностями могут экспрессировать антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанный в данном изобретении *in situ*. Они включают, но не ограничиваются ими, микроорганизмы, такие как бактерии (например, *E. coli* и *B. subtilis*), трансформированные рекомбинантными векторами бактериофаговой ДНК, плазмидной ДНК или космидной ДНК, содержащими кодирующие последовательности антител; дрожжи (например, *Saccharomyces Pichia*), трансформированные рекомбинантными дрожжевыми экспрессирующими векторами, содержащими последовательности, кодирующие антитела; системы клеток насекомых, инфицированные векторами экспрессии рекомбинантного вируса (например, бакуловируса), содержащие кодирующие последовательности антител; системы растительных клеток (например, зеленые водоросли, такие как *Chlamydomonas reinhardtii*), инфицированные векторами экспрессии рекомбинантного вируса (например, вирусом мозаики цветной капусты, CaMV; вирусом мозаики табака, TMV) или трансформированные векторами экспрессии рекомбинантной плазмиды (например, плазмиды Ti), содержащие последовательности, кодирующие антитела; или клеточные системы млекопитающих (например, COS (например, COS1 или COS), CHO, ВНК, MDCK, HEK 293, NS0, PER.C6, VERO, CRL7030, HsS78Bst, HeLa и NIH 3T3, HEK-293T, HepG2, SP210 Клетки R1.1, BW, LM, BSC1, BSC40, YB/20 и BMT10), несущие рекомбинантные экспрессирующие конструкции, содержащие промоторы, полученные из генома клеток млекопитающих (например, промотор металлотионеина) или вирусы млекопитающих (например, поздний промотор аденовируса; промотор вируса коровьей оспы 7.5K). В конкретном варианте осуществления данного изобретения клетки для экспрессии антител и их антигенсвязывающих фрагментов, описанных в данном изобретении (например, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащий CDR 20502, 20502.1 или 22213), представляют собой клетки CHO, например, клетки CHO из CHO GS System™ (Lonza). В конкретном варианте осуществления данного изобретения клетки для экспрессии антител, описанные в данном изобретении, представляют собой клетки человека, например, линии клеток человека. В конкретном варианте осуществления данного изобретения вектор экспрессии млекопитающего представляет собой rOptiVEC™ или pCDNA3.3. В конкретном варианте осуществления данного изобретения бактериальные клетки, такие как *Escherichia coli*, или эукариотические клетки (например, клетки млекопитающих), особенно для экспрессии молекулы всего рекомбинантного антитела, используют для экспрессии молекулы рекомбинантного антитела. Например, клетки млекопитающих, такие как клетки яичника китайского хомячка (CHO) в сочетании с вектором, таким как основной промежуточный ранний промоторный элемент гена из цитомегаловируса человека, являются эффективной системой экспрессии для антител (Foecking M.K. & Hofstetter H. (1986), *Gene*, 45:101-105; Cockett M.I. et al. (1990), *Biotechnology*, 8:662-667). В определенных вариантах осуществления данного изобретения антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, описанные в данном изобретении, продуцируются клетками CHO или клетками NS0.

Кроме того, может быть выбран штамм клетки-хозяина, который модулирует экспрессию вставлен-

ных последовательностей, или модифицирует и процессирует генный продукт определенным желаемым образом. Такие модификации (например, гликозилирование) и процессинг (например, расщепление) белковых продуктов могут вносить вклад в функцию белка. С этой целью можно использовать эукариотические клетки-хозяева, которые обладают клеточным механизмом для правильной обработки первичного транскрипта, гликозилирования и фосфорилирования генного продукта. Такие клетки-хозяева млекопитающих включают, но не ограничиваются ими, CHO, VERO, BHK, Hela, MDCK, HEK 293, NIH 3T3, W138, BT483, Hs578T, HTB2, BT20 и T47D, NS0 (клеточная линия мышины миеомы, которая не эндогенно продуцирует любые цепи иммуноглобулина), CRL7030, COS (например, COS1 или COS), PER.C6, VERO, HsS78Bst, HEK-293T, HepG2, SP210, R1.1, B-W, L-M, BSC1, BSC40, YB/20, BMT10 и HsS78Bst клетки. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения анти-B7-H4 антитела, описанные в данном изобретении (например, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие CDR 20502, 20502.1 или 22213), продуцируются в клетках млекопитающих, таких как клетки CHO. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения анти-B7-H4 антитела, описанные в данном изобретении (например, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие CDR 20502, 20502.1 или 22213), продуцируются в клетках Potelligent® CHOK1SV.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предоставлены клетки-хозяева, которые содержат нуклеиновую кислоту, кодирующую антитело B7-H4 или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в данном изобретении, при этом клетка-хозяин лишена функционального гена альфа-1,6-фукозилтрансферазы (FUT8). В некоторых вариантах осуществления данного изобретения клетка-хозяин представляет собой клетку CHO.

Как только антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в данном изобретении, получены рекомбинантной экспрессией, их можно очистить любым способом, известным в данной области техники, для очистки молекулы иммуноглобулина, например, хроматографией (например, ионный обмен, аффинность, особенно по аффинности к специфическому антигену после белка А и калибровочной хроматографии), центрифугированию, дифференциальной растворимости или по любой другой стандартной методике очистки белков. Кроме того, антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, описанные в данном изобретении, могут быть слиты с гетерологичными полипептидными последовательностями, описанными в данном изобретении, или иным образом известными в данной области техники для облегчения очистки.

В конкретных вариантах осуществления данного изобретения, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в данном изобретении, выделяют или очищают. Обычно выделенное 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 данного изобретения препарат антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, описанные в данном изобретении, по существу не содержат клеточного материала и/или химических предшественников.

1.3. Фармацевтические композиции.

В данном изобретении представлены композиции, содержащие антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в данном изобретении, имеющие желаемую степень чистоты в физиологически приемлемом носителе, наполнителе или стабилизаторе (Remington's Pharmaceutical Sciences (1990) Mack Publishing Co., Истон, Пенсильвания). Приемлемые носители, наполнители или стабилизаторы являются нетоксичными для реципиентов в используемых дозировках и концентрациях.

В различных вариантах осуществления данного изобретения, композиции, содержащие анти-B7-H4 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, предоставляются в композициях с фармацевтически приемлемым носителем (см., например, Gennaro, Remington: The Science and Practice of Pharmacy with Facts and Comparisons: Drugfacts Plus, 20th ed. (2003); Ansel et al., Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, 7th ed., Lippencott Williams and Wilkins (2004); Kibbe et al., Handbook of Pharmaceutical Excipients, 3rd ed., Pharmaceutical Press (2000)).

Описанные в данном изобретении фармацевтические композиции могут быть полезны для блокирования ингибирующей активности B7-H4 против Т-клеток и/или для АЗКЦ-зависимого деплетирования B7-H4 экспрессирующих клеток. Фармацевтические композиции, описанные в данном изобретении, могут быть полезны при лечении состояния, такого как рак. Примеры рака, который можно лечить в соответствии со способами, описанными в данном изобретении, включают, но не ограничиваются ими, рак молочной железы (например, тройной негативный рак молочной железы, рак протоков), рак эндометрия, рак яичников и немелкоклеточный рак легких (например, плоскоклеточный рак), рак поджелудочной железы, рак щитовидной железы, рак почки (например, почечно-клеточный рак) и рак мочевого пузыря (например, рак уротелиальной клетки). Немелкоклеточный рак легкого может быть, например, аденокарциномой. Дополнительные примеры рака, которые можно лечить в соответствии со способами, описанными в данном изобретении, включают, но не ограничиваются ими, рак головы и шеи, мелкоклеточный рак легкого, рак желудка, меланому и холангиокарциному. В одном варианте осуществления данного изобретения рак яичника представляет собой серозную аденокарциному. В одном варианте осуществле-

ния данного изобретения рак молочной железы представляет собой аденокарциному протоков.

Фармацевтические композиции, описанные в данном изобретении, находятся в одном варианте осуществления данного изобретения для применения в качестве лекарственного средства. Фармацевтические композиции, описанные в данном изобретении, в одном варианте осуществления данного изобретения предназначены для использования в качестве диагностики, например, для обнаружения присутствия В7-Н4 в образце, полученном от пациента (например, пациента-человека).

Композиции, используемые для введения *in vivo*, могут быть стерильными. Это легко достигается путем фильтрации через, например, стерильные фильтрующие мембраны. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагаются фармацевтические композиции, в которых фармацевтическая композиция содержит анти-В7-Н4 антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, описанные в данном изобретении, и фармацевтически приемлемый носитель. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагаются фармацевтические композиции, в которых фармацевтическая композиция содержит афукозилированные анти-В7-Н4 антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, описанные в данном изобретении, и фармацевтически приемлемый носитель. В конкретных вариантах осуществления данного изобретения, такая фармацевтическая композиция содержит афукозилированные анти-В7-Н4 антитела или антигенсвязывающие фрагменты, например, при этом по меньшей мере 80% антител в композиции являются афукозилированными. В конкретных вариантах осуществления данного изобретения, такая фармацевтическая композиция содержит афукозилированные анти-В7-Н4 антитела или антигенсвязывающие фрагменты, например, при этом по меньшей мере 85% антител в композиции являются афукозилированными. В конкретных вариантах осуществления данного изобретения, такая фармацевтическая композиция содержит афукозилированные анти-В7-Н4 антитела или антигенсвязывающие фрагменты, например, при этом по меньшей мере 90% антител в композиции являются афукозилированными. В конкретных вариантах осуществления данного изобретения, такая фармацевтическая композиция содержит афукозилированные анти-В7-Н4 антитела или антигенсвязывающие фрагменты, например, при этом по меньшей мере 95% антител в композиции являются афукозилированными. В конкретных вариантах осуществления данного изобретения, такая фармацевтическая композиция содержит афукозилированные анти-В7-Н4 антитела или антигенсвязывающие фрагменты, например, при этом по меньшей мере 96% антител в композиции являются афукозилированными. В конкретных вариантах осуществления данного изобретения, такая фармацевтическая композиция содержит афукозилированные анти-В7-Н4 антитела или антигенсвязывающие фрагменты, например, при этом по меньшей мере 97% антител в композиции являются афукозилированными. В конкретных вариантах осуществления данного изобретения, такая фармацевтическая композиция содержит афукозилированные анти-В7-Н4 антитела или антигенсвязывающие фрагменты, например, при этом по меньшей мере 98% антител в композиции являются афукозилированными. В конкретных вариантах осуществления данного изобретения, такая фармацевтическая композиция содержит афукозилированные анти-В7-Н4 антитела или антигенсвязывающие фрагменты, например, при этом по меньшей мере 99% антител в композиции являются афукозилированными. В конкретных вариантах осуществления данного изобретения, такая фармацевтическая композиция содержит афукозилированные анти-В7-Н4 антитела или антигенсвязывающие фрагменты, в которых фукоза не обнаруживается в композиции.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения фармацевтическая композиция содержит

(i) выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который специфически связывается с В7-Н4 человека, содержащим

(a) определяющий комплементарность участок (CDR) 1 переменного участка тяжелой цепи (VH), CDR2 VH, CDR3 VH и последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка легкой цепи (VL) SEQ ID NO: 458-463 соответственно,

(b) переменный участок тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 464, и переменный участок легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 42, или

(c) тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 469, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 44; и

(ii) фармацевтически приемлемый наполнитель.

В данном изобретении также предложена фармацевтическая композиция, содержащая

(i) антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связываются с В7-Н4 человека и содержат последовательности определяющего комплементарность участка (CDR) 1 переменного участка тяжелой цепи (VH), CDR2 VH, CDR3 VH и CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка легкой цепи (VL) из SEQ ID NO: 458-463 соответственно; и

(ii) фармацевтически приемлемый наполнитель, при этом по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% антител или их антигенсвязывающих фрагментов в композиции являются афукозилированными.

В одном варианте осуществления изобретения

(i) антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит переменный участок тяжелой цепи,

содержащий аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 464, и варибельный участок легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 42; или

(ii) антитело содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 469, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 44.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения фармацевтическая композиция содержит

(i) выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который специфически связывается с B7-H4 человека, содержащим

(a) определяющий комплементарность участок (CDR) 1 варибельного участка тяжелой цепи (VH), CDR2 VH, CDR3 VH и последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 варибельного участка легкой цепи (VL) SEQ ID NO: 35-40 соответственно,

(b) варибельный участок тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 41, и варибельный участок легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 42, или

(c) тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 43, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 44; и

(ii) фармацевтически приемлемый наполнитель.

В данном изобретении также предложена фармацевтическая композиция, содержащая

(i) антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связываются с B7-H4 человека и содержат последовательности определяющего комплементарность участка (CDR) 1 варибельного участка тяжелой цепи (VH), CDR2 VH, CDR3 VH и CDR1, CDR2 и CDR3 варибельного участка легкой цепи (VL) из SEQ ID NO: 35-40 соответственно; и

(ii) фармацевтически приемлемый наполнитель, при этом по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% антител или их антигенсвязывающих фрагментов в композиции являются афукозилированными.

В одном варианте осуществления изобретения

(i) антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат варибельный участок тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 41, и варибельный участок легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 42; или

(ii) антитело содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 43, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 44.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения фармацевтическая композиция содержит

(i) выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который специфически связывается с B7-H4 человека, содержащим

(a) определяющий комплементарность участок (CDR) 1 варибельного участка тяжелой цепи (VH), CDR2 VH, CDR3 VH и последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 варибельного участка легкой цепи (VL) SEQ ID NO: 65-70 соответственно,

(b) варибельный участок тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 71, и варибельный участок легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 72, или

(c) тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 73, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 74; и

(ii) фармацевтически приемлемый наполнитель.

В данном изобретении также предложена фармацевтическая композиция, содержащая

(i) антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связываются с B7-H4 человека и содержат последовательности определяющего комплементарность участка (CDR) 1 варибельного участка тяжелой цепи (VH), CDR2 VH, CDR3 VH и CDR1, CDR2 и CDR3 варибельного участка легкой цепи (VL) из SEQ ID NO: 65-70 соответственно; и

(ii) фармацевтически приемлемый наполнитель, при этом по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% антител или их антигенсвязывающих фрагментов в композиции являются афукозилированными.

В одном варианте осуществления изобретения

(i) антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат варибельный участок тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 71, и варибельный участок легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 72; или

(ii) антитело содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 73, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 74.

1.4. Применения и способы.

1.4.1. Терапевтические применения и способы.

В одном аспекте в данном изобретении представлены способы модуляции одной или более иммунных функций у субъекта, включающие введение субъекту, нуждающемуся в этом, анти-B7-H4 антитела

или его антигенсвязывающего фрагмента, описанных в данном изобретении, или его фармацевтической композиции, как описано выше и в данном изобретении.

В другом варианте осуществления данного изобретения, анти-B7-H4 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент или фармацевтическую композицию вводят пациенту (например, пациенту-человеку) для увеличения пролиферации Т-клеток, CD4+ Т-клеток или CD8+ Т-клеток у пациента. В другом варианте осуществления данного изобретения, анти-B7-H4 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент или фармацевтическую композицию вводят пациенту (например, пациенту-человеку) для увеличения продукции интерферона-гамма (ИФН γ) у пациента. В другом варианте осуществления данного изобретения, анти-B7-H4 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент или фармацевтическую композицию вводят пациенту (например, пациенту-человеку), чтобы блокировать ингибирующую активность B7-H4 против Т-клеток у пациента. В другом варианте осуществления данного изобретения, анти-B7-H4 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент или фармацевтическую композицию вводят пациенту (например, пациенту-человеку) для деплетирования экспрессирующих B7-H4 раковых клеток у пациента. В другом варианте осуществления данного изобретения, анти-B7-H4 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент или фармацевтическую композицию вводят для достижения двух или более из указанных выше эффектов. В определенном варианте осуществления данного изобретения предлагаются способы лечения рака, например, рака, экспрессирующего B7-H4. Способ лечения рака может включать в себя введение анти-B7-H4 антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, представленного в данном изобретении, или фармацевтической композиции, содержащей анти-B7-H4 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, предоставленные в данном изобретении, пациенту (например, пациенту-человеку), нуждающемуся в этом.

В определенном варианте осуществления данного изобретения предлагаются способы лечения рака, выбранного из группы, состоящей из: рака молочной железы (например, тройного негативного рака молочной железы, рака протоков), рака эндометрия, рака яичников, немелкоклеточного рака легких (например, плоскоклеточного рака), рака поджелудочной железы, рака щитовидной железы, рака почки (например, почечно-клеточного рака) и рака мочевого пузыря (например, рака уротелиальной клетки). В определенном варианте осуществления данного изобретения предлагаются способы лечения немелкоклеточного рака легкого, который представляет собой аденокарциному. В определенном варианте осуществления данного изобретения предлагаются способы лечения рака, выбранного из группы, состоящей из: рака головы и шеи, мелкоклеточного рака легкого, рака желудка, меланомы и холянгиокарциномы. В одном варианте осуществления данного изобретения рак яичника представляет собой серозную аденокарциному. В одном варианте осуществления данного изобретения рак молочной железы представляет собой протоковую аденокарциному. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения такие способы включают введение анти-B7-H4 антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, представленного в данном изобретении, или фармацевтической композиции, содержащей анти-B7-H4 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, предоставленные в данном изобретении, пациенту (например, пациенту-человеку), нуждающемуся в этом. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения рак представляет собой рак, экспрессирующий B7-H4.

В определенном варианте осуществления данного изобретения, в данном изобретении представлен способ лечения рака, который является неадекватным респондером ингибитора PD-1/PD-L1. Рак, который является неадекватным респондером ингибитора PD-1/PD-L1, мог ранее реагировать на ингибитор PD-1/PD-L1, но мог стать менее чувствительным к ингибитору PD-1/PD-L1, или рак, возможно, никогда не отвечал на ингибитор PD-1/PD-L1. Неадекватный ответ на ингибитор PD-1/PD-L1 означает, что аспекты рака, которые, как ожидается, должны улучшиться после стандартной дозы ингибитора PD-1/PD-L1, не улучшаются, и/или улучшение происходит только в том случае, при дозе выше чем стандартная доза. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения субъект больной раком, который является неадекватным респондером на ингибитор PD-1/PD-L1, испытывал или испытывает неадекватный ответ на ингибитор PD-1/PD-L1 после получения стандартной дозы в течение по меньшей мере двух недель, по меньшей мере трех недель, по меньшей мере четырех недель, по меньшей мере шести недель или по меньшей мере двенадцати недель. "Стандартная" доза определяется медицинским работником и может зависеть от возраста, веса, анамнеза, тяжести заболевания, частоты введения и т.д. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения у субъекта больного раком, который представляет собой неадекватный респондер на ингибитор PD-1/PD-L1 испытывал или испытывает неадекватный ответ на анти-PD-1 антитело и/или анти-PD-L1 антитело. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения субъект больной раком, который является неадекватным респондером на ингибитор PD-1/PD-L1, испытывал или испытывает неадекватный ответ на AMP-224. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения субъект больной раком, который является неадекватным респондером на ингибитор PD-1/PD-L1, испытывал или испытывает неадекватный ответ на ингибитор PD-1/PD-L1, выбранный из ниво-лумаба, пембролизумаба и атезолизумаба.

В определенном варианте осуществления данного изобретения предлагается способ лечения рака, который экспрессирует низкий уровень PD-L1. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения рак, который экспрессирует "низкий уровень PD-L1" или экспрессирует "PD-L1 на низком уровне",

обозначает, что уровень PD-L1 находится ниже уровня экспрессии для рака, который указан для лечения антагонистом PD-1 или PD-L1, в котором пациенты отбираются для лечения на основании уровней экспрессии PD-L1. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, "низкий уровень PD-L1" представляет собой уровень, при котором менее 1% клеток в опухоли имеют окрашивание мембраны. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения "низкий уровень" в отношении PD-L1 составляет менее 1% окрашивания, например, 0,9, 0,8, 0,7, 0,6, 0,5, 0,4, 0,3, 0,2, 0,1 или 0% клеток опухоли окрашены. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения уровни экспрессии PD-L1 могут быть измерены с помощью хромогенной ИГХ или иммунофлуоресцентной ИГХ (Aqua scoring). В некоторых вариантах осуществления данного изобретения окрашивание PD-L1 на 5% или менее (включая опухоль и/или иммунные клетки) может указывать на то, что образец экспрессирует "низкий уровень PD-L1". В некоторых вариантах осуществления данного изобретения окрашивание PD-L1 на 10% или менее (включая опухоль и/или иммунные клетки) может указывать на то, что образец экспрессирует "низкий уровень PD-L1". Если здесь не указано иное, в данном изобретении используется 5%-ный порог (т.е. 5% или менее означает "низкий уровень PD-L1"). В другом варианте осуществления данного изобретения, анти-B7-H4 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент или фармацевтическую композицию вводят пациенту (например, пациенту-человеку), у которого диагностирован рак, чтобы увеличить пролиферацию Т-клеток, CD4+ Т-клеток или CD8+ Т-клеток у пациента. В другом варианте осуществления данного изобретения, анти-B7-H4 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент или фармацевтическую композицию вводят пациенту (например, пациенту-человеку), у которого диагностирован рак, для увеличения продукции интерферона-гамма (ИФН γ) у пациента. В другом варианте осуществления данного изобретения, анти-B7-H4 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент или фармацевтическую композицию вводят пациенту (например, пациенту-человеку), у которого диагностирован рак, чтобы блокировать ингибирующую активность B7-H4 против Т-клеток у пациента. В другом варианте осуществления данного изобретения, анти-B7-H4 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент или фармацевтическую композицию вводят пациенту (например, пациенту-человеку), у которого диагностирован рак, чтобы деплетировать B7-H4 экспрессирующие раковые клетки у пациента.

В других вариантах осуществления данного изобретения, анти-B7-H4 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент или фармацевтическую композицию вводят пациенту, как указано выше, и дополнительно в комбинации с дополнительным терапевтическим агентом, например химиотерапевтическим агентом или иммуностимулирующим агентом, таким как ингибитор контрольной точки Т-клеток. В иллюстративном варианте осуществления данного изобретения, дополнительный терапевтический агент представляет собой антагонист PD-1, такой как антагонистическое анти-PD-1 антитело. Подходящие анти-PD-1 антитела включают, например, OPDIVO (ниволумаб), KEYTRUDA (пембролизумаб) или MEDI-0680 (AMP-514; WO2012/145493). Подходящие анти-PD-1 антитела также включают, например, камрелизумаб (SHR-1210), тизелизумаб (BGB-A317) или спартализумаб (NPVPDR001, NVS240118, PDR001). Дополнительный терапевтический агент может также включать пидилизумаб (CT-011). Рекombинантный белок, состоящий из внеклеточного домена PD-L2 (B7-DC), слитого с Fc-частью IgG1, называемый AMP-224, также может быть использован для антагонизма рецептора PD-1.

В другом иллюстративном варианте осуществления данного изобретения, дополнительный терапевтический агент представляет собой антагонист PD-L1, такой как антагонистическое антитело к PD-L1. Подходящие антитела к PD-L1 включают, например, TECENTRIQ (атезолизумаб), дурвалумаб (MEDI4736), BMS-936559 (WO 2007/005874), MSB0010718C (WO 2013/79174) или rHigM12B7.

В еще одном иллюстративном варианте осуществления данного изобретения, дополнительный терапевтический агент представляет собой агонист GITR, такой как агонистическое антитело GITR. Подходящие антитела к GITR включают, например, TRX-518 (WO 06/105021, WO 09/009116), МК-4166 (WO 11/028683) или антитело GITR, описанное в WO 2015/031667. В другом варианте осуществления данного изобретения, дополнительный терапевтический агент представляет собой антитело GITR, описанное в WO 2017/015623. В конкретном варианте осуществления данного изобретения антитело GITR выбрано из

- a) антитела, содержащего домен, связывающий GITR (GITR-BD), содержащий CDR1, содержащий последовательность из SEQ ID NO: 411, CDR2, содержащий последовательность из SEQ ID NO: 412, и CDR3, содержащий последовательность из SEQ ID NO: 413;
- b) антитела, содержащего GITR-BD, содержащее последовательность из SEQ ID NO: 414;
- c) четырехвалентной молекулы, содержащей две копии полипептида, имеющего структуру (GITR-BD)-линкер-(GITR-BD)-линкер-шарнир-Fc, где
 - (i) GITR-BD содержит CDR1, содержащий последовательность из SEQ ID NO: 411, CDR2, содержащий последовательность из SEQ ID NO: 412, и CDR3, содержащий последовательность из SEQ ID NO: 413,
 - (ii) линкер представляет собой полипептид,
 - (iii) шарнир представляет собой полипептид, полученный из шарнирного участка иммуноглобулина, и
 - (iv) Fc представляет собой полипептид Fc иммуноглобулина;

d) четырехвалентной молекулы, содержащей две копии полипептида, имеющего структуру (GITR-BD)-линкер-(GITR-BD)-линкер-шарнир-Fc, где

(i) GITR-BD содержит аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 414,

(ii) линкер представляет собой полипептид,

(iii) шарнир представляет собой полипептид, полученный из шарнирного участка иммуноглобулина, и

(iv) Fc представляет собой полипептид Fc иммуноглобулина; и

e) четырехвалентной молекулы, содержащей две копии полипептида, содержащего последовательность из SEQ ID NO: 415.

В любом из приведенных выше вариантов осуществления четырехвалентной молекулы шарнир может содержать последовательность из SEQ ID NO: 416, 417 или 418. В любом из приведенных выше вариантов осуществления четырехвалентной молекулы линкер может содержать аминокислотную последовательность, выбранную из GG, GGG и SEQ ID NO: 419-425. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения шарнир содержит SEQ ID NO: 417, и линкер содержит любую из SEQ ID NO: 419-423.

В еще одном иллюстративном варианте осуществления данного изобретения, дополнительный терапевтический агент представляет собой внеклеточный домен CD80 (ECD CD80), например, SEQ ID NO: 426; или слитую молекулу CD80 ECD, содержащую CD80 ECD и партнера по слиянию, как описано в WO 2017/079117. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения слитая молекула CD80 ECD представляет собой слитый белок CD80 ECD-Fc. В конкретном варианте осуществления данного изобретения слитый белок CD80 ECD-Fc содержит последовательность из SEQ ID NO: 427 или 428. В еще одном примерном варианте осуществления данного изобретения, дополнительный терапевтический агент представляет собой анти-CSF1R антитело, описанное в США 8182813, 8206715, 8263079, 8513199 или 9221910. В конкретном варианте осуществления данного изобретения анти-CSF1R антитело выбрано из

a) антитела, содержащего тяжелую цепь, содержащую последовательность из SEQ ID NO: 429, и легкую цепь, содержащую последовательность из SEQ ID NO: 430;

b) антитела, содержащего тяжелую цепь, содержащую участок определяющий комплементарность 1 (CDR1) тяжелой цепи (HC), содержащий последовательность из SEQ ID NO: 431, CDR2 HC, содержащий последовательность из SEQ ID NO: 432, и CDR3 HC, содержащий последовательность из SEQ ID NO: 433, и легкую цепь, содержащую CDR1 легкой цепи (LC), содержащую последовательность из SEQ ID NO: 434, CDR2 LC, содержащую последовательность из SEQ ID NO: 435, и CDR3 LC, содержащую последовательность из SEQ ID NO: 436; и

c) антитела, содержащего тяжелую цепь, содержащую последовательность из SEQ ID NO: 437, и легкую цепь, содержащую последовательность из SEQ ID NO: 438.

Обычно пациентом является человек, но отличное от человека млекопитающие, включая трансгенных млекопитающих, также может быть подвергнуто лечению. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения данное изобретение относится к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту или фармацевтической композиции, предоставленной в данном изобретении для применения в качестве лекарственного средства. В некоторых аспектах данное изобретение относится к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту или фармацевтической композиции, предоставленной в данном изобретении, для использования в способе лечения рака. В некоторых аспектах данное изобретение относится к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту или фармацевтической композиции, предоставленной в данном изобретении, для применения в способе лечения рака у субъекта, включающем введение субъекту эффективного количества антитела или его антигенсвязывающего фрагмента или фармацевтической композиции, предоставленной в данном изобретении.

1.4.1.1. Пути введения и дозировка.

Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент или композиция, описанные в данном изобретении, могут быть доставлены субъекту различными путями, такими как парентеральный, подкожный, внутривенный, внутрикожный, трансдермальный, интраназальный, внутриопухольный и введение в дренирующий опухоль лимфатический узел. В одном варианте осуществления данного изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент или композицию вводят внутривенным путем.

Количество антитела или его антигенсвязывающего фрагмента или композиции, которые будут эффективны при лечении состояния, будет зависеть от природы заболевания. Точная доза для применения в композиции также будет зависеть от пути введения и серьезности заболевания.

1.4.2. Обнаружение и диагностические применения.

Анти-V7-N4 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в данном изобретении (см., например, раздел 5.2), можно использовать для анализа уровней белка V7-N4 в биологическом образце с использованием классических способов, известных специалистам в данной области, включая иммуноанализы, такие как иммуноферментный анализ (ИФА), иммунопреципитация или вестерн-блоттинг. Подходящие метки для анализа антител известны в данной области и включают ферментные метки, такие как глюкозооксидаза; радиоизотопы, такие как йод (125I, 121I), углерод (14C), сера (35S), тритий (3H), индий (121 In) и технеций (99Tc); люминесцентные метки, такие как люминол; и флуоресцентные метки, такие как флуоресцеин и родамин, и биотин. Такие метки могут быть использованы для метки

антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, описанного в данном изобретении. Альтернативно второе антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который распознает анти-В7-Н4 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в данном изобретении, могут быть помечены и использованы в сочетании с анти-В7-Н4 антителом или его антигенсвязывающим фрагментом для определения уровня белка В7-Н4.

Предполагается, что анализ уровня экспрессии белка В7-Н4 включает качественное или количественное измерение или оценку уровня белка В7-Н4 в первом биологическом образце либо напрямую (например, путем определения или оценки абсолютного уровня белка), либо относительно (например, по сравнению с уровнем белка, связанным с заболеванием, во втором биологическом образце). Уровень экспрессии полипептида В7-Н4 в первом биологическом образце может быть измерен или оценен и сравнен со стандартным уровнем белка В7-Н4, причем стандарт берется из второго биологического образца, полученного от индивидуума, не имеющего расстройства, или определяется путем усреднения уровней от популяции индивидуумов, не имеющих расстройства. Как будет понятно в данной области техники, когда известен "стандартный" уровень полипептида В7-Н4, его можно многократно использовать в качестве стандарта для сравнения.

Используемый в данном изобретении термин "биологический образец" относится к любому биологическому образцу, полученному от субъекта, клеточной линии, ткани или другого источника клеток, потенциально экспрессирующих В7-Н4. Способы получения биопсии тканей и биологических жидкостей животных (например, людей) хорошо известны в данной области. Биологические образцы включают периферические мононуклеарные клетки крови. Биологический образец также может представлять собой образец крови, в котором циркулирующие опухолевые клетки (или "СТС") могут экспрессировать В7-Н4 и обнаруживаться.

Описанное в данном изобретении анти-В7-Н4 антитело можно использовать для прогностических, диагностических, мониторинговых и скрининговых применений, включая применения *in vitro* и *in vivo*, хорошо известные и стандартные для квалифицированного специалиста и основанные на данном описании. Прогностические, диагностические, мониторинговые и скрининговые анализы и наборы для оценки *in vitro* и оценки состояния иммунной системы и/или иммунного ответа могут использоваться для прогнозирования, диагностики и мониторинга для оценки образцов пациентов, включая те, о которых известно, что они имеют или подозреваются на наличие дисфункции иммунной системы или рака. Этот тип прогностического и диагностического мониторинга и оценки уже на практике использует антитела против белка HER2 при раке молочной железы (HerceptTest™, Dako), где анализ также используется для оценки пациентов при терапии антителами с использованием Герцептина®. Приложения *in vivo* включают направленную клеточную терапию и модуляцию иммунной системы, а также радиоизображение иммунных ответов.

Анти-В7-Н4 антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, описанные в данном изобретении, могут нести обнаруживаемую или функциональную метку. Когда используются флуоресцентные метки, доступная в данное время микроскопия и флуоресцентно-активированный анализ сортировщика клеток (FACS) или комбинация обоих методов, известных в данной области техники, могут быть использованы для идентификации и количественного определения специфических связывающих элементов. Анти-В7-Н4 антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, описанные в данном изобретении, могут нести флуоресцентную метку. Иллюстративные флуоресцентные метки включают, например, реактивные и конъюгированные зонды, например, аминокумарин, флуоресцеин и техасский красный, красители Alexa Fluor, красители Cy и красители DyLight. Анти-В7-Н4 антитело 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. Когда используются радиоактивные метки, доступные в данное время процедуры подсчета, известные в данной области, могут использоваться для идентификации и количественного определения специфического связывания анти-В7-Н4 антитела или антигенсвязывающего фрагмента с В7-Н4 (например, В7-Н4 человека). В случае, когда метка представляет собой фермент, обнаружение может быть выполнено любым из используемых в данное время колориметрических, спектрофотометрических, флуороспектрофотометрических, амперометрических или газометрических методов, известных в данной области техники. Это может быть достигнуто путем контакта образца или контрольного образца с анти-В7-Н4 антителом или его антигенсвязывающим фрагментом в условиях, которые позволяют образовать комплекс между антителом или его антигенсвязывающим фрагментом и В7-Н4. Любые комплексы, образованные между антителом или его антигенсвязывающим фрагментом и В7-Н4, выявляют и сравнивают в образце и контроле. В свете специфического связывания антител или их антигенсвязывающих фрагментов, описанных в данном изобретении, для В7-Н4, антитела или их антигенсвязывающие фрагменты можно использовать для специфического выявления экспрессии В7-Н4 на поверхности клеток. Описанные в данном изобретении антитела или их антигенсвязывающие фрагменты также можно использовать для очистки В7-Н4 с помощью иммуоафинной очистки.

Также в данное изобретение включена система анализа, которая может быть приготовлена в форме набора для анализа для количественного анализа степени присутствия, например, В7-Н4. Система или набор для тестирования могут содержать меченый компонент, например, меченое антитело или антигенсва-

зывающий фрагмент, и один или более дополнительных иммунохимических реагентов. См., например, раздел 5.6 ниже для получения дополнительной информации о комплектах.

Также в данном изобретении представлен способ обнаружения В7-Н4 в образце, включающий приведение в контакт указанного образца с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, предоставленный в данном изобретении. В некоторых аспектах в данном изобретении предлагается использование антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, представленного в данном изобретении, для обнаружения *in vitro* В7-Н4 в образце. В одном аспекте в данном изобретении представлено антитело или его антигенсвязывающий фрагмент или фармацевтическая композиция, предоставленная в данном изобретении, для использования при обнаружении В7-Н4 у субъекта или в образце, полученном от субъекта. В одном аспекте в данном изобретении представлено антитело или его антигенсвязывающий фрагмент или фармацевтическая композиция, предоставленная в данном изобретении для использования в качестве диагностики. В одном предпочтительном варианте осуществления данного изобретения, антитело содержит обнаруживаемую метку. В одном предпочтительном варианте осуществления данного изобретения, В7-Н4 представляет собой В7-Н4 человека. В одном предпочтительном варианте данного изобретения, субъектом является человеком.

1.5. Наборы.

В данном изобретении предоставлены наборы, содержащие одно или более антител или их антигенсвязывающих фрагментов, описанных в данном изобретении, или их конъюгаты. В конкретном варианте осуществления данного изобретения предоставляется фармацевтическая упаковка или набор, содержащий один или более контейнеров, заполненных одним или более ингредиентами фармацевтических композиций, описанных в данном изобретении, такими как одно или более антител или их антигенсвязывающих фрагментов, представленных в данном изобретении. При желании с таким контейнером(ами) может быть связано уведомление в форме, предписанной правительственным агентством, регулирующим производство, использование или продажу фармацевтических препаратов или биологических продуктов, причем это уведомление отражает одобрение агентства по производству, использованию или продаже для введения человеку.

В данном изобретении также представлены наборы, которые можно использовать в диагностических способах. В одном варианте осуществления данного изобретения набор содержит антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в данном изобретении, предпочтительно очищенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, в одном или более контейнерах. В конкретном варианте осуществления данного изобретения описанные в данном изобретении наборы содержат по существу выделенный антиген В7-Н4 (например, В7-Н4 человека), который можно использовать в качестве контроля. В другом конкретном варианте осуществления данного изобретения, описанные в данном изобретении наборы дополнительно содержат контрольное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые не реагируют с антигеном В7-Н4. В другом конкретном варианте осуществления данного изобретения, описанные в данном изобретении наборы содержат один или более элементов для обнаружения связывания антитела или его антигенсвязывающего фрагмента с антигеном В7-Н4 (например, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент могут быть конъюгированы с детектируемым субстратом таким как флуоресцентное соединение, 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 детектируемым субстратом). В конкретных вариантах осуществления данного изобретения, набор, представленный в данном изобретении, может содержать рекомбинантный или химически синтезированный антиген В7-Н4. Антиген В7-Н4, представленный в наборе, также может быть прикреплен к твердой подложке. В более конкретном варианте осуществления данного изобретения, средство обнаружения описанного выше набора включает твердую подложку, к которой присоединен антиген В7-Н4. Такой набор также может содержать неприкрепленное меченое репортером анти-человеческое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент или анти-мышинной/крысиное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент. В этом варианте осуществления данного изобретения, связывание антитела или его антигенсвязывающего фрагмента с антигеном В7-Н4 можно обнаружить путем связывания указанного репортерно-меченного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента. Следующие примеры предлагаются в качестве иллюстрации, а не в качестве ограничения.

Примеры

Примеры в этом разделе (т.е. в разделе 6) предлагаются в качестве иллюстрации, а не в качестве ограничения.

Пример 1. Оценка распространенности экспрессии В7-Н4 при разных диагнозах.

Мышиное моноклональное антитело В7-Н4 А57.1 (каталог АТСС № РТА-5180) использовали для обнаружения присутствия В7-Н4 в архивных образцах, смеси целых срезов и микрочипах опухоли. Образцы обрабатывали первичным антителом и детектировали с использованием системы обнаружения полимера, присоединенной к DAB (Ventana Medical Systems).

В7-Н4 легко обнаруживался в мембране, а цитозоль в опухолевых тканях собирался у различных больных раком, включая инвазивный протоковый рак, тройной негативный рак молочной железы, рак

яичников, немелкоклеточный рак легких и рак эндометрия. (фиг. 1). Кроме того, частота экспрессий также была высокой в показателях, перечисленных в табл. 11.

Таблица 11

Тип опухоли	Обнаружение В7-Н4 в опухолях		
	Общее количество	Количество положительных	Процент положительных
Тройной негативный рак молочной железы	74	58	78 %
Инвазивная протоковая карцинома	51	38	74,50 %
Карцинома эндометрия	77	54	70 %
Рак яичников	141	85	60 %
Немелкоклеточный рак легких (плоскоклеточный)	47	19	40 %

В7-Н4 экспрессируется при других формах рака, таких как рак почки (например, почечно-клеточный рак), рак мочевого пузыря (например, рак уротелиальной клетки), рак поджелудочной железы и рак щитовидной железы. См., например, Zhu, J. et al., *Asian Pacific J. Cancer Prev.*, 14:3011-3015 (2011), Krambeck A. et al., *PNAS*, 103:10391-10396 (2006), Fan, M. et al., *Int. J. Clin. Exp. Pathol.*, 7:6768-6775 (2014); Xu, H. et al., *Oncology Letters*, 11:1841-1846 (2016); Liu, W. et al., *Oncology Letters*, 8:2527-2534 (2014). В последующем эксперименте распространенность В7-Н4 в различных типах опухолей оценивали с помощью иммуногистохимии (ИГХ) (фиг. 1В). Были протестированы следующие типы опухолей и стадии заболевания: эндометриальная, инвазивная карцинома протоков молочной железы (IDC), тройной негативный рак молочной железы (TN), тройной негативный рак молочной железы (поздняя стадия), рак яичников, рак мочевого пузыря (ранняя стадия), немелкоклеточный рак легкого (пл. (плоскоклеточный), ранняя стадия), немелкоклеточный рак легкого (пл., поздняя стадия), рак головы и шеи, мочевого пузыря (поздняя стадия), мелкоклеточный рак легкого, холангиокарцинома, немелкоклеточный рак легкого (ад. (аденокарцинома)), рак щитовидной железы, рак поджелудочной железы, рак желудка, меланомы, глиобластома или мультиформная глиобластома (GBM) и карцинома меркеля. Экспрессию поверхностного белка В7-Н4 на опухолевых клетках оценивали на закупленных образцах опухолей от различных типов опухолей и стадий заболевания, где это возможно (ранняя стадия (I/II), поздняя стадия (III/IV)). Интенсивность ИГХ с антителом А57.1 оценивалась по категориям от 0 до 3, и образцы были отнесены к одному баллу ИГХ по наибольшей интенсивности, наблюдаемой у как минимум 10% всех опухолевых клеток на весь разрез. Всего было оценено от 50 до 100 образцов на тип опухоли.

Пример 2. Получение новых антител против В7-Н4 человека В7-Н4-специфичные антитела выделяли из полноразмерных библиотек наивных антител человека IgG1 с использованием системы презентации дрожжей *in vitro*.

Библиотеки предназначены для имитации иммунной системы; они не содержат заранее определенных пар тяжелых и легких цепей. Библиотеки были подвергнуты множеству раундов стратегий позитивного и негативного отбора с использованием белка В7-Н4 для обогащения IgG, которые перекрестно реагировали с мишенью В7-Н4 человека, яванского макака и мыши. После четырех раундов отбора полученные IgG секвенировали, и были получены уникальные антитела, которые были оценены как по аффинному, так и по аффинности мономерного связывания с рекомбинантным эктодоменом В7-Н4, для связывания эпитопа и для специфического связывания клеток-мишеней.

Более подробное описание способов отбора, созревания аффинности и анализа, которые использовались для генерации и характеристики антител к В7-Н4, приводится ниже.

Материалы и способы.

Антигены были биотинилированы с использованием набора EZ-Link Sulfo-NHS-Biotinylation от Pierce. F(ab')₂ анти-человеческий каппа-FITC (LC-FITC) козы, ExtrAvidin-PE (EA-PE) и стрептавидин-AF633 (SA-633) были получены от Southern Biotech, Sigma и Molecular Probes соответственно. Разделительные колонки со стрептавидином MicroBeads и MACS LC были приобретены у Miltenyi Biotec. Козий

анти-человеческий IgG-PE (Human-PE) был получен от Southern Biotech.

Обнаружение наивных.

Восемь наивных человеческих синтетических дрожжевых библиотек, каждая из $\sim 10^9$ разнообразия, были размножены, как описано ранее (см. Y. Xu et al., Addressing polyspecificity of antibodies selected from an in vitro yeast presentation system: a FACS-based, high-throughput selection and analytical tool, PDS, 26.10, 663-70 (2013); WO 2009036379; WO 2010105256; и WO 2012009568.) Для первых двух раундов отбора была проведена методика сортировки магнитными шариками с использованием системы Miltenyi MACS, как описано ранее (см. Siegel et al., High efficiency recovery and epitope-specific sorting of an scFv yeast display library, "J Immunol. Methods, 286(1-2), 141-153 (2004)). Вкратце дрожжевые клетки ($\sim 10^{10}$ клеток/библиотека) инкубировали с 10 мл до 10 нМ биотинилированного слитого Fc антигена в течение 30 мин при 30°C в промывочном буфере (фосфатно-буферный солевой раствор (ФСБ)/0,1% бычий сывороточный альбумин (БСА)). После однократной промывки 40 мл ледяного промывочного буфера осадок клеток ресуспендировали в 20 мл промывочного буфера и к дрожжам добавляли стрептавидиновые микрошарики (500 мкл) и инкубировали в течение 15 мин при 4°C. Затем дрожжи осаждали, ресуспендировали в 20 мл промывочного буфера и загружали в колонку Miltenyi LS. После загрузки 20 мл колонку промывали 3 раза 3 мл промывочного буфера. Колонку затем удаляли из магнитного поля и дрожжи элюировали 5 мл питательной среды и затем выращивали в течение ночи. Следующие раунды отбора были выполнены с использованием проточной цитометрии. Приблизительно 2×10^7 дрожжей осаждали, трижды промывали промывочным буфером и инкубировали при 30°C либо с уменьшающимися концентрациями биотинилированного слитого Fc антигена (от 10 до 1 нМ) в равновесных условиях, 10 нМ биотинилированных слитых Fc антигенов различных видов для получения видовой перекрестной реактивности, или с реагентом для снижения полиспецифичности (PSR) для удаления неспецифических антител из отбора. Для деплетирования PSR библиотеки инкубировали с разведением 1:10 биотинилированного реагента PSR, как описано ранее (см. Y. Xu et al., Addressing polyspecificity of antibodies selected from an in vitro yeast presentation system: a FACS-based, high-throughput selection and analytical tool, PDS, 26.10, 663-70 (2013)). Затем дрожжи дважды промывали промывочным буфером и окрашивали LC-FITC (разбавленным 1:100) и либо SA-633 (разбавленным 1:500), либо EAPE (разбавленным 1:50) вторичными реагентами в течение 15 мин при 4°C. После промывки дважды промывочным буфером клеточные осадки ресуспендировали в 0,3 мл промывочного буфера и переносили в пробирки с крышками с фильтром. Сортировку проводили с использованием сортировщика FACS ARIA (BD Biosciences) и определяли сортировочные ворота для отбора антител с желаемыми характеристиками. Отборочные раунды повторялись до тех пор, пока не была получена популяция со всеми желаемыми характеристиками. После последнего раунда сортировки дрожжи высевали и отбирали отдельные колонии для характеристики. Оптимизация антитела Оптимизацию антител проводили способом пакетной перестановки легкой цепи, а затем путем введения различий в переменные участки тяжелой цепи и легкой цепи, как описано ниже. Комбинация некоторых из этих подходов была использована для каждого антитела.

Пакетная перестановка легкой цепи. Плазмиды тяжелой цепи из наивных результатов отбора экстрагировали из дрожжей посредством разбивания и захвата, размножали и затем очищали от E.coli и трансформировали в библиотеку легких цепей с разнообразием 5×10^6 . Отборы выполнялись с одним раундом MACS и четырьмя раундами FACS с использованием тех же условий, что и наивное исследование. Отбор CDRH1 и CDRH2:CDRH3 одиночного антитела рекомбинировали в предварительно созданную библиотеку с вариантами CDRH1 и CDRH2 с разнообразием 1×10^8 , и отбор проводили с одним раундом MACS и четырьмя раундами FACS, как описано в первоначальном открытии. Для каждого раунда FACS просматривали библиотеки на предмет связывания PSR, видовой перекрестной реактивности и давления аффинности, и проводили сортировку, чтобы получить популяцию с желаемыми характеристиками. Для этих отборов применяли аффинные давления с использованием снижающихся концентраций биотинилированного антигена HIS-B7-H4 (от 100 до 1 нМ) в условиях равновесия при 30°C.

Отбор VH Mut. Варибельный участок тяжелой цепи (VH) был мутагенизирован с помощью подержанной ошибкам ПЦР. Затем была создана библиотека путем трансформации этого мутагенизированного VH и вектора экспрессии тяжелой цепи в дрожжи, уже содержащие плазмиду легкой цепи родителя. Отборы осуществлялись аналогично предыдущим циклам с использованием сортировки FACS для двух раундов. Для каждого раунда FACS просматривали библиотеки на предмет связывания PSR и давления аффинности, и проводили сортировку, чтобы получить популяцию с желаемыми характеристиками. Давления аффинности для этих селекций выполняли, как описано выше в селекции CDRH1 и CDRH2.

Отбор CDRL1 и CDRL2: CDRL3 одиночного антитела рекомбинировали в предварительно созданную библиотеку с вариантами CDRL1 и CDRL2 с разнообразием $\sim 5 \times 10^5$, и отборы выполняли аналогично предыдущим циклам с использованием сортировки FACS в течение трех раундов. Для каждого раунда FACS просматривали библиотеки на предмет связывания PSR и давления аффинности, и проводили сортировку, чтобы получить популяцию с желаемыми характеристиками. Давления аффинности для этих селекций выполняли, как описано выше в селекции CDRH1 и CDRH2. Производство и очистка антител

Клоны дрожжей выращивали до насыщения и затем индуцировали в течение 48 ч при 30°C при встряхивании. После индукции дрожжевые клетки осаждали и супернатанты собирали для очистки. IgG очищали с использованием колонки с белком А и элюировали уксусной кислотой, pH 2,0. Фрагменты Fab были получены путем расщепления папаином и очищены через KappaSelect (GE Healthcare LifeSciences).

Измерения K_D ForteBio.

Измерения аффинности ForteBio проводили на Octet RED384, как правило, как описано ранее (см. Ester et al., High throughput solution-based measurement of antibody-antigen affinity and epitope binning, *Mabs*, 5(2), 270-278 (2013)). Вкратце измерения аффинности ForteBio выполняли, загружая IgG онлайн на датчики АНQ. Датчики уравнивали в автономном режиме в буфере для анализа в течение 30 мин и затем контролировали в режиме онлайн в течение 60 с для установления исходного уровня. Датчики с нагруженными IgG подвергали воздействию 100 нМ антигена в течение 3 мин, а затем переносили в буфер для анализа в течение 3 мин для измерения несоответствия. Для оценки моновалентной аффинности вместо IgG использовали Fab. Для этой оценки небиотинилированный слитый Fc антигена загружали в режиме онлайн на датчики АНQ. Датчики уравнивали в автономном режиме в буфере для анализа в течение 30 мин и затем контролировали в режиме онлайн в течение 60 с для установления исходного уровня. Датчики с загруженным антигеном подвергали воздействию 100 нМ Fab в течение 3 мин, а затем их переносили в буфер для анализа в течение 3 мин для измерения несоответствия. Кинетику анализировали с использованием модели связывания 1:1. ForteBio эпитоп-специфическая сортировка/блокирование лиганда Эпитоп-специфическая сортировка/блокирование лиганда проводили с использованием стандартного перекрестного анализа сэндвич-формата. Контрольный IgG против мишени загружали на датчики АНQ, и незанятые Fc-связывающие сайты на датчике блокировали нерелевантным человеческим IgG1 антителом. Затем датчики подвергали воздействию 100 нМ целевого антигена, а затем второго антитела против мишени или лиганда. Дополнительное связывание вторым антителом или лигандом после ассоциации антигена указывает на незанятый эпитоп (не конкурент), тогда как отсутствие связывания указывает на блокирование эпитопа (конкурент или блокирование лиганда). Четыре неконкурентных антитела ("связывающие антитела" 1, 2, 3 и 4) были использованы для идентификации четырех отдельных частей эктодомена В7-Н4 с помощью SPR. Все антитела, сгенерированные во время этой кампании, были затем оценены на предмет конкурентного связывания с этими четырьмя связывающими антителами с эктодоменом В7-Н4. Если антитело В7-Н4 конкурировало с одним из четырех связывающих антител (например, связывающее антитело 1), было определено, что антитело В7-Н4 находится в этом BIN (например, BEST 1). Если антитело В7-Н4 конкурировало с двумя из четырех связывающих антител (например, связывающими антителами 2 и 3), определяли, что антитело В7-Н4 находится в обоих этих BEST (например, BIN2/3). Антитела IgG попадали по меньшей мере в четыре связывающих группы, причем >90% антител связывались с В7-Н4 человека/цино или мыши с аффинным ответом в диапазоне от >0,1 до <100 нМ. Из рекомбинантных белковых связывающих приблизительно 75% также связываются с В7-Н4 на клетках. Анализ связывания клеток 100000 клеток со сверхэкспрессией антигена промывали промывочным буфером и инкубировали с 100 мкл 100 нМ IgG в течение 5 мин при комнатной температуре. Затем клетки дважды промывали промывочным буфером и инкубировали с 100 мкл 1:100 античеловеческого IgGPE в течение 15 мин на льду. Затем клетки дважды промывали промывочным буфером и анализировали на анализаторе FACS Canto II (BD Biosciences).

Анализ связывания PSR.

Анализ PSR проводили, как описано ранее (см. Xu Y et al. (2013), Addressing polyspecificity of antibodies selected from an in vitro yeast presentation system: A FACS-based, high-throughput selection and analytical tool, *Protein Eng. Des. Sel.*, 26(10):663-670). Коротко говоря, растворимые мембранные белки получали из клеток CHO. Фракцию обогащенной мембраны биотинилировали с использованием NHS-LCBiotin (Pierce, Thermo Fisher). Этот полиспецифический реагент инкубировали с IgG-представляющими дрожжами с последующей промывкой. Затем к смеси добавляли вторичную смесь для мечения (экстравидин-R-PE, анти-человеческий LC-FITC и йодид пропидия). Образцы анализировали на анализаторе FACSCanto II (BD Biosciences) с использованием инжектора образцов HTS. Данные проточной цитометрии были проанализированы на среднюю интенсивность флуоресценции (MFI) в канале R-PE для оценки неспецифического связывания. Значения MFI были нормализованы от 0 до 1 на основе трех эталонных антител, демонстрирующих низкие, средние и высокие значения MFI PSR. Динамическая сканирующая флуориметрия 10 мкл 20× Sypro Orange добавляют к 20 мкл 0,2-1 мг/мл раствора мАт или Fab. Прибор RT-PCR (BioRad CFX96 RT PCR) используется для повышения температуры пластины для образца с 40 до 95°C с шагом 0,5°C, с уравниванием в течение 2 мин при каждой температуре. Негатив первой производной для необработанных данных используется для извлечения T_m . AC-SINS Анализ AC-SINS выполняли, как описано ранее (см. Liu Y. et al. (2014), High-throughput screening for developability during early-stage antibody discovery using self-interaction nanoparticle spectroscopy, *MABs*, 6(2):483-492). Коротко говоря, наночастицы золота (Ted Pella Inc.) покрывали 80% захватывающим Fc античеловеческими IgG козы (Jackson ImmunoResearch) и 20% поликлональными неспецифическими антителами козы (Jackson ImmunoResearch). Затем представляющие интерес антитела инкубировали с частицами

в течение 2 ч и измеряли сдвиг длины волны, используя Molecular Devices SpectraMax M2 с программным обеспечением SoftMax Pro6. Самовзаимодействующие клоны демонстрируют более высокий сдвиг длины волны от образца ФСБ.

Пример 3. Структурная характеристика человеческих моноклональных антител против В7-Н4.

Антитела В7-Н4 являются изотипом IgG1/каппа человека. Тяжелые вариабельные участки (VH) состоят из аллелей из генов зародышевой линии VH1, VH3 и VH4 и вариабельных легких (VL) из аллелей из генов зародышевой линии, которые включают Vk1 и Vk3. Некоторые подмножества антител имеют высокую идентичность в соответствующих участках CDR VH и VL, которая может составлять от 72 до 100%. Антитела, которые имеют один и тот же аллель зародышевой линии, имеют высокую идентичность в своих каркасных (FR) участках VH и VL, которая колеблется в пределах 88-100%. Последовательности антител к В7-Н4 представлены в табл. 1-10.

Пример 4. Характеризация связывания моноклональных антител с белком В7-Н4.

Аффинность связывания анти-В7-Н4 антител с внеклеточным доменом В7-Н4 (ECD) определяли с помощью интерферометрии биослоя (BLI). Анализы аффинности ForteBio более подробно описаны выше в примере 2. Вкратце рекомбинантный белок В7-Н4-huIgG1 человека (SEQ ID NO: 409) иммобилизовали на кончиках белка А с последующим изотипическим контролем hIgG1 для насыщения любых оставшихся сайтов связывания на кончике захвата. Анти-В7-Н4 антитела затем оценивали на связывание. Кроме того, связывание антитела с В7-Н4 яванского макака (SEQ ID NO: 2) и мыши (SEQ ID NO: 3) было также оценено с использованием того же протокола. Результаты суммированы в табл. 12.

В7-Н4-huIgG1:

MASLGQILFWSIISIIIILAGAIALIGFGISGRHSITVTTVASAGNIGEDGILSCTFEPDIKLSDD
 IVIQWLKEGVLGLVHEFKEGKDELSEQDEMFRGRTAVFADQVIVGNASRLKKNVQLTD
 AGTYKCYIITSKGKGNANLEYKTGAFSMPEVNVNDYNASSETLRCEAPRWFPQPTVVWA
 SQVDQGANFSEVSNTSFELNSENVTMKVVSVLNVNTINNTYSCMIENDIAKATGDIKVT
 ESEIKRRSHLQLLNSKASGSEPKSSDKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE
 EVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW
 LNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY
 PSDIAVEVESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFNFSVMHEA
 LHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:409)

Таблица 12

Связывание антитела В7-Н4 с внеклеточным доменом с помощью интерферометрии биослоя

Антитело	BIN	В7-Н4 человека			В7-Н4 яванского макака:			В7-Н4 мыши		
		K _D (M)	k _{on} (1/Mc)	k _{off} (1/c)	K _D (M)	k _{on} (1/Mc)	k _{off} (1/c)	K _D (M)	k _{on} (1/Mc)	k _{off} (1/c)
15441	2	7,15 E-09	1,22E+ 06	8,72 E-03	5,46 E-08	1,33E+ 06	7,27 E-02	NB	-	-
15461	2/3	6,29 E-08	3,81E+ 05	2,40 E-02	6,21 E-08	4,34E+ 05	2,70 E-02	5,57 E-08	3,05E+ 05	1,70 E-02
15462	2/3	PF	-	-	6,65 E-08	6,72E+ 05	4,47 E-02	8,31 E-08	4,59E+ 05	3,81 E-02
15465	2/3	5,13 E-08	4,84E+ 05	2,48 E-02	5,11 E-08	5,44E+ 05	2,78 E-02	8,96 E-08	2,96E+ 05	2,65 E-02
15472	4	7,11 E-09	7,00E+ 05	4,97 E-03	7,80 E-09	7,46E+ 05	5,82 E-03	3,80 E-08	4,22E+ 05	1,60 E-02
15478	4	3,25 E-08	4,77E+ 05	1,55 E-02	3,11 E-08	5,44E+ 05	1,69 E-02	NB	-	-

15483	2/3	PF	-	-	1,08 E-07	3,80E+ 05	4,09 E-02	2,63 E-07	2,65E+ 05	6,95 E-02
15489	2/3	6,37 E-08	3,66E+ 05	2,33 E-02	7,21 E-08	3,98E+ 05	2,87 E-02	2,01 E-07	2,93E+ 05	5,90 E-02
15495	2	9,44 E-09	2,89E+ 06	2,72 E-02	5,17 E-09	3,25E+ 06	1,68 E-02	NB	-	-
15503	2	1,04 E-08	1,96E+ 06	2,05 E-02	6,32 E-09	1,82E+ 06	1,15 E-02	NB	-	-
20496	Друг ой	8,05 E-10	6,89E+ 05	5,55 E-04	7,21 E-10	7,90E+ 05	5,69 E-04	2,46 E-08	6,92E+ 05	1,71 E-02
20500	3	5,97 E-09	3,91E+ 05	2,33 E-03	5,47 E-09	4,18E+ 05	2,29 E-03	8,25 E-09	4,08E+ 05	3,36 E-03
20501	3	2,56 E-09	9,80E+ 05	2,51 E-03	2,42 E-09	1,02E+ 06	2,46 E-03	3,35 E-09	1,12E+ 06	3,75 E-03
20502	3	1,20 E-09	9,36E+ 05	1,15 E-03	1,20 E-09	9,62E+ 05	1,12 E-03	3,40 E-09	6,32E+ 05	2,13 E-03
20502,1	3	3,07 E-09	4,87E+ 05	1,50 E-03	2,64 E-09	5,28E+ 05	1,39 E-03	3,99 E-09	5,20E+ 05	2,07 E-03
20506	3	1,69 E-09	4,41E+ 05	7,46 E-04	1,48 E-09	4,58E+ 05	6,78 E-04	3,53 E-09	4,66E+ 05	1,64 E-03
20513	3	3,98 E-09	4,53E+ 05	1,80 E-03	3,67 E-09	4,91E+ 05	1,80 E-03	4,57 E-09	5,17E+ 05	2,36 E-03
20516	3	1,80 E-08	4,10E+ 05	7,38 E-03	1,76 E-08	4,45E+ 05	7,83 E-03	4,14 E-08	3,98E+ 05	1,65 E-02
22208	3	5,67 E-09	1,84E+ 05	1,04 E-03	5,44 E-09	1,99E+ 05	1,08 E-03	1,67 E-08	9,95E+ 04	1,67 E-03
22213	3	1,44 E-08	4,96E+ 04	7,13 E-04	7,48 E-09	6,44E+ 04	4,82 E-04	1,37 E-08	4,03E+ 04	5,52 E-04
22216	3	1,47	2,45E+ 05	3,59	1,47	2,45E+ 05	3,59	1,47	2,45E+ 05	3,59
		E-09	05	E-04	E-09	05	E-04	E-09	05	E-04

Кроме того, аффинность связывания выбранных анти-В7-Н4 антител с N-концевым доменом В7-Н4 человека (В7-Н4 IgV-huIgG1; SEQ ID NO: 410) определяли с помощью поверхностного плазмонного резонанса (SPR). Вкратце Fab анти-человеческого антитела иммобилизовали на поверхности SPR-чипа, дериватизированного карбоксилком, и анти-В7-Н4 антитело захватывали на полученной поверхности при 5 мкг/мл в течение 30 с. IgV-huIgG1 В7-Н4 в различных концентрациях (0, 3,7, 11,1, 33,3, 100 и 300 нМ) затем пропускали через поверхность и позволяли связываться с анти-В7-Н4 антителами во время ассоциации фазы с последующей промывкой буфера во время фазы диссоциации. Данные подгоняли, используя модель связывания 1:1, и результаты суммированы в табл. 13.

IgV-huIgG1 B7-H4:

MASLGQILFWSIISIIIIILAGAIALIIIGFGISGRHSITVTTVASAGNIGEDGILSCTFEPDIKLS
 IVIQWLKEGVLGLVHEFKEGKDELSEQDEMFRGRTAVFADQVIVGNASLRLKNVQLTD
 AGTYKCYIITSKGKGNANLEYKTGAFSGSEPKSSDKTHTCPPAPELLGGPSVFLFPPKP
 KDTLMISRTPVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS
 VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQV
 SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV
 FSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:410)

Таблица 13

Связывание антитела B7-H4 с N-концевым доменом
 посредством поверхностного плазмонного резонанса

Антитело	BIN	B7-H4 человека		
		K _D (M)	k _{on} (1/Мс)	k _{off} (1/с)
15461	2/3	3,04E-08	1,71E+05	5,19E-03
15462	2/3	1,69E-08	2,95E+05	4,98E-03
15465	2/3	1,73E-08	2,41E+05	4,17E-03
15483	2/3	1,84E-08	2,41E+05	4,43E-03
15489	2/3	2,37E-08	1,64E+05	3,89E-03
20502	3	2,03E-09	1,78E+05	3,61E-04

Таким образом, множественные анализы демонстрируют, что антитела связываются с B7-H4.

Пример 5. Эпитопное картирование.

Группы для связывания анти-B7-H4 антител определяли с помощью биослойной интерферометрии (BLI). Анализы картирования эпитопов более подробно описаны выше в примере 2. Вкратце первое анти-B7-H4 антитело было захвачено на кончиках белка A, а затем контрольное антитело huIgG1 для насыщения дополнительных сайтов связывания на кончиках. Затем сенсорные кончики подвергали воздействию антигена (B7-H4-huIgG1) (SEQ ID NO: 409), а затем второго анти-B7-H4 антитела, которое затем оценивали на связывание. Эпитопные группы определяли путем сравнения со связыванием после того, как не-B7-H4-антитело использовали в качестве первого антитела. Результаты суммированы в табл. 12.

Пример 6. Характеризация связывания моноклональных антител с B7-H4, экспрессируемыми на поверхности клеток.

Клеточные линии НЕК293Т трансфицировали для экспрессии полноразмерного B7-H4 человека, яванского макака, мыши или крысы. Кроме того, эндогенная человеческая B7-H4-экспрессирующая клеточная линия рака молочной железы SK-BR-3 была использована для оценки способности антител связываться с B7-H4, экспрессируемыми на поверхности клетки. 1×10^5 родительских клеточных линий НЕК293Т или трансфицированных НЕК293Т инкубировали с 100 нМ антител B7-H4. После инкубации клетки осаждали, промывали и инкубировали со вторичным меченым антителом, и образцы собирали на проточном цитометре. Кратность связывания по родительской клеточной линии (FOP) рассчитывали следующим образом: MFI-трансфицированные клетки НЕК293Т/MFI-родительские клетки НЕК293Т. Считалось, что значение FOP больше 10 демонстрирует специфическое связывание.

Чтобы оценить активность связывания клеток антителами B7-H4, 1×10^5 клеток SK-BR-3 или клеток 293, трансфицированных для экспрессии B7-H4 яванского макака, мышей или крыс, инкубировали с титрующими дозами антител B7-H4. После инкубации клетки осаждали, промывали и инкубировали со вторичным меченым антителом, и образцы собирали на проточном цитометре. Данные анализировали с использованием программного обеспечения FlowJo, и MFI наносили на график в зависимости от концентрации антител. Активность связывания клеток EC50 рассчитывали с использованием подгонки кривой нелинейной регрессии (GraphPad Prism).

Все антитела B7-H4 продемонстрировали связывание с клетками НЕК293Т, которые экспрессировали B7-H4 человека, B7-H4 яванского макака или B7-H4 мыши.

Антитела также продемонстрировали сильное дозозависимое связывание с клетками SK-BR-3, эндогенно экспрессирующими B7-H4 человека на клеточной поверхности или клеточными линиями НЕК293Т, трансфицированными для экспрессии B7-H4 яванского макака, мыши или крысы на клеточной поверхности. Эти данные демонстрируют, что большинство антител B7-H4 полностью перекрестно-реактивно реагируют с B7-H4 яванского макака, мышей и крыс (фиг. 2A и 2B, табл. 14).

Таблица 14

В7-Н4 антитело, связывающееся с клеточной поверхностью В7-Н4

Антитело	BIN	293- huB7- H4 (FOP)	293- cynoB7- H4 (FOP)	293- moB7- H4 (FOP)	SK- BR-3 (EC50; нМ)	293- cynoB7- H4 (EC50; нМ)	293- мышьB7- H4 (EC50; нМ)	293- крысаB7- H4 (EC50; нМ)
15441	2	67	9	3	34,29	ND	ND	ND
15461	2/3	333	610	887	5,66	6,77	6,37	1,67
15462	2/3	530	416	456	4,55	5,29	5,40	1,13
15465	2/3	626	1324	690	2,13	4,90	5,34	1,47
15472	4	580	1279	685	8,86	-	-	-
15478	4	518	1130	125	PF	-	-	-
15483	2/3	805	1012	1402	14,81	17,4	8,82	1,87
15489	2/3	612	1118	674	31,73	13,7	17,5	4,55
15495	2	619	524	6	61,2	-	-	-
15503	2	289	877	5	PF	-	-	-
20496	Другой	179	758	604	7,60	7,91	6,70	ND
20500	3	182	630	478	1,54	3,38	4,00	1,14
20501	3	205	728	546	1,90	3,89	4,67	1,15
20502,1	3	200	683	559	2,50	4,94	5,57	1,26

Пример 7. Характеризация активности блокады Т-клеточной контрольной точки моноклонального антитела.

Для того чтобы охарактеризовать активность блокады Т-клеточной контрольной точки антител В7-Н4, первичные Т-клетки человека были обогащены мононуклеарными клетками периферической крови (МКПК) с использованием набора для обогащения Т-клеток EasySep™ человека в соответствии с инструкциями производителя. Обогащенные Т-клетки инкубировали при 2×10^5 клеток/мл с анти-CD3/анти-CD28 Dynabeads, в соотношении один шарик на клетку, при 37°C. Через шесть дней шарики магнитно удаляли, а Т-клетки промывали и инкубировали при 1×10^6 клеток/мл с 10 ед/мл ИЛ-2 при 37°C. Через четыре дня Т-клетки промывали и инкубировали в концентрации 1×10^6 клеток/мл вместе с искусственными антигенпрезентирующими клетками (иАПК) в концентрации 2×10^6 клеток/мл при 37°C в присутствии 10 мкг/мл антитела или титрования дозы антитела. иАПК представляют собой клеточную линию НЕК293Т, которая была трансфицирована для совместной экспрессии формата scFv анти-человеческого CD3-клона ОКТ3 и полноразмерного В7-Н4 человека на клеточной поверхности. иАПК обрабатывали митомицином С в течение 1 ч при 37°C, а затем тщательно промывают перед добавлением к совместной культуре Т-клеток. Через 72 ч после совместного культивирования Т-клеток, иАПК и антитела В7-Н4 планшеты центрифугировали, супернатанты собирали и оценивали на продуцирование ИФН γ с помощью ИФА, а клетки собирали и окрашивали для оценки пролиферации с помощью FACS (в частности, клетки в каждой лунке инкубировали с антителами против CD4 и CD8). Затем клетки промывали, фиксировали, пермеабилizировали и инкубировали с реагентом Edu-Click в соответствии с инструкциями производителя. Клетки отмывали и количество пролиферирующих CD4 $^+$, CD8 $^+$ или общего количества Т-клеток измеряли с помощью проточной цитометрии. Данные были проанализированы с использованием программного обеспечения FlowJo. Для образцов, обработанных только одной концентрацией антитела, данные были рассчитаны и представлены как кратное увеличение по сравнению с образцами, обработанными контрольным huIgG. Для образцов, обработанных дозы титрования антитела, график зависимости продукции ИФН γ в зависимости от концентрации антитела и эффективность ЕС 50 рассчитывали с использованием подгонки кривой нелинейной регрессии (GraphPad Prism).

Все антитела BIN2/3 и BIN3 воспроизводимы приводили к активности блокады Т-клеточной контрольной точки, что измерялось по увеличению продукции ИФН γ и/или CD4 $^+$, CD8 $^+$ или пролиферации общего количества Т-клеток. На фиг. 3А продемонстрировано, что антитело 15441 увеличивает пролиферацию Т-клеток по меньшей мере на 3% и увеличивает пролиферацию CD4 $^+$ и CD8 $^+$ Т-клеток по меньшей мере на 2%. На фиг. 3А также продемонстрировано, что антитело 15461 увеличивает пролиферацию Т-клеток по меньшей мере на 21%, увеличивает пролиферацию CD4 $^+$ Т-клеток по меньшей мере на 9% и увеличивает пролиферацию CD8 $^+$ Т-клеток по меньшей мере на 11%. На фиг. 3В-3Д продемонстрированы другие дозозависимые активности блокады Т-клеточной контрольной точки.

Таблица 15

Антитело В7-Н4 - активность блокады Т-клеточной контрольной точки

Антитело	BIN	Анализ иАПК (EC50 +/- STD; нМ)	Донор 1 (Макс. ИФН γ , пг/мл)	Донор 2 (Макс. ИФН γ , пг/мл)	Донор 3 (Макс. ИФН γ , пг/мл)	Донор 4 (Макс. ИФН γ , пг/мл)
15461	2/3	531,18 +/- 403,66	311,64	164,66	1957,34	986,73
15462	2/3	1312,01 +/- 1112,5	205,72	176,33	1661,59	484,8
15465	2/3	4310,72 +/- 7642,6	230,45	133,64	1523,82	865,22
15483	2/3	728,84 +/- 711,1	93,2	87,84	1382,03	939,04
15489	2/3	291,31 +/- 327,82	82,47	96,63	1133,02	799,9

Таблица 16

В7-Н4 антитело, связывающееся с клеточной поверхностью В7-Н4

Антитело	BIN	Анализ иАПК (EC50 +/-STD; нМ)	Донор 1 (Макс. ИФН γ , пг/мл)	Донор 2 (Макс. ИФН γ , пг/мл)	Донор 3 (Макс. ИФН γ , пг/мл)	Донор 4 (Макс. ИФН γ , пг/мл)
20496	Другой	PF	185,88	ND	ND	ND
20500	3	0,84 +/- 0,35	821	273,83	117,9	4027,1
20501	3	0,79 +/- 0,18	849,6	310	135,6	4493,1
20502,1	3	0,79 +/- 0,03	937	303,9	174,02	4269,7
20506	3	1,25 +/- 0,26	980,8	258,8	86,1	2301,8
20513	3	1,16 +/- 0,16	658,8	240,3	91,1	1634,5
20516	3	PF	ND	441,1	ND	ND
22213	3	1,79 +/- 1,83	ND	ND	ND	ND

Пример 8. Генерация афукозилированных и фукозилированных моноклональных антител.

Антитела с Fc участками, имеющими пониженное содержание фукозы в гликановых фрагментах, могут проявлять более высокую активность АЗКЦ по сравнению с полностью фукозилированным антителом (Niwa R et al., *Clinical Cancer Research*, 11(6):2327-36 (2005)). Антитела В7-Н4 генерировались в клетках CHO-х (Yamane-Ohnuki N. et al., *Biotechnology and Bioengineering*, 87(5):614-22 (2004)), чтобы продуцировать нормально фукозилированные антитела и в клеточной линии CHO, разработанной для продуцирования афукозилированных антител (клетки CHO-y) (id.).

Пример 9. Характеризация связывания афукозилированных и фукозилированных моноклональных антител.

Фукозилированные и афукозилированные анти-В7-Н4 антитела характеризовали SPR, следуя протоколу, как описано в примере 4. Антитела демонстрировали сходное связывание с белком В7-Н4 человека и, таким образом, гликозилирование не влияло на связывание (табл. 17).

Таблица 17

Связывание афукозилированных и фукозилированных антител

Антигено	ВН		В7-Н4 человека			SK-BR-3 (EC50; нМ)	293-супоВ 7-Н4 (EC50; нМ)	293-мышь В7-Н4 (EC50; нМ)	293-крыса В7-Н4 (EC50; нМ)
			K _D (М)	k _{on} (1/Мс)	k _{off} (1/с)				
20502	3	Фукозилированный	2,58 E-09	4,28E+05	1,10 E-03	0,571	3,291	4,371	2,486
20502	3	Афукозилированный	2,74 E-09	4,19E+05	1,15 E-03	0,483	2,923	1,655	2,446
20506	3	Фукозилированный	1,93 E-09	3,65E+05	7,03 E-04	0,739	1,770	1,77	3,249
20506	3	Афукозилированный	2,01 E-09	3,60E+05	7,25 E-04	0,767	1,769	1,769	PF
22213	3	Фукозилированный	5,81 E-09	1,53E+05	8,88 E-04	0,651	5,199	2,445	4,401
22213	3	Афукозилированный	5,11 E-09	1,69E+05	8,62 E-04	0,667	3,878	2,453	3,545

Фукозилированные и афукозилированные анти-В7-Н4 антитела также характеризовали проточной цитометрией. В этих экспериментах клеточные линии НЕК293Т трансфицировали для экспрессии полноразмерного В7-Н4 человека, яванского макака, мыши или крысы. Кроме того, эндогенные человеческие В7-Н4-экспрессирующие клеточные линии рака молочной железы SK-BR-3 использовали для оценки эффективности связывания клеток антителами В7-Н4. 1×10^5 клеток SK-BR-3 или клеток 293, трансфицированных для экспрессии полноразмерного В7-Н4 человека, яванского макака, мыши или крысы, инкубировали с титрующими дозами антител В7-Н4. После инкубации клетки осаждали, промывали, инкубировали со вторичным меченым антителом и запускали на проточном цитометре. Данные были проанализированы с использованием программного обеспечения FlowJo. MFI наносили на график в зависимости от концентрации антитела, и активность связывания клеток EC50 рассчитывали с использованием подгонки кривой нелинейной регрессии (GraphPad Prism).

Антитела В7-Н4 продемонстрировали сильное дозозависимое связывание с клетками SK-BR-3, эндогенно экспрессирующими В7-Н4 на клеточной поверхности или 293 клеточными линиями, трансфицированными для экспрессии В7-Н4 яванского макака, мыши или крысы на клеточной поверхности. На эффективность связывания и перекрестную реактивность видов не влияло то, было ли антитело фукозилированным или афукозилированным (фиг. 4А-4D, табл. 17).

Пример 10. Связывание афукозилированных и фукозилированных моноклональных антител с аллелем V158 рецептора IIIa (FcγRIIIa) Fcγ человека.

Антитело 20502 продуцировали как фукозилированное (Ат-F), так и афукозилированное (Ат-А) и тестировали на аффинность связывания Fc участка с FcγRIIIa (V158) с помощью поверхностного плазмонного резонанса (SPR). Вкратце белок А был ковалентно присоединен к декстрановому чипу с использованием набора для сочетания амина с 100 мМ этилендиаминном в 100 мМ буфера борнокислого натрия, pH 8,0 в качестве блокирующего реагента. Ат-А или Ат-F собирали при 2 плотностях в отдельных проточных кюветах, и дериватизированный поток белка А служил в качестве эталонного контроля. Fc-гамма RIIIa (V158) разбавляли в рабочем буфере HBS-P+ и вводили в 6 концентрациях (0, 1,37, 12,3, 37, 111, 333 и 1000 нМ) в двух повторностях. Константу ассоциации, константу диссоциации и аффинность для связывания Ат-А рассчитывали с использованием модели связывания 1:1 программного обеспечения для оценки Biacore T200. Константу аффинности для связывания Ат-А и Ат-F определяли с использованием модели аффинного состояния программного обеспечения для оценки Biacore T200. Афукозилированное антитело В7-Н4 (Ат-А) имеет в 140 раз более высокую аффинность к Fc-гамма-рецептору IIIa (V158), чем то же самое антитело с фукозилированным Fc (Ат-F) (фиг. 5А и 5В, табл. 18).

Таблица 18

Связывание аллеля V158 Fc γ рецептора IIIa (Fc γ RIIIa)

	ka (1/Mc)	kd (1/c)	K _D (нМ)
At-A	6,46E+05	9,54E-10	15
At-F	N/A	N/A	210

Пример 11. Активность блокады Т-клеточной контрольной точки афукозилированных и фукозилированных моноклональных антител.

Первичные человеческие Т-клетки были обогащены из МКПК с использованием набора для обогащения человеческих Т-клеток EasySep™ в соответствии с инструкциями производителя. Обогащенные Т-клетки инкубировали при 2×10^5 клеток/мл с анти-CD3/анти-CD28 Dynabeads, в соотношении один шарик на клетку, при 37°C. Через шесть дней шарики магнитно удаляли, а Т-клетки промывали и инкубировали при 1×10^6 клеток/мл с 10 ед/мл ИЛ-2 при 37°C. Через четыре дня Т-клетки промывали и инкубировали при 1×10^6 клеток/мл вместе с искусственными антигенпрезентирующими клетками (иАПК) при концентрации 2×10^6 клеток/мл при 37°C в присутствии титрования дозы антитела В7-Н4. иАПК обрабатывали митомицином С 1 ч при 37°C, а затем тщательно промыты перед добавлением к совместной культуре Т-клеток. Через 72 ч после совместного культивирования Т-клеток, иАПК и антител к В7-Н4 планшеты центрифугировали, и супернатанты собирали и оценивали на продуцирование ИФН γ с помощью ИФА. Продукцию ИФН γ наносили на график в зависимости от концентрации антитела, и эффективность EC50 рассчитывали с использованием подгонки кривой нелинейной регрессии (GraphPad Prism).

Антитела В7-Н4 продемонстрировали сильную активность блокады Т-клеточной контрольной точки, что измерялось по увеличению продукции ИФН γ . Более того, не было очевидной разницы в эффективности между афукозилированными и фукозилированными антителами (фиг. 6А, табл. 19).

Таблица 19

Активность блокады контрольных точек Т-клеток

Антитело	BIN	Анализ иАПК (EC50 +/- STD; нМ)	
		Афукозилированный	Фукозилированный
20502	3	0,89 +/-0,44	0,74 +/-0,39
20506	3	1,05 +/-0,28	0,95 +/-0,46
22213	3	0,16 +/-0,05	0,17 +/-0,08

Затем первичные Т-клетки человека были обогащены донорскими МКПК HLA-A2+ с использованием набора для выделения Pan Т-клеток человека, следуя инструкциям производителя. Экспрессирующие TCR MART-I Т-клетки генерировали, сначала активируя 5×10^6 обогащенных Pan Т-клеток $1,5 \times 10^7$ анти-CD3/анти-CD28 Dynabeads, 100 нг/мл ИЛ-2 и 15 нг/мл ИЛ-7 в течение 48 ч. Затем 5×10^6 активированных Т-клеток трансдуцировали лентивирусными частицами MART-I TCR в присутствии 200 нг/мл ИЛ-2, 30 нг/мл ИЛ-7 и 10 мкг/мл полибреана. Через 24 ч после трансдукции Т-клетки MART-I TCR+ Pan размножали в течение 15-дневного периода в присутствии 33,3 нг/мл ИЛ-2 и 5 нг/мл ИЛ-7. Для создания линий клеток-мишеней, экспрессирующих HLA-A2, эндогенные линии клеток рака молочной железы человека, экспрессирующих В7-Н4, MDA-MB-468 и SK-BR-3, трансдуцировали лентивирусными частицами HLA-A2 в течение 48 ч. Кроме того, В7-Н4 был нокаутирован из клеточной линии HLA-A2+ SK-BR-3. Т-клетки MART-I TCR+ Pan совместно культивировали в присутствии различных линий клеток-мишеней при соотношении Е:Т 1:1, 500 мкг/мл пептида MART-I и 67 нМ В7-Н4 антитела 20502 (афукозилированного) или изотипического контроля человека. Через 24 ч после совместной инкубации планшеты центрифугировали и супернатанты собирали и оценивали на продуцирование ИЛ-2 AlphaLISA в соответствии с инструкциями производителя. Как продемонстрировано на фиг. 6В, В7-Н4 продемонстрировал активность лиганда Т-клеточной контрольной точки в этом анализе, когда он эндогенно экспрессируется на физиологических уровнях, поскольку продуцирование ИЛ-2 было уменьшено в лунках, содержащих клетки SK-BR-3 В7-Н4+, относительно SK-BR-3 KO клеток. Кроме того, антитело В7-Н4 также продемонстрировало активность блокады Т-клеточной контрольной точки, измеренную по увеличению продукции ИЛ-2 по сравнению с клетками, обработанными изотипическим контролем (фиг. 6В). Таким образом, эти данные подтверждают активность блокады Т-клеточной контрольной точки антитела В7-Н4 20502 (афукозилированный) и показывают, что В7-Н4 антитела 20502 обеспечивает активность блокады Т-клеточной контрольной точки в клетках, которые эндогенно экспрессируют В7-Н4.

Пример 12. Афукозилированные и фукозилированные моноклональные антитела с активностью АЗКЦ.

Антитела В7-Н4 оценивали на активность АЗКЦ против линии клеток-мишеней, экспрессирующих В7-Н4. В частности, первичные клетки МКПК человека активировали цитокином при 1×10^6 клеток/мл с

200 ед/мл ИЛ-2 при 37°C. На следующий день клетки промывали и инкубировали при соотношении эффектор:мишень 40:1 с клетками-мишенями SK-BR-3, которые были помечены кальцеин-АМ. Через 4 ч после инкубации лизис клеток-мишеней определяли количественно с помощью флуориметра. Образец, обработанный Тритон/Х, служил в качестве контрольного образца с максимальным лизисом, тогда как образец, обработанный только средой, служил в качестве контрольного образца с фоновым лизисом. Процент (%) удельного лизиса рассчитывали следующим образом:

$$[1 - ((\text{образец-контроль среды}) / (\text{максимальный лизис-контроль среды}))] \times 100$$

Процент (%) специфического лизиса наносили на график в зависимости от концентрации антитела, и эффективность EC50 рассчитывали с использованием подгонки кривой нелинейной регрессии (GraphPad Prism).

Антитела В7-Н4 продемонстрировали сильную дозозависимую активность АЗКЦ против эндогенной экспрессирующей В7-Н4 линии клеток молочной железы SK-BR-3. Кроме того, афукозилированные антитела продемонстрировали значительно более высокую активность АЗКЦ по сравнению с фукозилированными антителами (фиг. 7, табл. 20).

Таблица 20

Активность АЗКЦ

Антитело	BIN	Анализ АЗКЦ (EC50 +/- STD; нМ)	
		Афукозилированный	Фукозилированный
20502	3	0,0007 +/- 1,1x10E-3	0,0370 +/- 6,2E-2
20506	3	0,0015 +/- 2,5x10E-3	0,0135 +/- 2,1E-2
22213	3	0,0015	0,014

Пример 13. Корреляция активности АЗКЦ с плотностью рецептора.

Плотность В7-Н4 количественно определялась на поверхности клеток SK-BR-3, HCC1569, ZR-75-1, MDA-MB-48 и HCC1964 с помощью FACS в соответствии со спецификациями производителя. В частности, 1×10^5 клеток инкубировали с 15 мкг/мл антитела В7-Н4 на льду в течение 25 мин. Параллельно одну каплю микросфер Quantum™ Simply Cellular (QSC) (предварительно покрытых увеличивающимися концентрациями анти-мышинного антитела захвата IgG) также инкубировали с 15 мкг/мл антитела В7-Н4 на льду в течение 25 мин. После инкубации клетки и микросферы QSC осаждали и промывали, а образцы собирали на проточном цитометре. Данные были проанализированы с использованием программного обеспечения FlowJo. Средняя интенсивность флуоресценции (MFI) была рассчитана и введена в электронную таблицу QuickCal®. Регрессия, связывающая значение флуоресцентного канала каждого шарика с его предварительно назначенным значением емкости связывания антител (ABC), будет рассчитана автоматически. Значение ABC было назначено после добавления значений MFI для помеченных ячеек в шаблон).

Антитела В7-Н4 оценивали на активность АЗКЦ против линий клеток-мишеней, экспрессирующих В7-Н4, с различными уровнями плотности В7-Н4 поверхности клеток. В частности, 1×10^4 клеток-мишеней SK-BR-3, HCC1569, ZR-75-1, MDA-MB-468 или HCC1964 совместно инкубировали с титрованием дозы антитела В7-Н4 при 4°C. Через 25 мин размораживали одноразовый флакон репортерных клеток Jurkat-huCD16 от Promega, и $7,5 \times 10^4$ клеток добавляли к смеси клеток-мишеней/антитела В7-Н4 и инкубировали при 37°C. Через 24 ч образцы доводили до комнатной температуры (КТ) и инкубировали с буфером Bio-Glo. Субстрат и люминесценцию количественно определяли на считывающем устройстве для меток EnVision. Данные наносили на график в зависимости от концентрации антитела, и эффективность EC50 рассчитывали с использованием подгонки кривой нелинейной регрессии (GraphPad Prism).

Активность АЗКЦ антител В7-Н4 зависела от плотности поверхности клеток В7-Н4: по мере того, как количество молекул клеточной поверхности уменьшалось, величина максимальной активности АЗКЦ также уменьшалась. Кроме того, афукозилированные антитела продемонстрировали улучшенную активность АЗКЦ по сравнению с фукозилированными антителами, особенно в отношении клеток-мишеней с более низкими уровнями плотности клеточной поверхности В7-Н4 (фиг. 8).

Пример 14. In vivo противоопухолевая эффективность.

Семинедельные самки мышей BALB/c были приобретены в Charles River Laboratories (Холлистер, Калифорния) и были акклиматизированы в течение не более трех недель до начала исследований. Клеточная линия мышинной колоректальной карциномы CT26 была разработана для экспрессии химерного белка, состоящего из внеклеточного домена мышинного В7-Н4 с трансмембранным доменом мышинного В7Н3. Эти опухолевые клетки имплантировали подкожно на правый бок мышей при $1,0 \times 10^6$ клеток/200 мкл/мышь. Перед инокуляцией клетки культивировали не более трех пассажей в среде RPMI 1640, дополненной 10% инактивированной нагреванием фетальной бычьей сывороткой (FBS), 2 мМ L-глутамином. Клетки выращивали при 37°C в увлажненной атмосфере с 5% CO₂. По достижении 80-85% слияния клетки собирали и ресуспендировали в смеси 1:1 бессывороточной RPMI 1640 и Matrigel при 5×10^6 клеток на миллилитр). Мышей контролировали дважды в неделю после имплантации клеток на предмет роста опухоли.

Для измерения опухоли длину и ширину каждой опухоли измеряли с помощью штангенциркуля и объем рассчитывали по формуле

$$\text{Объем опухоли (мм}^3\text{)} = (\text{ширина (мм)} \times \text{длина (мм)}^2) / 2$$

В день начала лечения измеряли все опухоли, исключали выбросы и мышей случайным образом распределяли по группам лечения. Для лечения анти-B7-H4, использованные антитела включают 20502 (фиг. 9А) и 22213 (фиг. 9В). В качестве контроля мышам вводили поликлональный IgG человека (Bio X Cell, BE0092) или IgG2a мыши (Bio X Cell, BE0085). Антитела вводили четыре раза посредством внутривенной (в/в) инъекции два раза в неделю, начиная с 4 или 5 дня после инокуляции. Опухоли продолжали измерять, по меньшей мере, два раза в неделю, пока объем опухоли не превысил 10% массы животного или приблизительно 2000 мм³. Изменение размера опухоли показано на графике отдельных опухолей относительно дня, в который животные были инокулированы клетками СТ26. Р-значения рассчитывали с использованием непарного двустороннего t-критерия анализа рассчитанных объемов опухоли в каждый день исследования. Обработка 20502 или 22213 значительно снижала рост опухоли по сравнению с контролем IgG человека (p<0,05) при введении между дозами 10-20 мг/кг (фиг. 9А и 9В).

Подобные эксперименты были выполнены с использованием мышей с имплантированными клетками 4Т1 (клеточная линия карциномы молочной железы мыши) или В16 (клеточная линия меланомы мыши). Этим мышам вводили 20 мг/кг суррогата мыши 20502, называемого 20502-msIgG2a-F, который содержит вариабельный участок 20502, слитый с фукозилированным мышинным IgG2a, или с мышинным контрольным антителом IgG. Обработка 20502-msIgG2a-F значительно снижала рост опухоли по сравнению с контролем IgG мыши как в модели рака молочной железы 4Т1, так и в модели меланомы В16 (фиг. 10).

Дополнительные эксперименты также проводили с использованием афукозилированного 20502 на модели ксенотрансплантата рака молочной железы человека МХ-1. Самки мышей NSG (NOD-scid, ИЛ2R gammanull) были приобретены в лаборатории Джексона (Бар-Харбор, Мэн-Айленд) и акклиматизированы в течение одной недели до начала исследований. Ранее было показано, что клеточная линия рака молочной железы человека МХ-1 эндогенно экспрессирует белок В7Н4 на клеточной поверхности. Эти опухолевые клетки имплантировали подкожно над правым боком мышей при 1,0×10⁶ клеток/100 мкл/мышь в смеси 1:1 бессывороточного RPMI1640 и Matrigel при 5×10⁶ клеток на миллилитр.

Мышей контролировали дважды в неделю после имплантации клеток на предмет роста опухоли. Для измерения опухоли длину и ширину каждой опухоли измеряли с помощью штангенциркуля, и объем рассчитывали по формуле

$$\text{Объем опухоли (мм}^3\text{)} = (\text{ширина (мм)} \times \text{длина (мм)}^2) / 2$$

На 7-й день после инокуляции были измерены все опухоли, выбросы были исключены, и мыши были случайным образом распределены по группам лечения. Всем животным вводили ДНК-конструкцию, которая индуцировала конститутивную экспрессию ИЛ-15 человека в кровотоке до конца исследования. В день 9 половина мышей получала внутривенную (в/в) инъекцию 20×10⁶ моноцитарных клеток периферической крови человека (МКПК), полученных от StemCell Technologies (Таквила, Вашингтон). Начиная с 11-го дня мышам вводили афукозилированное 20502 (20 мг/кг) или физиологический раствор в качестве негативного контроля. Терапевтическое средство вводили четыре раза посредством внутривенной (в/в) инъекции два раза в неделю. Опухоли продолжали измерять по меньшей мере два раза в неделю, пока объем опухоли не превысил 10% веса животного или пока животные не продемонстрировали потерю исходной массы тела на 15% или более. Р-значения рассчитывали с использованием одностороннего ANOVA, сравнивая средние объемы опухолей во всех группах лечения на 28-й день. Как показано на фиг. 11, лечение афукозилированным 20502 значительно снижало рост опухоли по сравнению с физиологическим контролем (p<0,05) только при введении мышам, которым ранее вводили МКПК человека.

Пример 15. Противоопухолевая эффективность in vivo в сочетании с анти-PD-1 антителом.

Способы.

Восьминедельные самки мышей BALB/c были приобретены в Charles River Laboratories (Холлистер, Калифорния) и были акклиматизированы в течение не более двух недель до начала исследования. Клеточная линия карциномы молочной железы мыши 4Т1 была сконструирована для экспрессии химерного белка, содержащего внеклеточный домен мышинового В7-Н4 и трансмембранный домен мышинового В7Н3. Опухолевые клетки имплантировали ортотопически в жировую подушку молочной железы мышей при 0,5×10⁵ клеток/50 мкл/мышь. Перед инокуляцией клетки культивировали не более трех пассажей в среде RPMI 1640, дополненной 10% инактивированной нагреванием фетальной бычьей сывороткой (FBS). Клетки выращивали при 37°C в увлажненной атмосфере с 5% CO₂. По достижении слияния 80-85% клетки собирали и ресуспендировали в бессывороточной RPMI 1640 на вентральном боку каждой мыши в жировую подушку молочных желез. Мышей контролировали дважды в неделю после имплантации клеток на предмет роста опухоли. Длину и ширину каждой опухоли измеряли с помощью штангенциркуля, а объем рассчитывали по формуле

$$\text{Объем опухоли (мм}^3\text{)} = (\text{ширина (мм)} \times \text{длина (мм)}^2) / 2$$

В день начала лечения измеряли все опухоли, исключали выбросы и мышей случайным образом распределяли по группам лечения. Для лечения анти-B7-Н4, использовали мышинный суррогат 20502,

называемый 20502-msIgG2a-F, который содержит вариабельный участок 20502, слитый с фукозилированным IgG2a мыши. В качестве контроля мышам вводили msIgG2a (анти-HEL). 20502-msIgG2a-F или msIgG2a вводили четыре раза посредством внутривенной (в/в) инъекции два раза в неделю, начиная с 11-го дня после инокуляции. Анти-PD-1 (модифицированная версия RMP1-14 (Bio X Cell), содержащая Fc молчащего домена msIgG2a) вводили три раза посредством внутрибрюшинной (в/б) инъекции два раза в неделю, начиная с 11 дня после инокуляции. Опухоли продолжали измерять, по меньшей мере, два раза в неделю, пока объем опухоли не превысил 10% массы животного или приблизительно 2000 мм³.

Результаты.

Изменение размера опухоли, изменение среднего объема опухоли и процент выживания показаны на фиг. 12A, 12B и 12C соответственно. Лечение с 20502-msIgG2a-F или анти-PD-1 значительно снижало рост опухоли по сравнению с контролем msIgG2a ($p < 0,05$). Совместное введение 20502-msIgG2a-F и анти-PD-1 значительно усиливало ингибирование роста опухоли по сравнению с любой монотерапией ($p < 0,05$). Кроме того, комбинированная терапия привела к полной регрессии опухоли у 5 из 12 мышей. P-значения рассчитывали с использованием одностороннего анализа ANOVA рассчитанных объемов опухоли в каждый день исследования с множественными сравнениями между каждой группой.

Пример 16. Анти-B7-H4 антитело усиливает инфильтрацию НК-клеток и Т-клеток и повышает уровень PD-L1.

Восьминедельные самки мышей BALB/c были приобретены в Charles River Laboratories (Холлистер, Калифорния) и имплантированы ортотопически в жировую подушку молочных желез мышей клетками 4T1+moB7-H4/H3 в количестве $0,5 \times 10^5$ клеток/50 мкл/мышь. В день начала лечения измеряли все опухоли, исключали выбросы и мышей случайным образом распределяли по группам лечения. Мышам вводили huIgG1 (анти-HEL) или афукозилированное 20502 в дозе 20 мг/кг посредством внутривенной (в/в) инъекции дважды (день 11 и день 14 после инокуляции).

Через 24 ч после введения второй дозы мышей умерщвляли и перфузировали физиологическим раствором с фосфатным буфером (ФСБ). Затем опухоли экстрагировали, фиксировали в 10% формалине в течение 5 ч, промывали в ФСБ и помещали в 30%-ный раствор сахарозы как минимум на 24 ч. Опухоли были погружены в Tissue-Tek® O.C.T. Соединены и порезаны при 20 мкм в камере при -15°C (криостат). Срезы с тканями промывали в 0,3% Тритоне в ФСБ, блокировали 5% нормальной козьей сывороткой и окрашивали первичным антителом (анти-NKp46, анти-CD3 или анти-PD-L1; 1:500) в течение ночи. Два последовательных среза от каждой опухоли окрашивали. После инкубации в течение ночи предметные стекла промывали в 0,3% Тритоне, затем инкубировали со вторичным антителом (1:400) в течение 3 ч в темной влажной камере и промывали. Затем ткань фиксировали в 1% параформальдегиде и промывали в ФСБ. Покровные стекла были фиксированы с использованием Vectashield® с DAPI, запечатаны Cyto-seal™ и оставлены для сушки в темной камере. Изображения были получены вручную с помощью флуоресцентного микроскопа и камеры. Как показано на фиг. 13, обработка афукозилированными 20502 привела к увеличению числа клеток натуральных киллеров (НК) (по данным антитела против NKp46) и увеличению CD3+ Т-клеток на краях опухоли с умеренным увеличением CD3+ Т-клеток в ядре опухоли. Повышенная экспрессия PD-L1 также наблюдалась.

Пример 17. Анти-B7-H4 антитело значительно снижает рост опухоли *in vivo* в моделях 4T1 и B16-moB7-H4/H3 в зависимости от дозы.

Самки мышей BALB/c или C57B1/6 в возрасте от шести до восьми недель были приобретены в Charles River Laboratories (Холлистер, Калифорния) и были акклиматизированы в течение не более трех недель до начала исследований. Клеточная линия карциномы молочной железы мыши 4T1 и клеточная линия меланомы B16-F10 были сконструированы для экспрессии химерного белка мыши, состоящего из внеклеточного домена мышинового B7-H4, с трансмембранным доменом мышинового B7-H3. Эти опухолевые клетки имплантировали ортотопически в жировую подушку молочной железы при $0,05 \times 10^6$ клеток/50 мкл/мышь для 4T1+moB7-H4/H3 или подкожно над правым боком мышей при $0,5 \times 10^6$ клеток/100 мкл/мышь для B16+moB7-H4/H3. Перед инокуляцией клетки культивировали не более трех пассажей в среде RPMI-1640 или DMEM, дополненной 10% инактивированной нагреванием фетальной бычьей сывороткой (FBS) и 2 mM L-глутамином. Клетки выращивали при 37°C в увлажненной атмосфере с 5% CO₂. Мышей контролировали дважды в неделю после имплантации клеток на предмет роста опухоли. Для измерения опухоли длину и ширину каждой опухоли измеряли с помощью штангенциркуля, и объем рассчитывали по формуле

$$\text{Объем опухоли (мм}^3\text{)} = (\text{ширина (мм)} \times \text{длина (мм)}^2) / 2$$

В день начала лечения измеряли все опухоли, исключали выбросы и мышей случайным образом распределяли по группам лечения. Мышам вводили антитело 20502-msIgG2a-F (анти-B7-H4, msIgG2a, фукозилированное (также называемое "cmFPA150-F") или контрольное антитело IgG2a мыши четыре раза с помощью внутривенной (в/в) инъекции два раза в неделю, начиная с дня 11 (4T1+moB7-H4/H3) или дня 6 (B16+moB7-H4/H3) после инокуляции, за исключением группы 20 мг/кг, которой вводили непрерывно два раза в неделю до конца исследования.

Опухоли продолжали измерять, по меньшей мере, два раза в неделю, пока объем опухоли не превысил 10% массы животного или приблизительно 2000 мм³. Изменение размера опухоли показано на графике

среднего объема опухоли относительно дня, когда животные были привиты. Лечение с 20502-msIgG2a-F значительно снижало рост опухоли по сравнению с контролем IgG2a мыши ($p < 0,05$) при введении в дозах 1 мг/кг или выше на модели 4T1+moB7-H4/H3 (см. фиг. 14A и 14B) и в дозах 3 мг/кг или более в модели B16+moB7-H4/H3 (фиг. 15A и 15B). Статистическую значимость рассчитывали с использованием одностороннего ANOVA, сравнивая все группы лечения с msIgG2a. Фиг. 14A и 14B демонстрируют, что антитело 20502-msIgG2a-F значительно снижает рост 4T1, экспрессирующего B7-H4/H3. Мышей BALB/c инокулировали ортотопически клетками карциномы молочной железы 4T1, сконструированными для экспрессии ECD мышинных B7-H4, слитых с B7-H3 ТМ. Мышам вводили антитело 20502-msIgG2a-F (анти-B7-H4, msIgG2a, фукозилированное) дважды в неделю, начиная с 11-го дня после инокуляции. Антитело 20502-msIgG2a-F продемонстрировало дозозависимое снижение роста опухоли со значительным ингибированием роста опухоли при 30 мг/кг ($p=0,0003$), 20 мг/кг ($p=0,0103$), 10 мг/кг ($p=0,0419$), 3 мг/кг ($p=0,0277$) и 1 мг/кг ($p=0,0333$) по оценке OneWay ANOVA на 30-й день.

Фиг. 15A и 15B демонстрируют, что антитело 20502-msIgG2a-F значительно снижает рост B16, экспрессирующего B7-H4/H3. Мышей C57B1/6 инокулировали подкожно клетками меланомы B16-F10, сконструированными для экспрессии ECD мышинных B7-H4, слитых с B7-H3 ТМ. Мышам вводили антитело 20502-msIgG2a-F (анти-B7-H4, msIgG2a, фукозилированное) дважды в неделю, начиная с 6-го дня после инокуляции. Антитело 20502-msIgG2a-F продемонстрировало дозозависимое снижение роста опухоли (фиг. 15A) со значительным ингибированием роста опухоли при 30 мг/кг ($p=0,0085$), 20 мг/кг ($p=0,0041$), 10 мг/кг ($p=0,0017$) и 3 мг/кг ($p=0,0420$) по оценке OneWay ANOVA на 23-й день (фиг. 15B).

Таким образом, антитело 20502-msIgG2a-F значительно уменьшало размер опухоли дозозависимым образом в двух разных моделях рака. Эти данные в клеточных линиях карциномы молочной железы и меланомы указывают на то, что антитело 20502-msIgG2a-F можно использовать для лечения больных раком.

Таблицы последовательности.

Последовательности антител GITR

SEQ ID NO	Последовательность
411	SGSVFSIDAM
412	LSGISSAK
413	YADVSTGWGRDAHGYW
414	EVQLLESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSVFSIDAMGWYRQAPGKQREL VAVLSGISSAKYAASAPGRFTISRDNKNTVYVYLMSSSLRAEDTAVYYC YADVSTGWGRDAHGYWGQGLVTV
415	EVQLLESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSVFSIDAMGWYRQAPGKQREL VAVLSGISSAKYAASAPGRFTISRDNKNTVYVYLMSSSLRAEDTAVYYC YADVSTGWGRDAHGYWGQGLVTVKPGGGGGSEVQLLESGGGEVQPG GGSLRLSCAASGSVFSIDAMGWYRQAPGKQREL VAVLSGISSAKYAAS APGRFTISRDNKNTVYVYLMSSSLRAEDTAVYYCYADVSTGWGRDAHG YWGQGLVTVKPGGGGDKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLM ISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTP VLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCVMHEALHNHYTQKLSLSL SPGK
416	EPKSSDKTHTCPPC
417	DKTHTCPPC
418	ESKYGPPCPPC
419	GGSGGS
420	GGSGGSGGS

421	GGSGGSGGSGGS
422	GGSGGSGGSGGSGGS
423	GGGG
424	GGGGG
425	GGGGGG

CD80 последовательности

SEQ ID NO	Последовательность
426	VIHVTKEVKEVATLSCGHNVSVVEELAQTRIWQKEKKMVLTMMSG DMNIWPEYKNRTIFDITNLSIVILALRPSDEGTYESVVLKYEKDAFK REHLAEVTLVKADFPTPSISDFEIPSTNIRRIICSTSGGFPEPHLSWLE NGEELNAINTTVSQDPETELYAVSSKLDNFMTTNHSMCLIKYGHLR VNQTFNWNTTKQEHFPDN
427	VIHVTKEVKEVATLSCGHNVSVVEELAQTRIWQKEKKMVLTMMSG DMNIWPEYKNRTIFDITNLSIVILALRPSDEGTYESVVLKYEKDAFK REHLAEVTLVKADFPTPSISDFEIPSTNIRRIICSTSGGFPEPHLSWLE NGEELNAINTTVSQDPETELYAVSSKLDNFMTTNHSMCLIKYGHLR VNQTFNWNTTKQEHFPDNEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT ISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGK
428	VIHVTKEVKEVATLSCGHNVSVVEELAQTRIWQKEKKMVLTMMSG DMNIWPEYKNRTIFDITNLSIVILALRPSDEGTYESVVLKYEKDAFK REHLAEVTLVKADFPTPSISDFEIPSTNIRRIICSTSGGFPEPHLSWLE NGEELNAINTTVSQDPETELYAVSSKLDNFMTTNHSMCLIKYGHLR VNQTFNWNTTKQEHFPDNEPKSSDKTHTCPPCPAPEFEGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPASIEKT ISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGK

CSFR1 последовательности

SEQ ID NO	Последовательность
429	QVQLVQSGAE VKKPGSSVKV SCKASGYTFT DNYMIWVRQA PGQGLEWMGD INPYNGGTTF NQKFKGRVTI TADKSTSTAY MELSSLRSED TAVYYCARES PYFSNLYVMD YWGQGLTVTV SS
430	EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCKASQSVD YDGDNYMNWY QQKPGQAPRL LIYAASNLES GIPARFSGSG SGTDFTLTIS SLEPEDFAVY YCHLSNEDLS TFGGGTKVEI K
431	GYTFTDNYMI
432	DINPYNGGTT FNQKFKG
433	ESPYFSNLYV MDY
434	KASQSVDYDG DNYMN
435	AASNLES
436	HLSNEDLST
437	QVQLVQSGAE VKKPGSSVKV SCKASGYTFT DNYMIWVRQA PGQGLEWMGD INPYNGGTTF NQKFKGRVTI TADKSTSTAY MELSSLRSED TAVYYCARES PYFSNLYVMD YWGQGLTVTV SSASTKGPSV FPLAPCSRST SESTAALGCL VKDYFPEPVT VSWNSGALTS GVHTFPAVLQ SSGLYSLSSV VIVPSSSLGT KTYTCNVDHK PSNTKVDKRV ESKYGPPCPP CPAPEFLGGP SVFLFPPKPK DTLMISRTPE VTCVVVDVSQ EDPEVQFNWY VDGVEVHNAK TKPREEQFNS TYRVVSVLTV LHQDWLNGKE YKCKVSNKGL PSSIEKTISK AKGQPREPQV YTLPPSQEEM TKNQVSLTCL VKGFYPSDIA VEWESNGQPE NNYKTTTPVL DSDGSFFLYS RLTVDKSRWQ EGNVFSQSVV HEALHNHYTQ KSLSLSLGK
438	EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCKASQSVD YDGDNYMNWY QQKPGQAPRL LIYAASNLES GIPARFSGSG SGTDFTLTIS SLEPEDFAVY YCHLSNEDLS TFGGGTKVEI KRTVAAPSVF IFPPSDEQLK SGTASVCLL NNFYPRKAV QWKVDNALQS GNSQESVTEQ DSKDSTYSLV STLTLKADY EKHKVYACEV THQGLSPVTKSFNRGEC

Последовательности антител PD-1 (ниволумаб)

SEQ ID NO:	Описание	Последовательность
440	вариабельный участок тяжелой цепи	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLDCKASGITFSNSGMHWVRQ APGKGLEWVAVIWYDGSKRYYADSVKGRFTISRDNKNT LFLQMNSLRAEDTAVYYCATNDDYWGQGLTVTVSS
441	константный участок тяжелой цепи	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYT CNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCAPEFLGGPSVFL FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDPEVQFNWYVDG
		VEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDS DGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQK SLSLSLQK
442	вариабельный участок легкой цепи	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQKPG QAPRLLIYDASNRTGIPARFSGSGSGTDFTLTISLEPEDF AVYYCQSSNWPRTFGQGTKVEIK
443	константный участок легкой цепи	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCCLNNFYPREAKVQ WKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYE KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
444	тяжелый FR1	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLDCKASGITFS
445	тяжелый CDR1	NSGMH
446	тяжелый FR2	WVRQAPGKGLEWVA
447	тяжелый CDR2	VIWYDGSKRYYADSVKG
448	тяжелый FR3	RFTISRDNKNTLFLQMNSLRAEDTAVYYCAT
449	тяжелый CDR3	NDDY
450	тяжелый FR4	WGQGLTVTVSS
451	легкий FR1	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSC
452	легкий CDR1	RASQSVSSYLA
453	легкий FR2	WYQKPGQAPRLLIY
454	легкий CDR2	DASNRT
455	легкий FR3	GIPARFSGSGSGTDFTLTISLEPEDFAVYYC
456	легкий CDR3	QSSNWPRT
457	легкий FR4	FGQGTKVEIK

Изобретение не должно быть ограничено в объеме конкретными вариантами осуществления данного изобретения, описанными в данном изобретении. Действительно различные модификации изобретения в дополнение к описанным станут очевидными для специалистов в данной области техники из предшествующего описания и сопровождающих фигур. Такие модификации предназначены для попадания в объем прилагаемой формулы изобретения.

Все ссылки (например, публикации или патенты или патентные заявки), цитированные в данном документе, включены в данный 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 указана, включена посредством ссылки во всей своей полноте

для всех целей. Другие варианты осуществления данного изобретения находятся в пределах следующей формулы изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с B7-H4 человека, содержащие последовательности определяющие комплементарность участка (CDR) 1 переменного участка тяжелой цепи (VH), CDR2 VH, CDR3 VH и CDR1, CDR2, CDR3 переменного участка легкой цепи (VL), выбранные из группы, состоящей из

(a) SEQ ID NO: 458-463 соответственно; и

(b) SEQ ID NO: 35-40 соответственно.

2. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1, отличающиеся тем, что указанные антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат VH, содержащий аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 464 или 41.

3. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1 или 2, отличающиеся тем, что указанные антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат VL, содержащий аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 42.

4. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1, содержащие переменный участок тяжелой цепи и переменный участок легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности

(a) SEQ ID NO: 464 и 42 соответственно; или

(b) SEQ ID NO: 41 и 42 соответственно.

5. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-4, отличающиеся тем, что указанные антитело или антигенсвязывающий фрагмент дополнительно содержат константный участок тяжелой цепи.

6. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.5, отличающиеся тем, что константный участок тяжелой цепи выбран из группы, состоящей из константных участков тяжелой цепи иммуноглобулинов IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и IgA2.

7. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-6, отличающиеся тем, что указанные антитело или антигенсвязывающий фрагмент дополнительно содержат константный участок легкой цепи.

8. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.7, отличающиеся тем, что константный участок легкой цепи выбран из группы, состоящей из константных участков легкой цепи иммуноглобулинов человека IgGκ и IgGλ.

9. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-4, отличающиеся тем, что указанные антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержат тяжелую цепь и легкую цепь, содержащие аминокислотные последовательности

(a) SEQ ID NO: 469 и 44 соответственно; или

(b) SEQ ID NO: 43 и 44 соответственно.

10. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с B7-H4 человека, при этом указанные антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат CDR1 VH, CDR2 VH, CDR3 VH, CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL антитела, содержащего

(i) последовательность VH из SEQ ID NO: 464 и последовательность VL из SEQ ID NO: 42; или

(ii) последовательность VH из SEQ ID NO: 41 и последовательность VL из SEQ ID NO: 42.

11. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.10, отличающиеся тем, что CDR представляют собой CDR, определенные по Кабату, CDR, определенные по Хотиа, или CDR, определенные по AbM.

12. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1, 10 или 11, отличающиеся тем, что указанные антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляют собой антитело человека, мышинное, гуманизированное или химерное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент.

13. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-12, отличающиеся тем, что указанные антитело или его антигенсвязывающий фрагмент индуцируют пролиферацию T-клеток.

14. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-13, отличающиеся тем, что указанные антитело или его антигенсвязывающий фрагмент индуцируют пролиферацию CD4+ T-клеток.

15. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-14, отличающиеся тем, что указанные антитело или его антигенсвязывающий фрагмент индуцируют пролиферацию CD8+ T-клеток.

16. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-15, отличающиеся тем, что указанные антитело или его антигенсвязывающий фрагмент индуцируют продуцирование

интерферона-гамма (ИФН γ).

17. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-16, отличающиеся тем, что указанные антитело или его антигенсвязывающий фрагмент способны индуцировать антителозависимую клеточно-опосредованную цитотоксичность (АЗКЦ) в В7-Н4-экспрессирующей клетке.

18. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-17, отличающиеся тем, что указанные антитело или его антигенсвязывающий фрагмент ингибируют рост опухоли в модели мышины СТ26 колоректальной карциномы, мышины модели 4Т1 карциномы молочной железы или модели линии клеток меланомы В16, где В16-Ф10 клетки экспрессируют мышинный химерный белок, состоящий из внеклеточного домена мышинового В7-Н4 с трансмембранным доменом мышинового В7Н3.

19. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-18, отличающиеся тем, что указанные антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связываются с доменом IgV В7-Н4 человека.

20. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-19, отличающиеся тем, что указанные антитело или его антигенсвязывающий фрагмент являются афукозилированными.

21. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-20, дополнительно содержащее детектируемую метку.

22. Конъюгат выделенного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп.1-20 с токсином.

23. Конъюгат по п.22, отличающийся тем, что токсин является цитостатическим или цитотоксическим.

24. Конъюгат по п.22, отличающийся тем, что токсин является цитотоксическим.

25. Выделенный полинуклеотид, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую вариативный участок тяжелой цепи или тяжелую цепь антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп.1-21, причем указанная молекула нуклеиновой кислоты кодирует VH из SEQ ID NO: 41 или 464 или тяжелую цепь из SEQ ID NO: 43 или 469.

26. Выделенный полинуклеотид, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую вариативный участок легкой цепи или легкую цепь антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп.1-21, причем указанная молекула нуклеиновой кислоты кодирует VL из SEQ ID NO: 42 или легкую цепь из SEQ ID NO: 44.

27. Выделенный вектор экспрессии, содержащий полинуклеотид по любому из пп.25, 26.

28. Клетка-хозяин, содержащая полинуклеотид по п.25 или 26, вектор экспрессии по п.27 или первый вектор, содержащий полинуклеотид по п.25, и второй вектор, содержащий полинуклеотид по п.26.

29. Клетка-хозяин по п.28, отличающаяся тем, что указанная клетка-хозяин лишена функционального гена альфа-1,6-фукозилтрансферазы (FUT8).

30. Способ получения антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которые связываются с В7-Н4 человека, включающий культивирование клетки-хозяина по п.28 или 29, так что молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая вариативный участок тяжелой цепи антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп.1-21, и молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая вариативный участок легкой цепи антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп.1-21, экспрессируются и антитело или его антигенсвязывающий фрагмент продуцируются.

31. Фармацевтическая композиция, содержащая антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-21 или конъюгат по любому из пп.22-24 и фармацевтически приемлемый наполнитель.

32. Фармацевтическая композиция по п.31, отличающаяся тем, что фукозилирование не обнаруживается в композиции.

33. Фармацевтическая композиция по п.31 или 32, дополнительно содержащая анти-PD-1 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент.

34. Фармацевтическая композиция по п.33, отличающаяся тем, что анти-PD-1 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляют собой ниволумаб, пембролизумаб, АМР-514, камрелизумаб, тизелизумаб или спартализумаб.

35. Фармацевтическая композиция по п.31 или 32, дополнительно содержащая анти-PD-L1 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент.

36. Способ индукции пролиферации Т-клеток, включающий приведение в контакт Т-клетки с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом по любому из пп.1-21, конъюгатом по любому из пп.22-24 или фармацевтической композицией по любому из пп.31-35.

37. Способ по п.36, отличающийся тем, что Т-клетка представляет собой CD4+ Т-клетку или CD8+ Т-клетку.

38. Способ индукции продукции интерферона-гамма, включающий приведение в контакт CD4+ Т-клетки с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом по любому из пп.1-21, конъюгатом по любому из пп.22-24 или фармацевтической композицией по любому из пп.31-35.

39. Способ уничтожения клетки, экспрессирующей В7-Н4, включающий приведение в контакт указанной клетки с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом по любому из пп.1-21, конъюгатом по любому из пп.22-24 или фармацевтической композицией по любому из пп.31-35.

40. Способ по любому из пп.36-39, дополнительно включающий приведение в контакт Т-клетки, CD4+ Т-клетки, CD8+ Т-клетки, клетки или популяции клеток с анти-PD-1 или анти-PD-L1 антителом или его антигенсвязывающим фрагментом.

41. Способ по п.40, отличающийся тем, что анти-PD-1 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляют собой АМР-514, камрелизумаб, тизелизумаб, спартализумаб, ниволумаб или пембролизумаб.

42. Применение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп.1-21, конъюгата по любому из пп.22-24 или фармацевтической композиции по любому из пп.31-35 для лечения рака, экспрессирующего В7-Н4.

43. Применение по п.42, в котором рак выбран из группы, состоящей из рака молочной железы, рака протоков, рака эндометрия, рака яичников, немелкоклеточного рака легких, рака поджелудочной железы, рака щитовидной железы, рака почки, рака головы и шеи, мелкоклеточного рака легкого, рака желудка, меланомы и рака мочевого пузыря.

44. Применение по любому из пп.42, 43, в котором рак представляет собой случай, неадекватно отвечающий на ингибитор PD-1 или PD-L1.

45. Применение по любому из пп.42-44, в котором лечение дополнительно включает введение субъекту анти-PD-1 антитела или его антигенсвязывающего фрагмента субъекту.

46. Применение по п.45, отличающееся тем, что анти-PD-1 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляют собой АМР-514, камрелизумаб, тизелизумаб, спартализумаб, ниволумаб или пембролизумаб.

47. Набор для детекции В7-Н4 в образце, содержащий антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-21, конъюгат по любому из пп.22-24 или фармацевтическую композицию по любому из пп.31-35 и

а) реагент для детекции;

б) антиген В7-Н4;

с) уведомление, которое отражает одобрение для использования или продажи для введения человеку; или

д) их комбинацию.

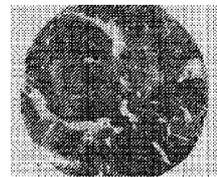
48. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-21 или конъюгат по любому из пп.22-24, отличающиеся тем, что указанные антитело или его антигенсвязывающий фрагмент ингибируют активность блокады Т-клеточной контрольной точки В7-Н4.



Инвазивный рак протоков



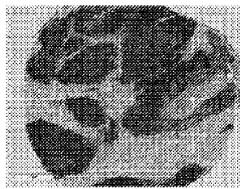
Тройной негативный рак молочной железы



Рак яичников



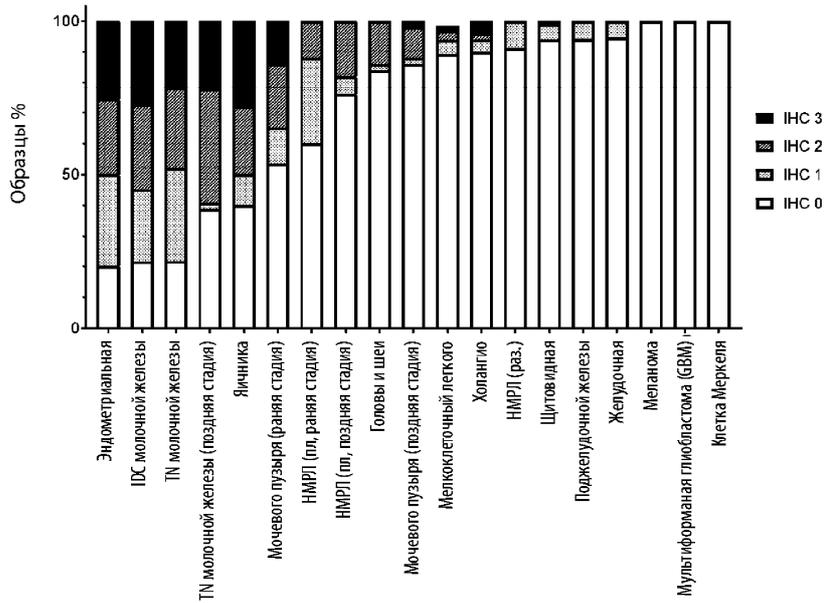
Немелкоклеточный рак легких



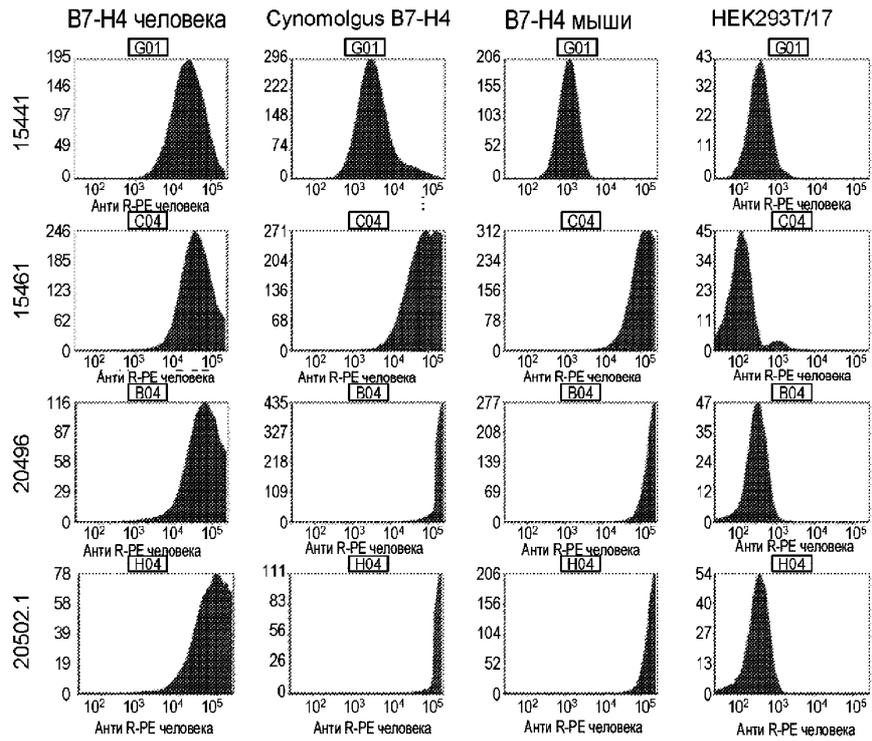
Рак эндометрия

Фиг. 1А

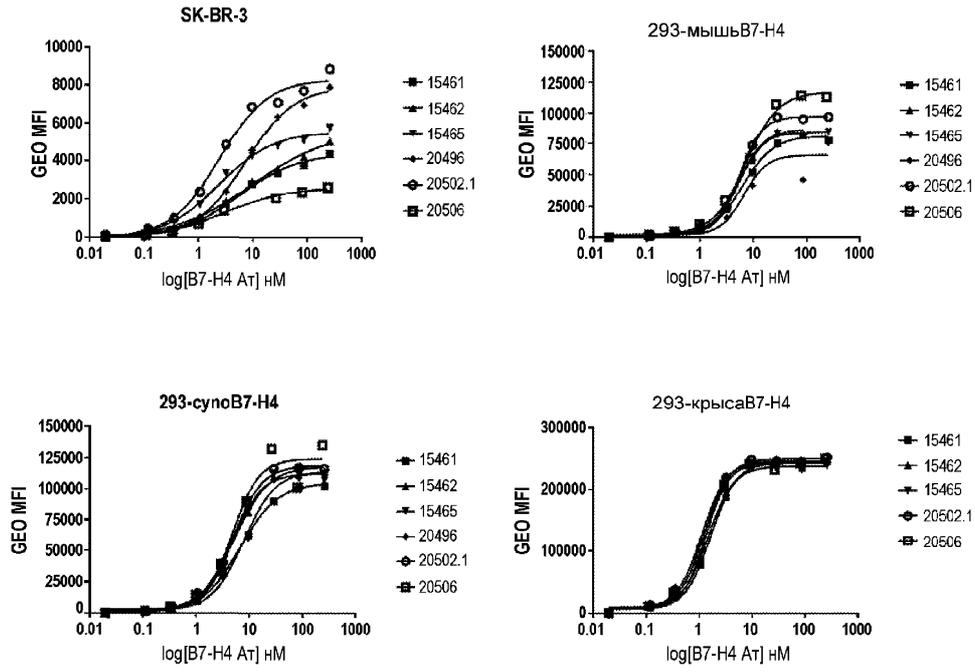
Распространенность V7-H4 при различных типах опухолей по данным ИНС



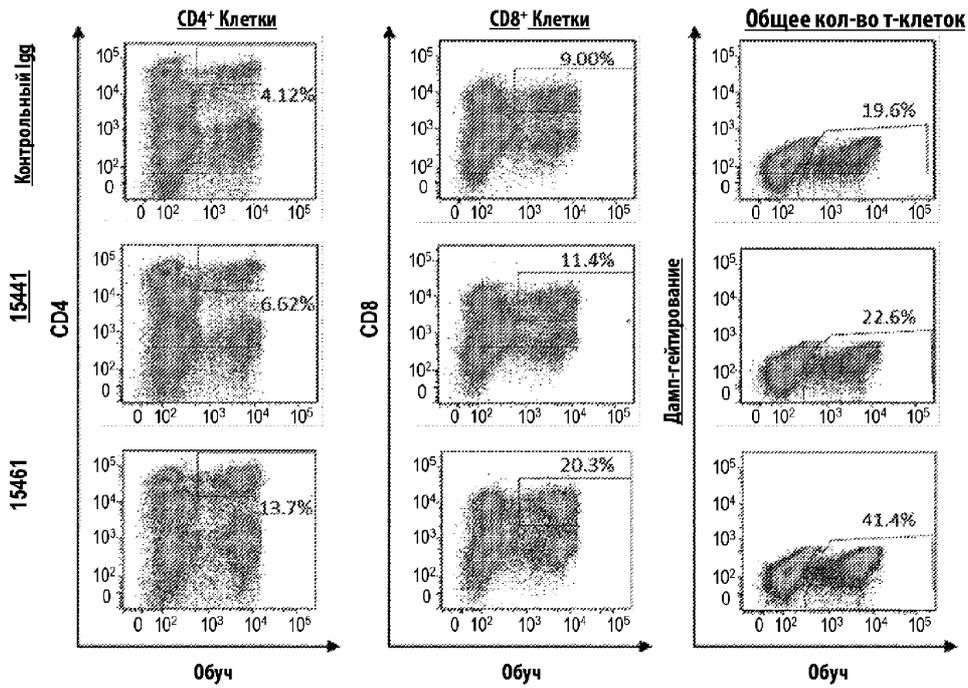
Фиг. 1B



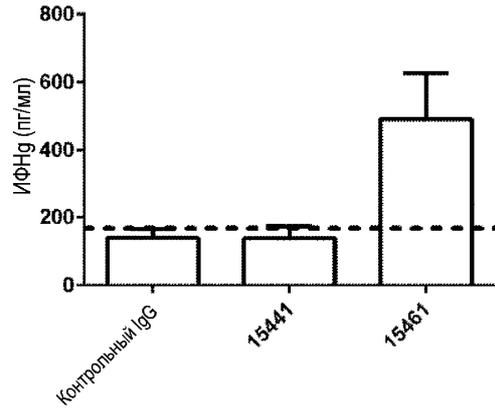
Фиг. 2A



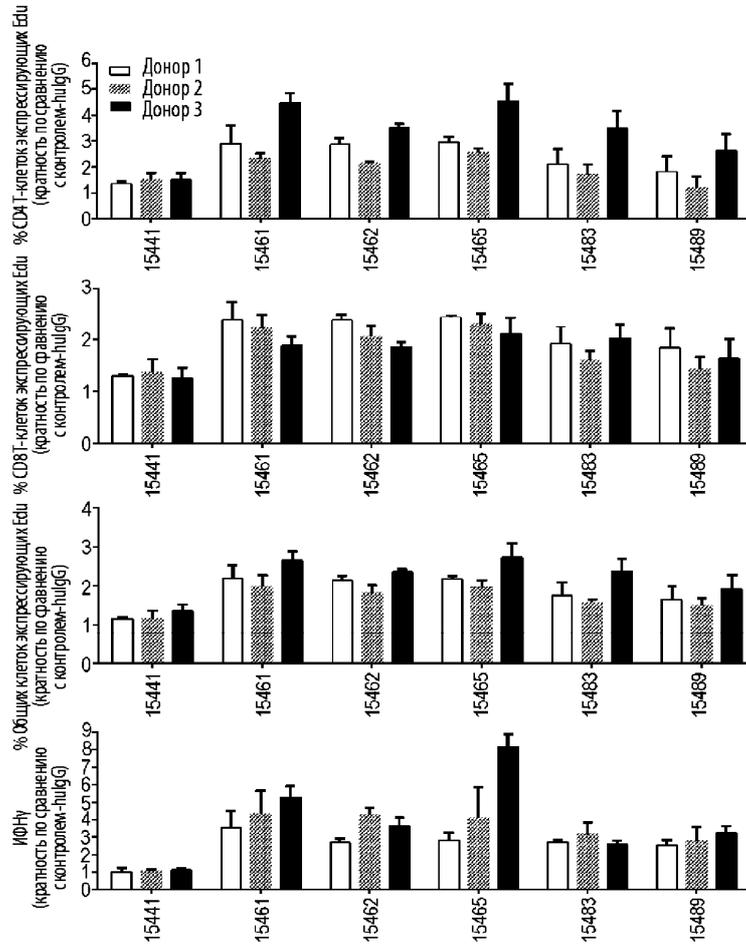
Фиг. 2В



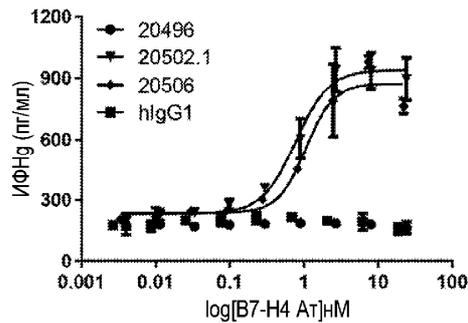
Фиг. 3А



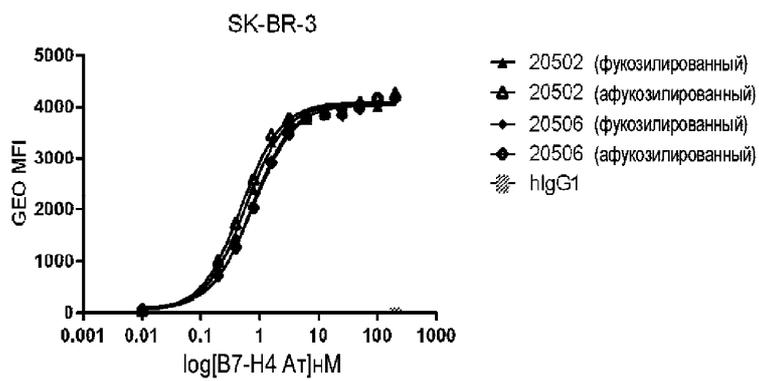
Фиг. 3В



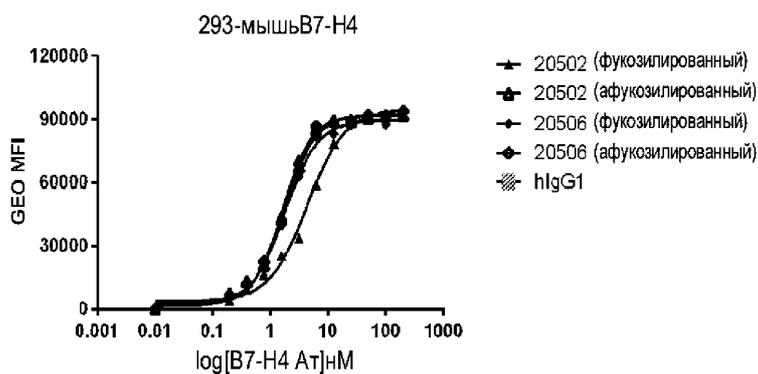
Фиг. 3С



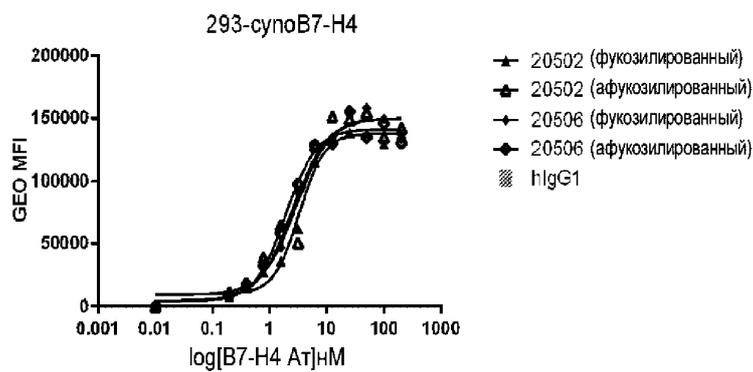
Фиг. 3D



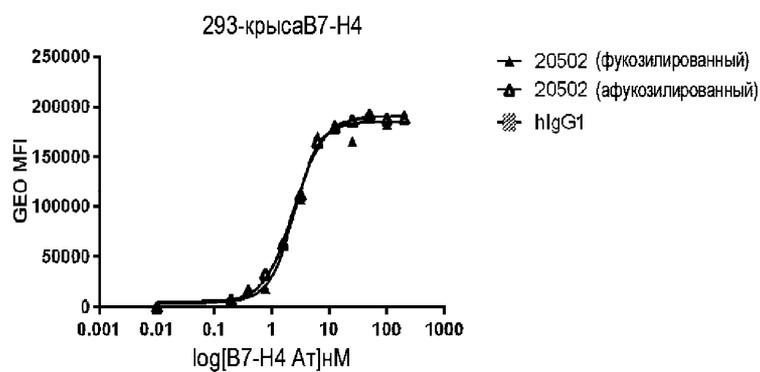
Фиг. 4А



Фиг. 4В

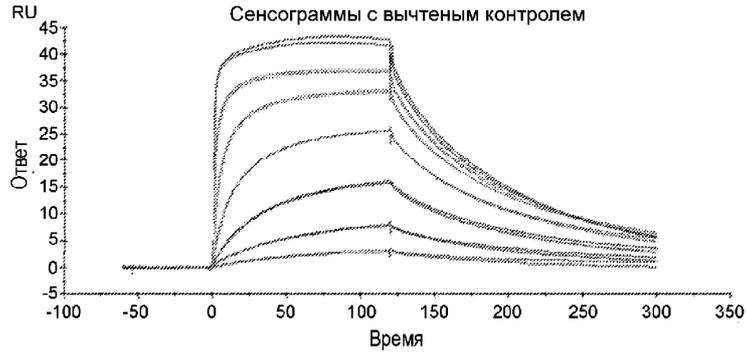


Фиг. 4С



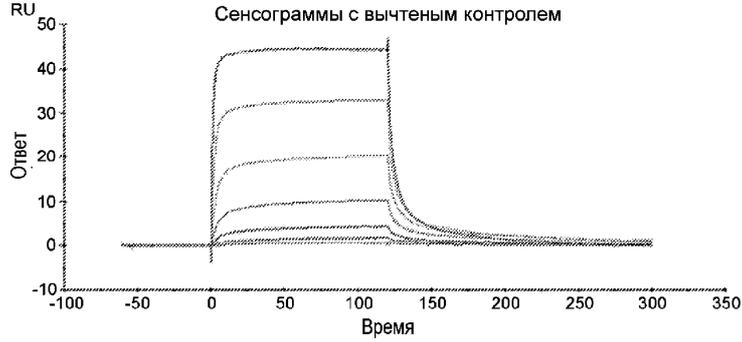
Фиг. 4D

Сенсограмма связывания FcγRIIIa (v158) с Ат-А

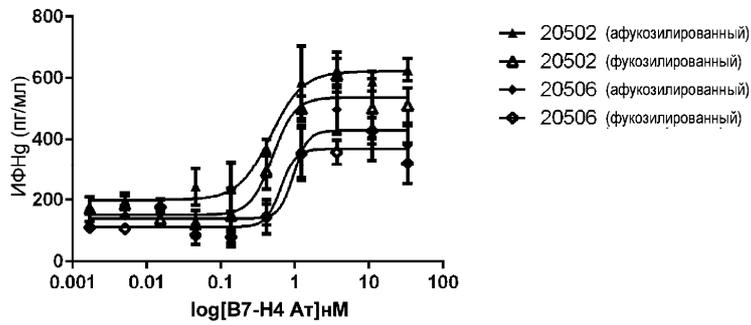


Фиг. 5А

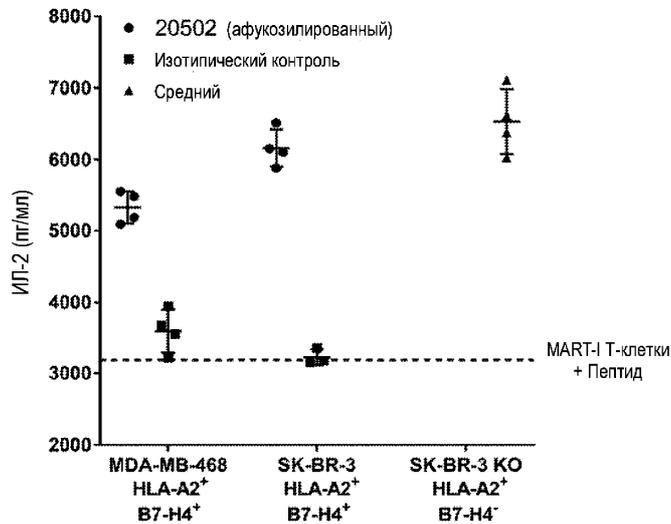
Сенсограмма связывания FcγRIIIa (v158) с Ат-В



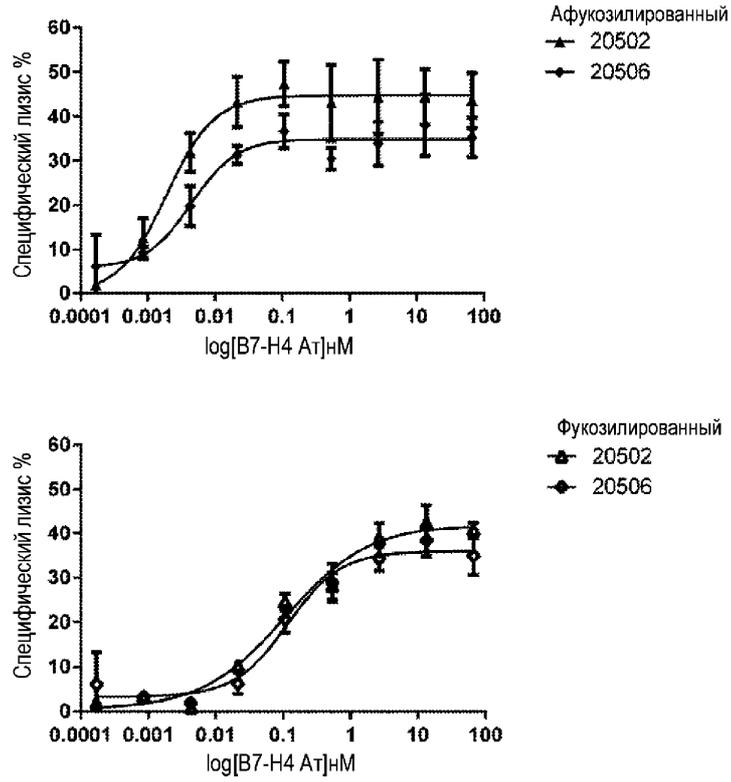
Фиг. 5В



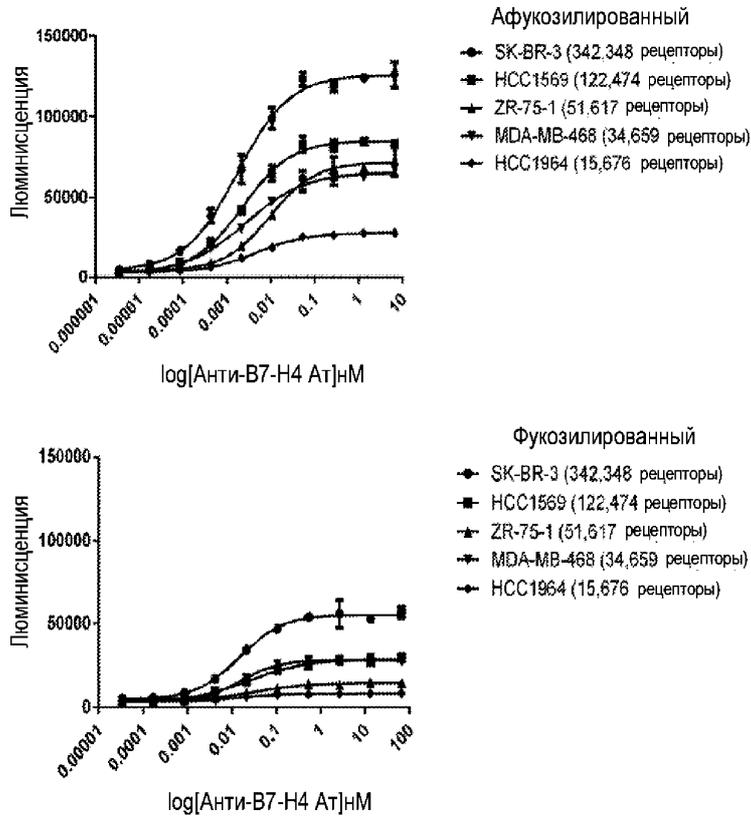
Фиг. 6А



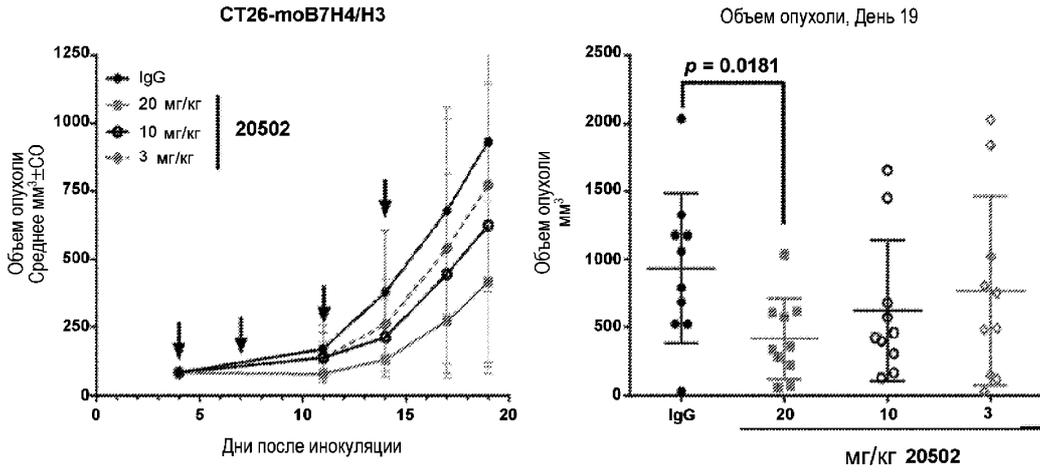
Фиг. 6В



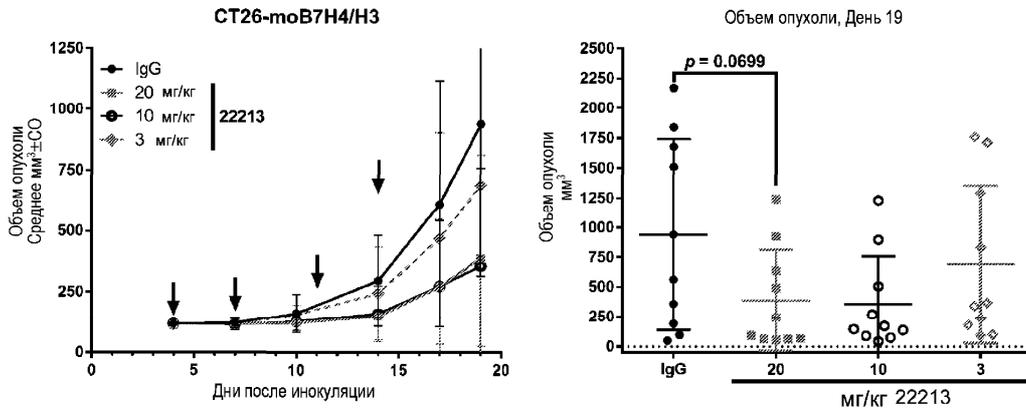
Фиг. 7



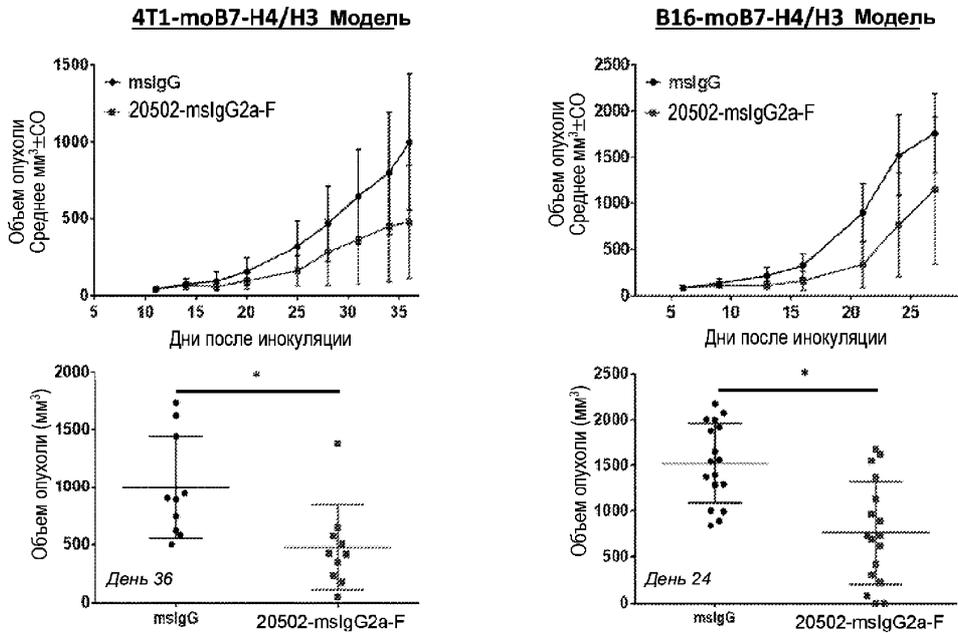
Фиг. 8



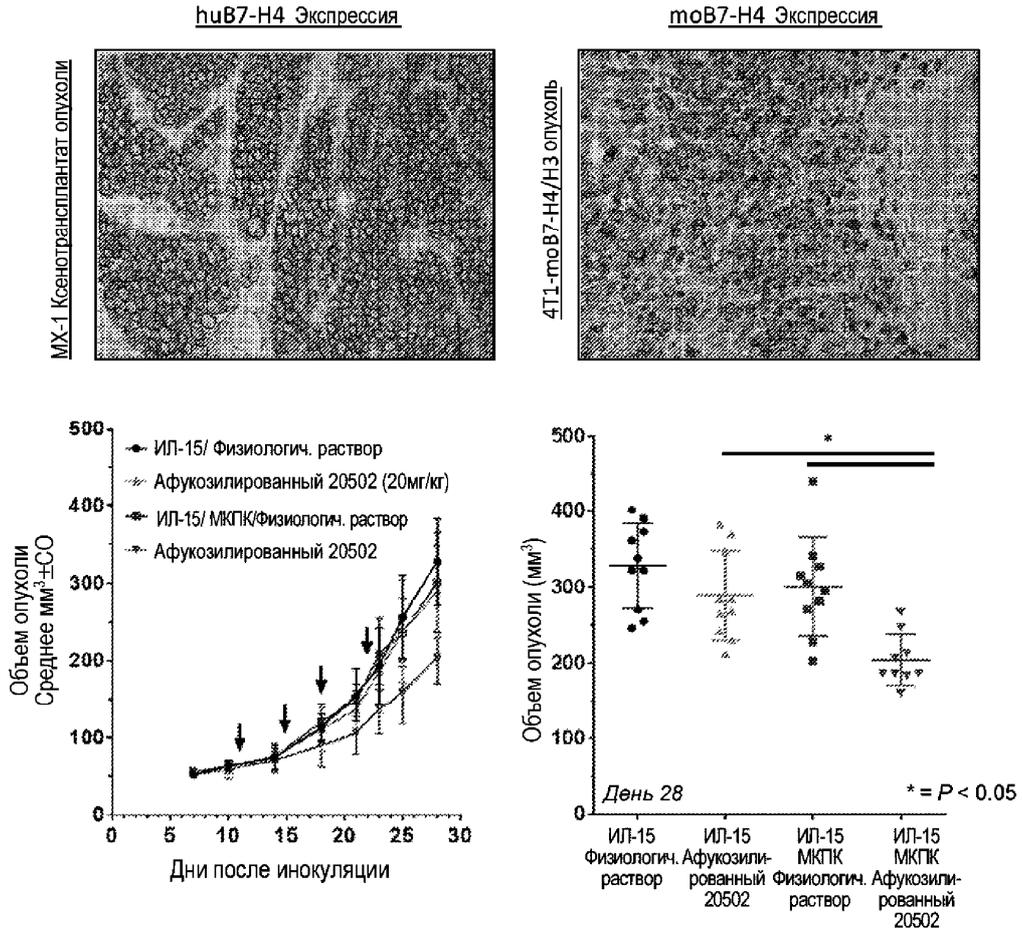
Фиг. 9А



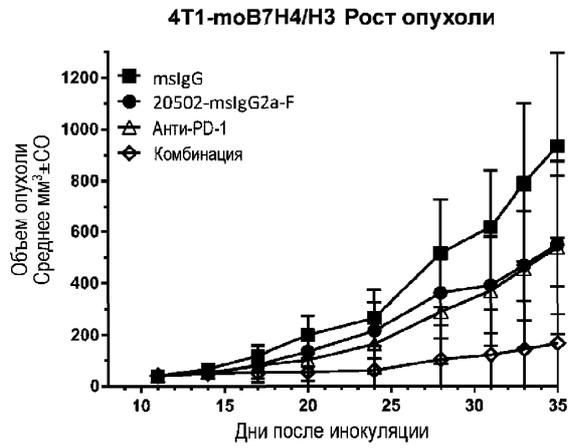
Фиг. 9В



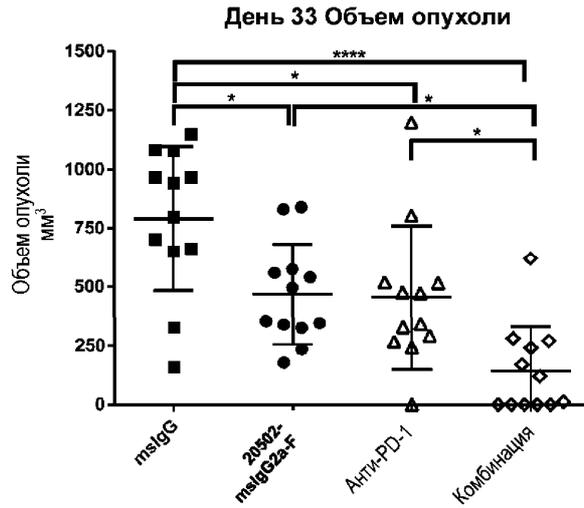
Фиг. 10



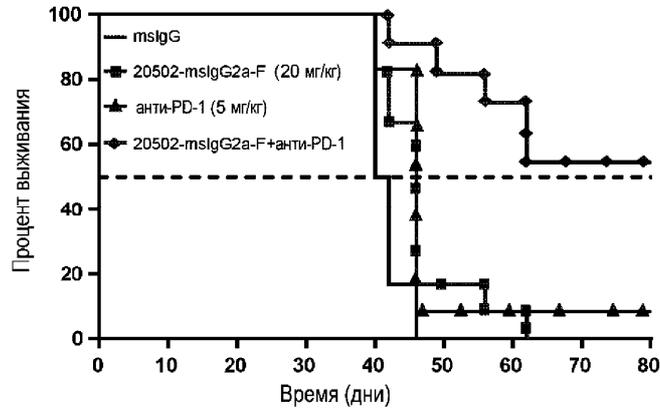
Фиг. 11



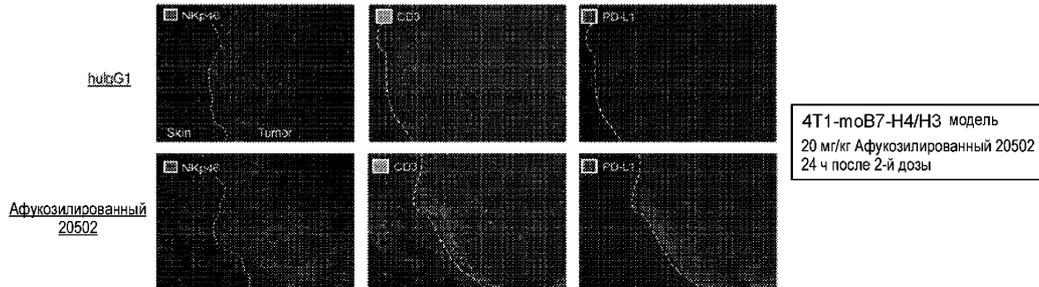
Фиг. 12А



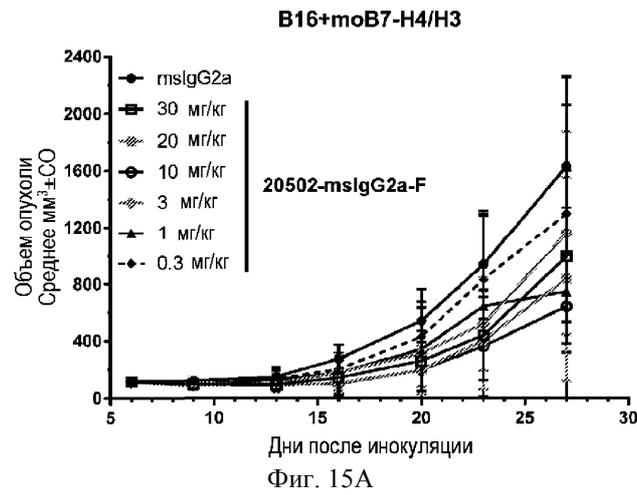
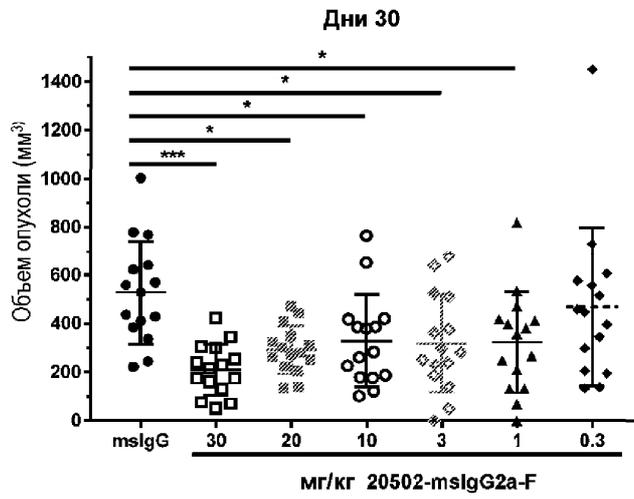
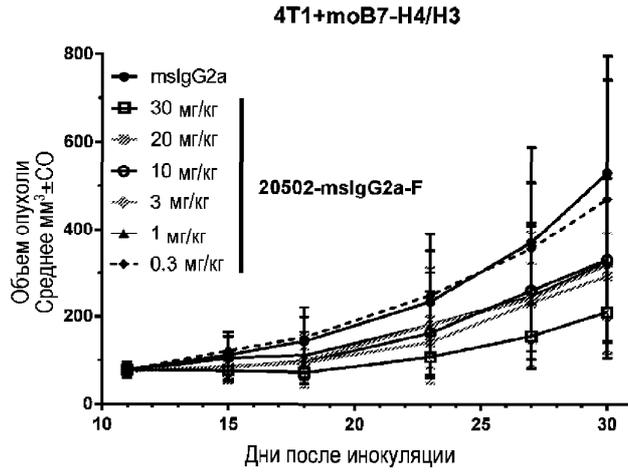
Фиг. 12В

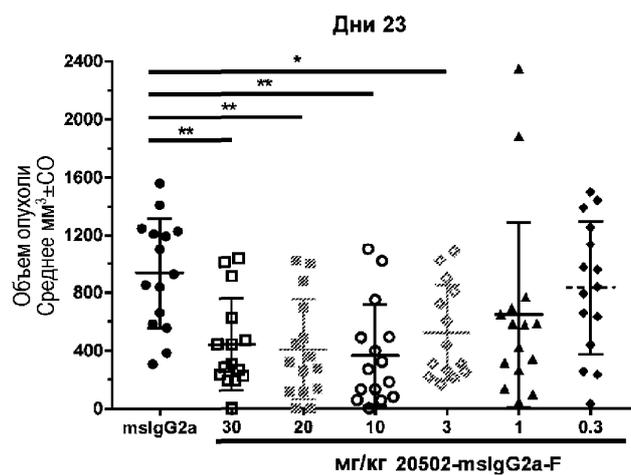


Фиг. 12С



Фиг. 13





Фиг. 15В

