

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202490083 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2024.06.26(51) Int. Cl. C07K 16/28 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)(22) Дата подачи заявки
2021.08.18

(54) БИСПЕЦИФИЧНЫЕ АНТИТЕЛА ПРОТИВ В7-Н4/4-1ВВ И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

(86) PCT/KR2021/010945

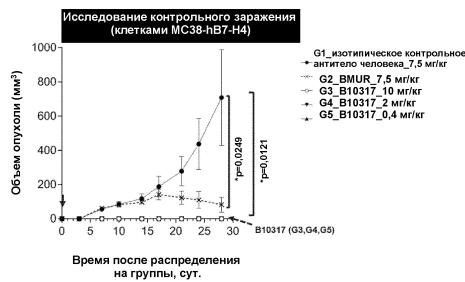
(72) Изобретатель:

(87) WO 2022/039490 2022.02.24

Пак Кёнджин, Ли Янсун, Лим Сэйи,
Пак Кёнсу, Сон Минкю, Сон Вонджун,
Чун Хеджин, Ён Ерён, Сон Ён-Гю,
Ким Ёнджу, Пак Юндон (KR)

(71) Заявитель:
АБЛ БИО, ИНК. (KR)(74) Представитель:
Нилова М.И. (RU)

(57) В настоящем изобретении предложено биспецифичное анти тело против В7-Н4/4-1ВВ, способное эффективно блокировать ингибирующий эффект В7-Н4 на поверхности опухолевых клеток в отношении Т-клеток и одновременно активировать 4-1ВВ на Т-клетках. Указанное биспецифичное анти тело может обладать высоким сродством связывания как с белком В7-Н4 (например, белком В7-Н4 человека, обезьяны и мыши), так и с белком 4-1ВВ (например, белком 4-1ВВ человека, обезьяны и мыши). Настоящее изобретение также относится к анти телу против В7-Н4, специфично связывающемуся с белком В7-Н4.



A1

202490083

202490083

A1

БИСПЕЦИФИЧНЫЕ АНТИТЕЛА ПРОТИВ В7-Н4/4-1ВВ И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

Область техники

Настоящее изобретение относится к антителам против В7-Н4, биспецифичным антителам против В7-Н4/4-1ВВ и вариантам их применения.

Уровень техники

В7-Н4 представляет собой однопроходный трансмембранный белок I типа и является членом суперсемейства белков В7, которое обеспечивает формирование сигнала в сочетании с антигенным сигналом Т-клеточного рецептора. В7-Н4 является отрицательным регулятором функции Т-клеток, и его связывание с Т-клетками ингибирует их рост, секрецию цитокинов и цитотоксичность.

В7-Н4 человека представляет собой белок из 282 аминокислот (включая N-концевую сигнальную последовательность), 235 из которых, согласно моделированию, находятся во внеклеточном пространстве после отщепления N-концевой сигнальной последовательности. В7-Н4 содержит Ig-подобный V-домен, Ig-подобный C-домен, трансмембранный домен и короткий цитоплазматический хвост.

В7-Н4 обладает потенциальной способностью подавляющим образом регулировать иммунную систему за счет его коингибиторного сигнального пути, действующего совместно с антиген-зависимым сигнальным путем Т-клеточного рецептора. В7-Н4 номинально экспрессируется в здоровых тканях человека, а также характеризуется высоким уровнем сверхэкспрессии при множестве видов рака человека, включая злокачественные заболевания женской половой системы - молочной железы, яичника и эндометрия. Согласно сообщениям, В7-Н4 характеризуется высокой распространенностью при инвазивных протоковых и дольковых карциномах, включая как первичный (-95%), так и метастатический рак молочной железы (-97%). Хотя повышенное окрашивание по В7-Н4 ассоциировано с отрицательным статусом PR и Her2, его экспрессия не зависит от степени или стадии опухоли. В дополнение к значительной доле клеток, окрашивающихся по В7Н4, при этих видах рака молочной железы также наблюдалось сопутствующее снижение количества инфильтрирующих лимфоцитов.

4-1ВВ является членом суперсемейства рецепторов ФНО (TNFRSF) и представляет собой костимулирующую молекулу, экспрессирующуюся после активации клеток иммунной системы, причем как врожденной, так и адаптивной. 4-1ВВ играет важную роль в модуляции активности различных клеток иммунной системы. Агонисты 4-1ВВ усиливают пролиферацию, выживаемость, секрецию цитокинов и цитолитическую активность CD8 Т-клеток. Многие другие исследования показали, что активация 4-1ВВ усиливает иммунный противоопухолевый ответ у мышей. Таким образом, предполагается, что 4-1ВВ является перспективной молекулой-мишенью в иммунологии рака. Несмотря на

свою противоопухолевую эффективность, антитело против 4-1ВВ индуцировало тяжелую токсичность в отношении печени при клиническом применении.

Описание изобретения

Техническая задача

5 Техническая задача, решаемая за счет настоящего изобретения, заключается в получении биспецифичного антитела против В7-Н4/4-1ВВ или его антигенсвязывающего фрагмента.

Техническая задача, решаемая за счет настоящего изобретения, заключается в получении антитела против В7-Н4 или его антигенсвязывающего фрагмента.

10 Техническая задача, решаемая за счет настоящего изобретения, заключается в получении фармацевтической композиции для профилактики или лечения заболевания, связанного с В7-Н4, 4-1ВВ или обоими из них.

15 Техническая задача, решаемая за счет настоящего изобретения, заключается в получении фармацевтической композиции для профилактики или лечения заболевания, связанного с В7-Н4.

Техническая задача, решаемая за счет настоящего изобретения, заключается в получении способа профилактики или лечения заболевания, связанного с В7-Н4, 4-1ВВ или обоими из них, у индивида.

20 Техническая задача, решаемая за счет настоящего изобретения, заключается в получении способа профилактики или лечения заболевания, связанного с В7-Н4, у индивида.

25 Техническая задача, решаемая за счет настоящего изобретения, заключается в получении биспецифичного антитела против В7-Н4/4-1ВВ или его антигенсвязывающего фрагмента для применения в целях профилактики или лечения заболевания, связанного с В7-Н4, 4-1ВВ или обоими из них.

Техническая задача, решаемая за счет настоящего изобретения, заключается в получении антитела против В7-Н4 или его антигенсвязывающего фрагмента для применения при профилактике или лечении заболевания, связанного с В7-Н4.

Техническое решение

Определения

30 В настоящем документе формы единственного числа могут относиться к одному или более указанным объектам, например, под «антителом» подразумевают одно или более антител. Соответственно, формы единственного числа, а также термины «один или более» и «по меньшей мере один» в настоящем документе могут использоваться
35 взаимозаменяемо.

В настоящем документе термин «состоящий из последовательности», «по существу состоящий из последовательности» или «содержащий последовательность»

может относиться к любому случаю, в котором присутствует указанная последовательность, однако он не предназначен для исключения случая, в котором присутствует дополнительная последовательность, отличная от указанной последовательности.

5 В настоящем документе термин «белок или полипептид, содержащий или состоящий из аминокислотной последовательности, идентифицированной как SEQ ID NO», и «ген или полинуклеотид, содержащий или состоящий из нуклеотидной последовательности, идентифицированной как SEQ ID NO», может относиться к белку (или полипептиду) или гену (или полинуклеотиду), по существу состоящему из аминокислотной последовательности или нуклеотидной последовательности, или характеризующемуся по 10 меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности по отношению к указанной аминокислотной последовательности или нуклеотидной последовательности с сохранением присущей ему активности и/или функции. 15

В настоящем документе термин «антитело» может охватывать различные обширные классы полипептидов, которые могут различаться с биохимической точки зрения. Специалисты в данной области техники должны принимать во внимание, что тяжелые цепи классифицируют как гамма, мю, альфа, дельта или эпсилон (γ , μ , α , δ), среди которых есть 20 несколько подклассов (например, $\gamma 1$ - $\gamma 4$), а легкие цепи классифицируют как каппа или лямбда (κ , λ). Именно природа этой цепи определяет «класс» антитела как IgG, IgM, IgA, IgG или IgE, соответственно. Подклассы (изотипы) иммуноглобулинов, например, IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgG₅ и т. д., хорошо изучены и, как известно, придают антителу функциональную специализацию.

25 Термин «тяжелая цепь» относится к полноразмерной тяжелой цепи или ее фрагменту, включающим переменную область VH, содержащую аминокислотные последовательности, достаточные для обеспечения специфичности по отношению к антигенам, три константные области (CH1, CH2 и CH3), и шарнирную область. Термин «легкая цепь» относится к полноразмерной легкой цепи или ее фрагменту, включающим 30 переменную область VL, содержащую аминокислотные последовательности, достаточные для обеспечения специфичности по отношению к антигенам, и константную область CL.

Термин «область, определяющая комплементарность (CDR)» относится к последовательности аминокислот, обнаруженной в гипервариабельной области тяжелой 35 цепи или легкой цепи иммуноглобулина. Тяжелая и легкая цепи могут, соответственно, включать три CDR (CDRH1, CDRH2 и CDRH3; и CDRL1, CDRL2 и CDRL3). CDR может содержать остатки, играющие важную роль в связывании антител с антигенами или

эпитопом. Термины «специфично связывающийся» или «специфично распознаваемый» хорошо известны специалисту в данной области техники и указывают на то, что антитело и антиген специфично взаимодействуют друг с другом, что приводит к иммунологической активности.

5 В настоящем изобретении антитело может включать поликлональное или моноклональное антитело; и/или антитело человека, гуманизированное антитело, антитело животного (например, мыши, кролика и т. д.), или химерные антитела (например, химерное антитело мыши-человека), но не ограничивается ими. Кроме того, антитело согласно настоящему изобретению может включать моноспецифичное антитело и
10 мультиспецифичное антитело, например, биспецифичное антитело и триспецифичное антитело, но может не ограничиваться ими.

В настоящем документе термин «антигенсвязывающий фрагмент» относится к фрагменту, полученному из полной структуры иммуноглобулина, содержащему область, способную связываться с антигеном, например, CDR. Например, антигенсвязывающий
15 фрагмент может представлять собой или включать scFv, (scFv)₂, Fab, Fab', F(ab')₂ или любую их комбинацию, но не ограничивается ими. В настоящем изобретении антигенсвязывающий фрагмент может представлять собой фрагмент, полученный из антитела и содержащий по меньшей мере одну область, определяющую комплементарность, например, может быть выбран из группы, состоящей из scFv, (scFv)₂,
20 scFv-Fc, Fab, Fab' и F(ab')₂.

Например, антитело или антигенсвязывающий фрагмент могут быть синтезированы химическим или рекомбинантным путем (не встречаться в природе).

Антитело против В7-Н4

Биспецифичное антитело против В7-Н4/4-1ВВ может содержать антитело против
25 В7-Н4 или его антигенсвязывающий фрагмент в качестве фрагмента, способного обеспечивать адресное воздействие по отношению к В7-Н4.

В одном варианте реализации указанное антитело против В7-Н4 или его фрагмент могут специфично связываться с белком В7-Н4 (например, В7-Н4 человека).

Являясь членом семейства В7, белок В7-Н4 (также известный как ингибитор 1
30 активации Т-клеток, содержащий домен V-set (VTCN1)) участвует в контроле активации Т-клеток. В7-Н4 оказывает отрицательное регуляторное воздействие на иммунный ответ Т-клеток путем ингибирования секреции цитокинов, стимулирующих пролиферацию, и клеточного цикла Т-клеток. Со структурной точки зрения, В7-Н4 является членом суперсемейства иммуноглобулинов (Ig), содержащих два Ig-подобных домена:
35 переменный (IgV) и константный (IgC) домен. Подобно еще одному отрицательному костимулятору, PD-L1, В7-Н4 экспрессируется не только АПК (антигенпрезентирующими клетками), но и в различных нормальных нелимфоидных и раковых тканях. Экспрессия вне

АПК подразумевает, что B7-H4 может иметь и дополнительные функции по сравнению с классической костимулирующей молекулой.

Белок B7-H4 человека состоит из аминокислотной последовательности, представляющей собой эталонную последовательность NCBI ID: NP_001240778.1, NP_001240779.1 или NP_078902.2; а нуклеотидная последовательность представляет собой NM_001253849.2, NM_001253850.2 или NM_024626.4. Если это не очевидно из контекста, используемого в настоящем документе, B7-H4 относится к B7-H4 человека, однако указанное антитело также способно связываться с B7-H4 обезьяны. Аминокислотная последовательность B7-H4 мыши представлена в GenBank: XP_001103715.

Тканеспецифичная сверхэкспрессия B7-H4 коррелировала с отрицательным клиническим исходом при раке предстательной железы, раке яичников, раке молочной железы, раке поджелудочной железы и раке почек. Недавно авторы настоящего изобретения показали, что нарушение презентации B7-H4 свидетельствует о развитии диабета I типа как у модельных мышей, так и у пациентов-людей, и связывали этот процесс с протеолитическим отделением B7-H4 клеточной поверхности от АПК и островков поджелудочной железы. Лечение с использованием Ig снижало частоту СД1, экспериментального аутоиммунного энцефаломиелимита и ревматоидного артрита, что подчеркивает важность данного белка в качестве потенциальной терапевтической мишени как для аутоиммунных состояний, так и для рака.

Антитело против B7-H4 или его антигенсвязывающий фрагмент может проявлять выраженную связывающую активность по отношению к B7-H4, и их можно использовать для терапевтического и/или диагностического применения.

В одном варианте реализации предложено биспецифичное антитело против B7-H4/4-1BB, содержащее антитело против B7-H4 или его антигенсвязывающий фрагмент и антитело против 4-1BB или его антигенсвязывающий фрагмент, причем указанное антитело против B7-H4 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи, содержащие:

область 1, определяющую комплементарность тяжелой цепи (CDR-H1), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, 25 и 33;

CDR-H2, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 3, 26 и 34;

CDR-H3, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 4, 27 и 35;

область 1, определяющую комплементарность легкой цепи (CDR-L1), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 7,

8, 29 и 37;

CDR-L2, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 9 и 30; и

5 CDR-L3, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 10, 31 и 38;

причем указанное антитело против 4-1BB или его антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую по меньшей мере одну аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 39-43; и вариабельную область легкой цепи, содержащую по меньшей мере одну аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 52 и 53. Аминокислотные последовательности CDR тяжелой цепи антитела против B7-H4 или его антигенсвязывающего фрагмента перечислены в таблице 1.

[Таблица 1] Примеры CDR тяжелой цепи антитела против B7-H4 или его антигенсвязывающего фрагмента в соответствии с определением по Kabat

15

Антитело	CDR H1	SEQ ID NO	CDR H2	SEQ ID NO	CDR H3	SEQ ID NO
16E3H3	TYGMN	2	WIDTYSGVPT Y	3	RSFWYFDV	4
16E3H3 M1	TYGMN	2	WIDTYSGVPT Y	3	RSFWYFDV	4
23B6C2	TFGMGVG	25	HIWWDDDKY YNSALKS	26	KDYGYRGRF AY	27
73B4F10	SYWMH	33	HINPSNGGTN YNEKFKK	34	SEFYGTGTF A	35

Аминокислотные последовательности вариабельных областей тяжелой цепи антитела против B7-H4 или его антигенсвязывающего фрагмента перечислены в таблице 2.

20

[Таблица 2] Примеры вариабельных областей тяжелой цепи антитела против B7-H4 или его антигенсвязывающего фрагмента в соответствии с определением по Kabat

Антитело	Аминокислотная последовательность VH	SEQ ID NO
----------	--------------------------------------	-----------

16E3H3 (гуманизированное)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYPTTYGMN WVKQAPGQGLEWMGWIDTYSVPTYADDFKGRVT MTRDTSISTAYMELSR LRSDDTAVYFCARRSFWYFD VWGAGTTVTVSS	1
16E3H3 M1 (гуманизированное)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYPTTYGMN WVKQAPGQGLEWMGWIDTYSVPTYADDFKGRVT MTRDTSISTAYMELSR LRSDDTAVYFCARRSFWYFD VWGAGTTVTVSS	1
16E3H3 (мыши)	QIQLVHSGPELKKPGETVKISCKASGYPTTYGMNW VKQAPGKGLKWMGWIDTYSVPTYADDFKGRFAFS LETSASTAYLQINNLK NEDTATYFCARRSFWYFDVW GTGTTVTVSS	22
23B6C2 (мыши)	QVTLKESGPGILQPSQTL SLTCSFSGFSLSTFGMGV GWIRQPSGKGLEWLAHIWWDDDKYYNSALKSRLTIS KETS KNQIFLKIANVDTTDTATYYCVRKDYYGYRGFA YWGQGLTVTSA	24
73B4F10 (мыши)	QVQLQQPGTELKPGASVKLSCKASGYTFTSYWMN WVKQRPGQGLERIGHINPSNGGTNYNEKFKKKATLT VDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARSEFYGTVF AYWGQGLTVTSA	32

Аминокислотные последовательности CDR легкой цепи антитела против B7-H4 или его антигенсвязывающего фрагмента перечислены в таблице 3.

5 [Таблица 3] Примеры переменных CDR легкой цепи антитела против B7-H4 или его антигенсвязывающего фрагмента в соответствии с определением по Kabat

Антитело	CDR L1	SEQ ID NO	CDR L2	SEQ ID NO	CDR L3	SEQ ID NO
16E3H3	RSSQSLVHSN <u>G</u> NTYLH	7	KVSNRFS	9	SQSTHVPW T	10
16E3H3 M1	RSSQSLVHSN <u>A</u> NTYLH	8	KVSNRFS	9	SQSTHVPW T	10
23B6C2	TLSSQHHTTYTI E	29	LKKDGSHTG D	30	GVGDTIKEQF V	31
7334F10	RSSQSIVHGN GNTYLE	37	KVSNRFS	9	FQGSHDPP T	38

Аминокислотные последовательности переменных областей легкой цепи антитела против B7-H4 или его антигенсвязывающего фрагмента перечислены в таблице 4.

5 [Таблица 4] Примеры переменных областей легкой цепи антитела против B7-H4 или его антигенсвязывающего фрагмента в соответствии с определением по Kabat

Антитело	Аминокислотная последовательность VL	SEQ ID NO
16E3H3 (гуманизованное)	DWMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSLVHSNGNTYL HWYLQRPGQSPRLLIYKVS NRFSGVPDRFSGSGSGT DFTLKISRVEAEDVGVYFCSQSTHVPWTFGGGTKVEI KR	5
16E3H3 M1 (гуманизованное)	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSLVHSNANTY LHWYLQRPGQSPRLLIYKVS NRFSGVPDRFSGSGSG TDFTLK1SRVEAEDVGVYFCSQSTHVPWTFGGGTKV EIKR	6
16E3H3 (мыши)	DVVMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSLVHSNGNTY LHWYLQKPGQSPKLLIYKVS NRFSGVPDRFSGSGSG TDFTLKIRRVEAEDLGVYFCSQSTHVPWTFGGGTKLEI K	23
23B6C2 (мыши)	QLVLTQSSSASFSLGASAKLTCTLSSQHHTTYTIEWYQQ QPLKPPKYVMELKKDGSHTGDGIPDRFSGSSSGAD RYLCISNIQPEDEAIYICGVGDTIKEQFVYVFGGGTKVT VL	28
73B4F10 (мыши)	DVLMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSIVHGNGNTY LEWYLQKPGQSPKLLIYKVS NRFSGVPDRFSGSGSGT DFTLKISRVEAEDLGVYYCFQGSHPPTFGGGTKLEIK	36

10 В одном варианте реализации антитело против B7-H4 или его антигенсвязывающий фрагмент можно сконструировать путем смешивания и сопоставления CDR, перечисленных в таблицах 1 и 3, с учетом поддержания его сродства к B7-H4. Например, антитело против B7-H4 или его антигенсвязывающий фрагмент может содержать:

15 (1) CDR-H1 с последовательностью SEQ ID NO: 2, CDR-H2 с последовательностью SEQ ID NO: 3, CDR-H3 с последовательностью SEQ ID NO: 4, CDR-L1 с последовательностью SEQ ID NO: 7, CDR-L2 с последовательностью SEQ ID NO: 9 и CDR-L3 с последовательностью SEQ ID NO: 10;

(2) CDR-H1 с последовательностью SEQ ID NO: 2, CDR-H2 с последовательностью SEQ ID NO: 3, CDR-H3 с последовательностью SEQ ID NO: 4, CDR-L1 с последовательностью SEQ ID NO: 8, CDR-L2 с последовательностью SEQ ID NO: 9 и CDR-L3 с последовательностью SEQ ID NO: 10;

5 (3) CDR-H1 с последовательностью SEQ ID NO: 25, CDR-H2 с последовательностью SEQ ID NO: 26, CDR-H3 с последовательностью SEQ ID NO: 27, CDR-L1 с последовательностью SEQ ID NO: 29, CDR-L2 с последовательностью SEQ ID NO: 30 и CDR-L3 с последовательностью SEQ ID NO: 31; или

10 (4) CDR-H1 с последовательностью SEQ ID NO: 33, CDR-H2 с последовательностью SEQ ID NO: 34, CDR-H3 с последовательностью SEQ ID NO: 35, CDR-L1 с последовательностью SEQ ID NO: 37, CDR-L2 с последовательностью SEQ ID NO: 9 и CDR-L3 с последовательностью SEQ ID NO: 38.

В одном варианте реализации антитело против B7-H4 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит:

15 переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1, 22, 24 и 32; и

переменную область легкой цепи, содержащую аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 5, 6, 23, 28 и 36.

20 Примеры переменных областей тяжелой цепи и переменных областей легкой цепи указанного антитела или антигенсвязывающего фрагмента перечислены в таблицах 2 и 4.

В другом варианте реализации переменные области тяжелой цепи и легкой цепи, описанные в таблицах 2 и 4, можно подходящим образом комбинировать (смешивать и сопоставлять) для получения различных форм антител; например, они могут образовывать 25 одноцепочечное антитело, например, ScFV, или доменное антитело, или полноразмерное антитело (например, антитело вида IgG, содержащее две тяжелые цепи и две легкие цепи).

Например, антитело или антигенсвязывающий фрагмент против B7-H4 может содержать:

30 (1) переменную область тяжелой цепи SEQ ID NO: 1 и переменную область легкой цепи SEQ ID NO: 5;

(2) переменную область тяжелой цепи SEQ ID NO: 1 и переменную область легкой цепи SEQ ID NO: 6;

(3) переменную область тяжелой цепи SEQ ID NO: 22 и переменную область легкой цепи SEQ ID NO: 23;

35 (4) переменную область тяжелой цепи SEQ ID NO: 24 и переменную область легкой цепи SEQ ID NO: 28; или

(5) переменную область тяжелой цепи SEQ ID NO: 32 и переменную область

легкой цепи SEQ ID NO: 36.

Каждую из переменных областей тяжелой цепи и переменных областей легкой цепи, описанных в настоящем документе, можно комбинировать с различными константными областями тяжелой цепи и легкой цепи с образованием тяжелой цепи и легкой цепи интактного антитела, соответственно.

Неограничивающие примеры антитела против B7-H4 или его антигенсвязывающего фрагмента могут включать:

переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1, 22, 24 и 32, или аминокислотную последовательность, характеризующуюся 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% идентичностью последовательности по отношению к вышеописанным аминокислотным последовательностям; и

переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из последовательностей SEQ ID NO: 5, 6, 23, 28 и 36, или аминокислотную последовательность, характеризующуюся 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% идентичностью последовательности по отношению к вышеописанным аминокислотным последовательностям.

В одном варианте реализации антитело против B7-H4 или его антигенсвязывающий фрагмент содержат: каркасную область тяжелой цепи 1 (H-FR1), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12; каркасную область тяжелой цепи 2 (H-FR2), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13; каркасную область тяжелой цепи 3 (H-FR3), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14; каркасную область тяжелой цепи 4 (H-FR4), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15; каркасную область легкой цепи 1 (L-FR1), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17; каркасную область легкой цепи 2 (L-FR2), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18; каркасную область легкой цепи 3 (L-FR3), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19; и каркасную область легкой цепи 4 (L-FR4), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20.

В одном варианте реализации, если антитело против B7-H4 или антигенсвязывающий фрагмент представляет собой форму scFv, переменная область тяжелой цепи и переменная область легкой цепи могут быть связаны посредством подходящего пептидного линкера. Например, пептидный линкер может представлять

собой (GGGGS)₂, (GGGGS)₃, (GGGGS)₄ или (GS)₉.

Например, значения сродства связывания антитела против B7-H4 или его антигенсвязывающего фрагмента согласно настоящему изобретению с B7-H4 человека включают значения с константой диссоциации (или KD) 1×10^{-6} M или менее, 1×10^{-7} M или менее, 1×10^{-8} M или менее, 1×10^{-9} M или менее или 1×10^{-10} M или менее.

Антитело против 4-1BB

Биспецифичное антитело против B7-H4/4-1BB может содержать антитело против 4-1BB или его антигенсвязывающий фрагмент в качестве фрагмента, способного обеспечивать адресное воздействие по отношению к 4-1BB. Заявка WO2020/111913, в которой описаны антитела против 4-1BB, полностью включена в настоящий документ посредством ссылки.

В одном варианте реализации указанное антитело против 4-1BB или его фрагмент могут специфично связываться с белком 4-1BB (например, 4-1BB человека).

Например, белок 4-1BB человека может быть выбран из группы, состоящей из белков, представленных под номером доступа NCBI NP_001552.2 и т.д., но может не ограничиваться ими. Эти антитела против 4-1BB или их антигенсвязывающие фрагменты способны усиливать иммунный ответ и/или лечить опухоль (рак) у млекопитающего. Антитело против 4-1BB или его антигенсвязывающий фрагмент характеризуется локализацией и/или активацией в микроокружении опухоли (TME) и/или значительным снижением токсичности по отношению к печени по сравнению с ранее существовавшими антителами против 4-1BB с сохранением эффективности усиления иммунного ответа и/или лечения опухоли.

Термин "4-1-BB" относится к CD137 или TNFRSF9 (члену 9 суперсемейства рецептора ФНО 25), является членом суперсемейства рецепторов ФНО (TNFRSF) и представляет собой костимулирующую молекулу, экспрессирующуюся после активации клеток иммунной системы, причем как врожденной, так и адаптивной. В настоящем документе 4-1BB может быть получен из организма млекопитающего, например, Homo sapiens (человека) (номер доступа NCBI NP_001552.2).

Как описано в настоящем документе, термин «4-1BB» включает варианты, изоформы, гомологи, ортологи и паралоги. Например, антитела, специфичные по отношению к белку 4-1BB человека, могут, в некоторых случаях, вступать в перекрестную реакцию с белком 4-1BB животного, не являющегося человеком. В других вариантах реализации антитела, специфичные по отношению к белку 4-1BB человека, могут быть полностью специфичными по отношению к белку 4-1BB человека и могут проявлять видовую перекрестную реакционную способность или реакционную способность другого типа, или могут перекрестно реагировать с 4-1BB некоторых других, но не всех видов

животных (например, перекрестно реагировать с 4-1BB обезьяны, но не с 4-1BB мыши). Термин «4-1BB человека» относится к последовательности 4-1BB человека, например, полной аминокислотной последовательности 4-1BB человека с номером доступа NCBI NP_001552.2. Термин «4-1BB мыши» относится к последовательности 4-1BB мыши, например, полной аминокислотной последовательности 4-1BB мыши с номером доступа NCBI NP 033430.1. 4-1BB также может быть известен в данной области техники как, например, CD137. Последовательность 4-1BB человека в настоящем изобретении может отличаться от последовательности 4-1BB человека с номером доступа NCBI NP_001552.2, например, содержать консервативные мутации или мутации в неконсервативных областях, и 4-1BB в настоящем изобретении обладает по существу той же биологической функцией, что и 4-1BB человека с номером доступа NCBI NP_001552.2.

В одном варианте реализации антитело против 4-1BB или его антигенсвязывающий фрагмент может содержать:

CDR-H1, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 44 и 45;

CDR-H2, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 46 и 47; и

CDR-H3, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 48-51;

CDR-L1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 54;

CDR-L2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 55; и

CDR-L3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 56.

Аминокислотные последовательности CDR тяжелой цепи антитела против 4-1BB или его антигенсвязывающего фрагмента перечислены в таблице 5.

[Таблица 5] Примеры CDR тяжелой цепи антитела против 4-1BB или его антигенсвязывающего фрагмента в соответствии с определением по Kabat

Антитело	CDR H1	SEQ ID NO	CDR H2	SEQ ID NO	CDR H3	SEQ ID NO
1A10	SYDMS	44	WISYSGGSIIY YADSVKG	46	DGQRNSMR EFDY	48
1A10M4	SYDMS	44	WISYSGGSIIY YADSVKG	46	DAQRNSMR EFDY	49
1A10M11	SYDMS	44	WISYSGGSIIY YADSVKG	46	DAQRQSMR EFDY	50

1A10M12	SYDMS	44	WISYSGGSIIY YADSVKG	46	DAQRNSMR EFDY	49
1A10M13	SYDMS	44	WISYSGGSIIY YADSVKG	46	DAQRQSMR EFDY	50
1A12	GYDMS	45	VIYPDDGNTY YADSVKG	47	HGGQKPTTK SSSAYGMDG	51
1A12M1	GYDMS	45	VIYPDDGNTY YADSVKG	47	HGGQKPTTK SSSAYGMDG	51

Аминокислотные последовательности переменных областей тяжелой цепи антитела против 4-1BB или его антигенсвязывающего фрагмента перечислены в таблице 6.

5 [Таблица 6] Примеры переменных областей тяжелой цепи антитела против 4-1BB или его антигенсвязывающего фрагмента в соответствии с определением по Kabat

Антитело	Аминокислотная последовательность VH	SEQ ID NO
1A10	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMSW VRQAPGKCLEWWSWISYSGGSIIYADSVKGRFTISRD NSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDGQRNSMREFD YWGQGTLLTVSS	39
1A10M4	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMSW VRQAPGKCLEWWSWISYSGGSIIYADSVKGRFTISRD NSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDAQRNSMREFD YWGQGTLLTVSS	40
1A10M11	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMSW VRQAPGKCLEWWSWISYSGGSIIYADSVKGRFTISRD NSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDQRQSMREFD YWGQGTLLTVSS	41
1A10M12	EVQLLEGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMSW RQAPGKCLEWWSWISYSGGSIIYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDQRNSMREFDY WGQGTLLTVSS	40
1A10M13	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMSW VRQAPGKCLEWWSWISYSGGSIIYADSVKGRFTISRD NSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDQRQSMREFD YWGQGTLLTVSS	41

1A12	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSGYDMSW VRQAPGKCLEWWSVIYPDDGNTYYADSVKGRFTISR NSKNTLYLQMNSLRAEDAAYYYCAKHGGQKPTTKSS SAYSMDGWGQGTLVTVSS	42
1A12M1	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSGYDMSW VRQAPGKCLEWWSVIYPDDGNTYYADSVKGRFTISR NSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKHGGQKPTTKSSS AYGMDGWGQGTLVTVSS	43

Аминокислотные последовательности CDR легкой цепи антитела против 4-1BB или его антигенсвязывающего фрагмента перечислены в таблице 7.

5 [Таблица 7] Примеры CDR легкой цепи антитела против 4-1BB или его антигенсвязывающего фрагмента в соответствии с определением по Kabat

Антитело	CDR L1	SEQ ID NO	CDR L2	SEQ ID NO	CDR L3	SEQ ID NO
1A10	SGSSSNIGNNY VT	54	ADSHRPS	55	ATWDYSLSGYV	56
1A10M4	SGSSSNIGNNY VT	54	ADSHRPS	55	ATWDYSLSGYV	56
1A10M11	SGSSSNIGNNY VT	54	ADSHRPS	55	ATWDYSLSGYV	56
1A10M12	SGSSSNIGNNY VT	54	ADSHRPS	55	ATWDYSLSGYV	56
1A10M13	SGSSSNIGNNY VT	54	ADSHRPS	55	ATWDYSLSGYV	56
1A12	SGSSSNIGNNY VT	54	ADSHRPS	55	ATWDYSLSGYV	56

1A12M1	SGSSSNIGNNY VT	54	ADSHRPS	55	ATWDYSLSGYV	56
--------	-------------------	----	---------	----	-------------	----

Аминокислотные последовательности переменных областей легкой цепи антитела против 4-1BB или его антигенсвязывающего фрагмента перечислены в таблице 8.

5 [Таблица 8] Примеры переменных областей легкой цепи антитела против 4-1BB или его антигенсвязывающего фрагмента в соответствии с определением по Kabat

Антитело	Аминокислотная последовательность VL	SEQ ID NO
1A10	QSVLTQPPSASGTPGRRVTISCSGSSSNIGNNYVTWY QQLPGTAPKLLIYADSHRPSGVPDRFSGSKSGTSASL AISGLRSEDEADYYCATWDYSLSGYVFGCGTKLTVL	52
1A10M4	QSVLTQPPSASGTPGRRVTISCSGSSSNIGNNYVTWY QQLPGTAPKLLIYADSHRPSGVPDRFSGSKSGTSASL AISGLRSEDEADYYCATWDYSLSGYVFGCGTKLTVL	52
1A10M11	QSVLTQPPSASGTPGRRVTISCSGSSSNIGNNYVTWY QQLPGTAPKLLIYADSHRPSGVPDRFSGSKSGTSASL AISGLRSEDEADYYCATWDYSLSGYVFGCGTKLTVL	52
1A10M12	QSVLTQPPSASGTPGQRTISCSGSSSNIGNNYVTWY QQLPGTAPKLLIYADSHRPSGVPDRFSGSKSGTSASL AISGLRSEDEADYYCATWDYSLSGYVFGCGTKLTVL	53
1A10M13	QSVLTQPPSASGTPGQRTISCSGSSSNIGNNYVTWY QQLPGTAPKLLIYADSHRPSGVPDRFSGSKSGTSASL AISGLRSEDEADYYCATWDYSLSGYVFGCGTKLTVL	53
1A12	QSVLTQPPSASGTPGRRVTISCSGSSSNIGNNYVTWY QQLPGTAPKLLIYADSHRPSGVPDRFSGSKSGTSASL AISGLRSEDEADYYCATWDYSLSGYVFGCGTKLTVL	52
1A12M1	QSVLTQPPSASGTPGQRTISCSGSSSNIGNNYVTWY QQLPGTAPKLLIYADSHRPSGVPDRFSGSKSGTSASL AISGLRSEDEADYYCATWDYSLSGYVFGCGTKLTVL	53

10 В одном варианте реализации антитело против 4-1BB или его антигенсвязывающий фрагмент можно сконструировать путем смешивания и сопоставления CDR, перечисленных в таблицах 5 и 7, с учетом поддержания его сродства к 4-1BB. Например, антитело против 4-1BB или его антигенсвязывающий фрагмент может содержать:

(1) CDR-H1 с последовательностью SEQ ID NO: 44, CDR-H2 с последовательностью SEQ ID NO: 46, CDR-H3 с последовательностью SEQ ID NO: 48, CDR-L1 с последовательностью SEQ ID NO: 54, CDR-L2 с последовательностью SEQ ID NO: 55 и CDR-L3 с последовательностью SEQ ID NO: 56;

5 (2) CDR-H1 с последовательностью SEQ ID NO: 44, CDR-H2 с последовательностью SEQ ID NO: 46, CDR-H3 с последовательностью SEQ ID NO: 49, CDR-L1 с последовательностью SEQ ID NO: 54, CDR-L2 с последовательностью SEQ ID NO: 55 и CDR-L3 с последовательностью SEQ ID NO: 56;

10 (3) CDR-H1 с последовательностью SEQ ID NO: 44, CDR-H2 с последовательностью SEQ ID NO: 46, CDR-H3 с последовательностью SEQ ID NO: 50, CDR-L1 с последовательностью SEQ ID NO: 54, CDR-L2 с последовательностью SEQ ID NO: 55 и CDR-L3 с последовательностью SEQ ID NO: 56;

15 (4) CDR-H1 с последовательностью SEQ ID NO: 44, CDR-H2 с последовательностью SEQ ID NO: 46, CDR-H3 с последовательностью SEQ ID NO: 49, CDR-L1 с последовательностью SEQ ID NO: 54, CDR-L2 с последовательностью SEQ ID NO: 55 и CDR-L3 с последовательностью SEQ ID NO: 56;

или

20 (5) CDR-H1 с последовательностью SEQ ID NO: 45, CDR-H2 с последовательностью SEQ ID NO: 47, CDR-H3 с последовательностью SEQ ID NO: 51, CDR-L1 с последовательностью SEQ ID NO: 54, CDR-L2 с последовательностью SEQ ID NO: 55 и CDR-L3 с последовательностью SEQ ID NO: 56.

Примеры переменных областей тяжелой цепи и переменных областей легкой цепи антитела или антигенсвязывающего фрагмента перечислены в таблицах 6 и 8.

25 Неограничивающие примеры антитела против 4-1BB или его антигенсвязывающего фрагмента могут включать:

30 переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из последовательностей SEQ ID NO: 39-43, или аминокислотную последовательность, характеризующуюся 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% идентичностью последовательности по отношению к вышеописанным аминокислотным последовательностям; и

35 переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из последовательностей SEQ ID NO: 52 и 53, или аминокислотную последовательность, характеризующуюся 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% идентичностью

последовательности по отношению к вышеописанным аминокислотным последовательностям.

В другом варианте реализации переменные области тяжелой цепи и легкой цепи, описанные в таблицах 6 и 8, можно подходящим образом комбинировать (смешивать и сопоставлять) для получения различных форм антител; например, они могут образовывать одноцепочечное антитело, например, scFv, или доменное антитело, или полноразмерное антитело (например, антитело вида IgG, содержащее две тяжелые цепи и две легкие цепи).

Например, антитело или антигенсвязывающий фрагмент против 4-1BB может содержать:

(1) переменную область тяжелой цепи SEQ ID NO: 39 и переменную область легкой цепи SEQ ID NO: 52;

(2) переменную область тяжелой цепи SEQ ID NO: 40 и переменную область легкой цепи SEQ ID NO: 52;

(3) переменную область тяжелой цепи SEQ ID NO: 41 и переменную область легкой цепи SEQ ID NO: 52;

(4) переменную область тяжелой цепи SEQ ID NO: 40 и переменную область легкой цепи SEQ ID NO: 53;

(5) переменную область тяжелой цепи SEQ ID NO: 41 и переменную область легкой цепи SEQ ID NO: 53;

(6) переменную область тяжелой цепи SEQ ID NO: 42 и переменную область легкой цепи SEQ ID NO: 52;

(7) переменную область тяжелой цепи SEQ ID NO: 43 и переменную область легкой цепи SEQ ID NO: 53.

В еще одном варианте реализации антитело против 4-1BB или его антигенсвязывающий фрагмент может представлять собой scFv (одноцепочечный переменный фрагмент), содержащий:

переменную область тяжелой цепи, содержащую CDR-H1, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 44 и 45, CDR-H2, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 46 и 47, и CDR-H3, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 48 - 51;

переменную область легкой цепи, содержащую CDR-L1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 54, CDR-L2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 55, и CDR-L3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 56; и

пептидный линкер между переменной областью тяжелой цепи и переменной областью легкой цепи.

Конкретнее, антитело против 4-1BB или его антигенсвязывающий фрагмент может представлять собой scFv, содержащий:

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 39 - 43;

5 вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 52 и 53; и

пептидный линкер между вариабельной областью тяжелой цепи и вариабельной областью легкой цепи.

10 Например, антитело против 4-1BB или его фрагмент могут представлять собой scFv, содержащий:

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из последовательностей SEQ ID NO: 39-43, или аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по 15 меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности по отношению к вышеописанным аминокислотным последовательностям; и

вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из последовательностей SEQ ID NO: 52 и 53, или 20 аминокислотную последовательность, характеризующуюся 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% идентичностью последовательности по отношению к вышеописанным аминокислотным последовательностям; и

25 пептидный линкер между вариабельной областью тяжелой цепи и вариабельной областью легкой цепи.

Например, антитело против 4-1BB или его антигенсвязывающий фрагмент может представлять собой scFv, содержащий:

30 (1) вариабельную область тяжелой цепи SEQ ID NO: 39 и вариабельную область легкой цепи SEQ ID NO: 52;

(2) вариабельную область тяжелой цепи SEQ ID NO: 40 и вариабельную область легкой цепи SEQ ID NO: 52;

(3) вариабельную область тяжелой цепи SEQ ID NO: 41 и вариабельную область легкой цепи SEQ ID NO: 52;

35 (4) вариабельную область тяжелой цепи SEQ ID NO: 40 и вариабельную область легкой цепи SEQ ID NO: 53;

(5) вариабельную область тяжелой цепи SEQ ID NO: 41 и вариабельную область

легкой цепи SEQ ID NO: 53;

(6) переменную область тяжелой цепи SEQ ID NO: 42 и переменную область легкой цепи SEQ ID NO: 52;

5 (7) переменную область тяжелой цепи SEQ ID NO: 43 и переменную область легкой цепи SEQ ID NO: 53; и

пептидный линкер между переменной областью тяжелой цепи и переменной областью легкой цепи.

В настоящем изобретении scFv против 4-1BB может содержать переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи в любом порядке. Например, scFv против 4-1BB может содержать переменную область легкой цепи и переменную область тяжелой цепи в порядке от N-конца к C-концу. В качестве альтернативы, scFv против 4-1BB может содержать переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи в порядке от N-конца к C-концу.

В одном варианте реализации указанная переменная область тяжелой цепи и указанная переменная область легкой цепи в scFv могут быть связаны посредством подходящего пептидного линкера. Например, пептидный линкер может представлять собой (GGGS)₂, (GGGS)₃, (GGGS)₄ или (GS)₉.

Каждую из переменных областей тяжелой цепи и переменных областей легкой цепи, описанных в настоящем документе, можно комбинировать с различными константными областями тяжелой цепи и легкой цепи с образованием тяжелой цепи и легкой цепи интактного антитела, соответственно.

Указанные антитела против 4-1BB могут быть пригодны для терапии, например, лечения различных видов рака и т.д.; их также можно применять в диагностических и прогностических целях.

25 Антитела согласно настоящему изобретению характеризуются конкретными функциональными признаками или свойствами антител. Например, указанные антитела специфично связываются с 4-1BB человека и могут связываться с 4-1BB, полученным из организма некоторых других видов животных, например, 4-1BB обезьяны, например, яванского макака, макаки-резуса, однако могут по существу не связываться с 4-1BB, полученным из организма некоторых других видов животных, например, 4-1BB мыши. Антитело согласно настоящему изобретению предпочтительно связывается с 4-1BB человека с высоким сродством.

Связывание антитела согласно настоящему изобретению с 4-1BB можно оценить с использованием одного или более способов, хорошо известных в данной области техники. Например, в предпочтительном варианте реализации указанное антитело можно протестировать с помощью анализа на основе проточной цитометрии, в котором антитело реагирует с линией клеток, экспрессирующих 4-1BB человека, например, клетками CHO,

трансфицированными с целью экспрессии 4-1BB, например, 4-1BB человека или 4-1BB обезьяны, например, макака-резуса или яванского макака, или 4-1BB мыши, на их клеточной поверхности. Другие подходящие клетки для применения в анализе на основе проточной цитометрии включают CD4⁺ активированные Т-клетки, стимулированные антителом против CD3 и экспрессирующие нативный 4-1BB. Другие подходящие виды анализа связывания включают анализ на основе твердофазного ИФА, например, с использованием рекомбинантного белка 4-1BB. В качестве дополнения или альтернативы, связывание антитела, включая кинетику связывания (например, значение KD), можно проанализировать посредством анализа Octet. Например, значения сродства связывания антитела против 4-1BB или его антигенсвязывающего фрагмента согласно настоящему изобретению с 4-1BB человека включают значения с константой диссоциации или KD 1×10^{-6} М или менее, 1×10^{-7} М или менее, 1×10^{-8} М или менее, 1×10^{-9} М или менее, 1×10^{-10} М или менее или $1,80 \times 10^{-10}$ М или менее.

Без ограничения, антитело против 4-1BB или его фрагмент, антитело против B7-H4 или его фрагмент и/или биспецифичное антитело могут представлять собой химерное антитело, гуманизированное антитело или полностью человеческое антитело. В одном аспекте указанное антитело или его фрагмент не встречаются в природе или синтезированы химическим или рекомбинантным путем. Учитывая, что каждое из этих антител может связываться с 4-1BB (например, 4-1BB человека) и/или с B7-H4 (например, B7-H4 человека), последовательности CDR или последовательности VH и VL, описанные выше, можно «смешивать и сопоставлять» для создания других связывающих молекул против 4-1BB и/или других связывающих молекул против B7-H4. Предпочтительным является смешивание и сопоставление последовательностей CDR или цепей VH и VL, например, замена последовательности VH из конкретной пары VH/VL структурно аналогичной последовательностью VH. Аналогичным образом, последовательность VL из конкретной пары VH/VL предпочтительно заменяют структурно аналогичной последовательностью VL.

Биспецифичное антитело против B7-H4/4-1BB

Биспецифичное антитело, описанное в настоящем документе, может содержать:

- (1) антитело против B7-H4 или его антигенсвязывающий фрагмент, способные специфично распознавать белок B7-H4 и/или связываться с ним; и
- (2) антитело против 4-1BB или его антигенсвязывающий фрагмент, способные специфично распознавать белок 4-1BB и/или связываться с ним.

Указанное биспецифичное антитело может связываться как с B7-H4, так и с 4-1BB. В биспецифичном антителе антитело против B7-H4 или его антигенсвязывающий фрагмент и антитело против 4-1BB или его антигенсвязывающий фрагмент соответствуют вышеприведенному описанию.

Биспецифичное антитело может обладать преимуществами благодаря функциям антитела против В7-Н4 или его фрагмента и/или антитела против 4-1ВВ или его фрагмента. В некоторых вариантах реализации за счет антитела против В7-Н4 или его антигенсвязывающего фрагмента биспецифичное антитело может обладать способностью усиливать секрецию цитокинов. В некоторых вариантах реализации за счет антитела против 4-1ВВ или его антигенсвязывающего фрагмента биспецифичное антитело может обладать способностью связываться с 4-1ВВ человека и проявлять способность активировать Т-клетки. Биспецифичное антитело против В7-Н4/4-1ВВ может активировать сигнальный путь 4-1ВВ в условиях опухолевых клеток, экспрессирующих В7-Н4. Кроме того, антитело против 4-1ВВ или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащиеся в биспецифичном антителе, могут характеризоваться локализацией и/или активацией только в микроокружении опухоли (ТМЕ) и/или значительным снижением токсичности по отношению к печени по сравнению с ранее существовавшими антителами против 4-1ВВ с сохранением эффективности усиления иммунного ответа и/или лечения опухоли.

Другие средства, с помощью которых можно оценить способность антитела стимулировать иммунный ответ, включают способность антитела ингибировать рост опухоли, например, в модели опухолевого трансплантата *in vivo*.

В биспецифичном антителе, содержащем фрагмент, способный обеспечивать адресное воздействие по отношению к В7-Н4, и фрагмент, способный обеспечивать адресное воздействие по отношению к 4-1ВВ, один из фрагментов, способных обеспечивать адресное воздействие по отношению к В7-Н4, и фрагмента, способного обеспечивать адресное воздействие по отношению к 4-1ВВ, может представлять собой полноразмерное антитело, а другой может представлять собой антигенсвязывающий фрагмент (например, scFv), содержащий CDR тяжелой цепи, CDR легкой цепи или их комбинацию, но не ограничиваться ими. Полноразмерное антитело, способное обеспечивать адресное воздействие по отношению к одному из белков В7-Н4 и 4-1ВВ, и антигенсвязывающий фрагмент, способный обеспечивать адресное воздействие по отношению к другому белку, могут быть химически связаны (например, ковалентно связаны) непосредственно или через пептидный линкер. Антигенсвязывающий фрагмент (например, scFv) может быть непосредственно или через пептидный линкер связан с N-концом полноразмерного антитела (например, N-концом легкой цепи или тяжелой цепи полноразмерного антитела) и/или С-концом полноразмерного антитела (например, С-концом тяжелой цепи (или Fc- или CH3-домена) полноразмерного антитела).

В одном варианте реализации биспецифичное антитело может содержать полноразмерное антитело против В7-Н4, антигенсвязывающий фрагмент (например, scFv) антитела против 4-1ВВ и пептидный линкер между ними. В другом варианте реализации биспецифичное антитело может содержать полноразмерное антитело против 4-1ВВ,

антигенсвязывающий фрагмент (например, scFv) антитела против B7-H4 и пептидный линкер между ними.

В одном варианте реализации scFv, содержащийся в биспецифичном антителе, может содержать переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи в любом порядке. Например, scFv, содержащийся в биспецифичном антителе, может содержать переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи в направлении от N-конца к C-концу, и, необязательно, пептидный линкер между ними, или, в качестве альтернативы, scFv, содержащийся в биспецифичном антителе, может содержать переменную область легкой цепи и переменную область тяжелой цепи в направлении от N-конца к C-концу, и, необязательно, пептидный линкер между ними.

В одном варианте реализации биспецифичное антитело против B7-H4/4-1BB активирует сигнальный путь 4-1BB и, как следствие, иммунный ответ, в зависимости от B7-H4, экспрессируемого на клеточных поверхностях.

Если биспецифичное антитело содержит полноразмерное антитело против B7-H4 и scFv против 4-1BB, указанное биспецифичное антитело может содержать:

- (i) первый полипептид, содержащий в направлении от N-конца к C-концу: тяжелую цепь антитела против B7-H4, необязательно, пептидный линкер (первый пептидный линкер), и scFv против 4-1BB; и
- (ii) второй полипептид, содержащий легкую цепь антитела против B7-H4, причем scFv против 4-1BB может содержать в направлении от N-конца к C-концу: переменную область легкой цепи антитела против 4-1BB, необязательно, пептидный линкер (второй пептидный линкер), и переменную область тяжелой цепи антитела против 4-1BB.

В качестве альтернативы, биспецифичное антитело может содержать:

- (i) первый полипептид, содержащий в направлении от N-конца к C-концу: тяжелую цепь антитела против B7-H4, необязательно, пептидный линкер (первый пептидный линкер), и scFv против 4-1BB; и
- (ii) второй полипептид, содержащий легкую цепь антитела против B7-H4, причем scFv против 4-1BB может содержать в направлении от N-конца к C-концу: переменную область тяжелой цепи антитела против 4-1BB, необязательно, пептидный линкер (второй пептидный линкер), и переменную область легкой цепи антитела против 4-1BB.

В качестве альтернативы, биспецифичное антитело может содержать:

- (i) первый полипептид, содержащий в направлении от N-конца к C-концу: scFv против 4-1BB,

необязательно, пептидный линкер (первый пептидный линкер), и тяжелую цепь антитела против B7-H4; и

(ii) второй полипептид, содержащий легкую цепь антитела против B7-H4, причем scFv против 4-1BB может содержать в направлении от N-конца к C-концу:

5
вариабельную область легкой цепи антитела против 4-1BB, необязательно, пептидный линкер (второй пептидный линкер), и вариабельную область тяжелой цепи антитела против 4-1BB.

В качестве альтернативы, биспецифичное антитело может содержать:

(i) первый полипептид, содержащий в направлении от N-конца к C-концу:
10 scFv против 4-1BB,

необязательно, пептидный линкер (первый пептидный линкер), и тяжелую цепь антитела против B7-H4; и

(ii) второй полипептид, содержащий легкую цепь антитела против B7-H4, причем scFv против 4-1BB может содержать в направлении от N-конца к C-концу:
15 вариабельную область тяжелой цепи антитела против 4-1BB, необязательно, пептидный линкер (второй пептидный линкер), и вариабельную область легкой цепи антитела против 4-1BB.

В еще одном варианте реализации как фрагмент, способный обеспечивать адресное воздействие по отношению к B7-H4, так и фрагмент, способный обеспечивать
20 адресное воздействие по отношению к 4-1BB, содержащиеся в биспецифичном антителе, могут представлять собой полноразмерное антитело или антигенсвязывающий фрагмент, содержащий CDR тяжелой цепи, CDR легкой цепи или их комбинацию, связанные друг с другом непосредственно или через пептидный линкер.

Учитывая, что каждое из антител может связываться как с 4-1BB (например, 4-1BB
25 человека), так и с B7-H4 (например, B7-H4 человека), последовательности CDR или VH (вариабельной области тяжелой цепи) и VL (вариабельной области легкой цепи), описанные в настоящем документе, можно «смешивать и сопоставлять» для создания других биспецифичных молекул, связывающихся с B7-H4/4-1BB.

В еще одном варианте реализации как фрагмент, способный обеспечивать
30 адресное воздействие по отношению к B7-H4, так и фрагмент, способный обеспечивать адресное воздействие по отношению к 4-1BB, могут представлять собой полноразмерное антитело или антигенсвязывающий фрагмент, содержащие CDR тяжелой цепи, CDR легкой цепи или их комбинацию.

В еще одном варианте реализации указанное биспецифичное антитело может
35 находиться в гетеродимерной форме, содержащей первое плечо, содержащее пару из первой тяжелой цепи и первой легкой цепи, способную обеспечивать адресное воздействие по отношению к одному из белков B7-H4 и 4-1BB, и второе плечо, содержащее

пару из второй тяжелой цепи и второй легкой цепи, способную обеспечивать адресное воздействие по отношению к другому белку.

В одном варианте реализации полноразмерное антитело может находиться в форме полноразмерного иммуноглобулина (например, IgG, IgM, IgA, IgE или IgD, например, IgG человека, IgM человека, IgA человека, IgE человека или IgD человека), а антигенсвязывающий фрагмент может быть выбран из группы, состоящей из Fab, Fab', F(ab')₂, Fd, Fv, scFv, одноцепочечных антител, sdFv и т.п., как описано выше. Например, полноразмерное антитело может находиться в форме полноразмерного IgG человека (IgG1 человека, IgG2 человека, IgG3 человека или IgG4 человека), а антигенсвязывающий фрагмент может представлять собой scFv.

Пептидный линкер

Применение пептидного линкера для биспецифичного антитела может привести к высокой чистоте антитела. Это означает, что для обеспечения высокой чистоты антитела указанное биспецифичное антитело может содержать пептидный линкер между тяжелой цепью и scFv в первом полипептиде (первый пептидный линкер) и/или между переменными областями тяжелой и легкой цепи в scFv (второй пептидный линкер).

В настоящем документе термин «пептидный линкер» может представлять собой пептидный линкер, содержащий любое количество аминокислот от 1 до 100, в частности, от 2 до 50, и может включать любые виды аминокислот без каких-либо ограничений. Пептидный линкер может включать, например, остатки Gly, Asn и/или Ser, а также нейтральные аминокислоты, например, Thr и/или Ala. Аминокислотные последовательности, подходящие для пептидного линкера, могут являться последовательностями, известными в соответствующей области техники. Между тем, длину пептидного линкера можно определять по-разному с тем ограничением, чтобы это не влияло на функции полипептида и/или scFv. Например, пептидный линкер можно сформировать путем включения в общей сложности от приблизительно 1 до приблизительно 100, от приблизительно 2 до приблизительно 50 или от приблизительно 5 до приблизительно 25 (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 или 25) одной или более аминокислот из группы, состоящей из Gly, Asn, Ser, Thr и Ala. В одном варианте реализации пептидный линкер может быть представлен как (GmSl)_n (m, l и n независимо представляют собой целое число от приблизительно 1 до приблизительно 10, в частности, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10). В одном варианте реализации пептидный линкер может представлять собой аминокислоты (GGGGS)₂, (GGGGS)₃, (GGGGS)₄ или (GS)₉, но не ограничиваться ими.

Вариабельные антитела

Например, антитело, описанное в данной заявке, может содержать последовательность гибкого линкера, или может быть модифицировано путем добавления

функциональной группы (например, ПЭГ, лекарственного средства, токсина или метки).

Антитела или варианты, описанные в настоящем документе, могут содержать производные, модифицированные, например, посредством ковалентного присоединения молекулы любого типа к антителу, при условии, что ковалентное присоединение не
5 препятствует связыванию антитела с антигеном (например, эпитопом). Например, без ограничений, антитела могут быть модифицированы, например, по меньшей мере, одним способом, выбранным из группы, состоящей из гликозилирования, ацетилирования, пэгилирования, фосфорилирования, фосфорилирования, амидирования, модификации известными защитными/блокирующими группами, протеолиза, связывания с клеточным
10 лигандом или другим белком и т. п. Любую из многочисленных химических модификаций можно осуществить известными способами, включая специфичное химическое расщепление, ацетилирование, формилирование, метаболический синтез туникамицина и т.д., но не ограничиваясь ими. Кроме того, антитела могут содержать одну или более неклассических аминокислот.

15 Для некоторых вариантов применения, включая применение антител у людей *in vivo* и в анализе обнаружения *in vitro*, может быть предпочтительно применение химерных, гуманизированных антител или антител человека. Способы получения химерных антител или гуманизированных антител известны в данной области техники.

В еще одном варианте реализации ДНК, кодирующую желательные антитела,
20 можно выделять и секвенировать с использованием стандартных процедур. Выделенные и субклонированные клетки гибридомы являются предпочтительным источником такой ДНК. После выделения ДНК можно поместить в экспрессирующие векторы, которыми затем трансфицируют прокариотические или эукариотические клетки-хозяева, например, клетки *E. coli*, клетки обезьяны COS, клетки яичника китайского хомячка (CHO) или клетки
25 миеломы, которые в противном случае не продуцируют иммуноглобулины.

В настоящем изобретении предложен выделенный полинуклеотид, кодирующий биспецифичное антитело против B7-H4/4-1BB, антитело против B7-H4, антитело против 4-1BB или его антигенсвязывающий фрагмент.

30 В одном варианте реализации может быть предложен экспрессирующий вектор, содержащий выделенный полинуклеотид.

В одном варианте реализации может быть предложена гибридная клетка, содержащая выделенный полинуклеотид, кодирующий антитело или антигенсвязывающий фрагмент согласно настоящему изобретению, или экспрессирующий вектор, включающий их.

35 Кроме того, используя обычные технологии рекомбинантных ДНК, можно встроить один или более CDR антитела в каркасные области, например, в каркасные области человека с целью гуманизации антитела животного, не являющегося человеком.

Каркасные области могут представлять собой встречающиеся в природе или консенсусные каркасные области, предпочтительно каркасные области человека (перечень каркасных областей человека см., например, в Chothia et al., J. Mol. Biol. 278: 457-479 (1998)). Например, полинуклеотид, полученный путем комбинирования каркасных областей и CDR, кодирует антитело, специфично связывающееся с по меньшей мере одним эпитопом желательного полипептида, например, LIGHT. В каркасные области предпочтительно можно ввести одну или более аминокислотных замен, и, предпочтительно, указанные аминокислотные замены улучшают связывание антитела с его антигеном (или эпитопом). Кроме того, такие способы можно применять для получения аминокислотных замен или делеций одного или более из остатков цистеина вариательной области, участвующих в образовании внутрицепочечной дисульфидной связи, с целью получения молекул антител, в которых нет одной или более внутрицепочечных дисульфидных связей. Другие изменения полинуклеотида входят в рамки настоящего изобретения и находятся в области компетенции специалистов в данной области техники.

Кроме того, для введения мутаций в нуклеотидную последовательность, кодирующую антитело в соответствии с настоящим изобретением, можно применять стандартные методики, известные специалистам в данной области техники.

В настоящем документе «тяжелый компонент» биспецифического антитела против B7-H4/4-1BB согласно настоящему изобретению может содержать (1) тяжелую цепь антитела против B7-H4 и (2) вариательную область тяжелой цепи и вариательную область легкой цепи антитела против 4-1BB, если биспецифическое антитело содержит полноразмерное антитело против B7-H4 и scFv против 4-1BB; или может содержать (1) тяжелую цепь антитела против 4-1BB и (2) вариательную область тяжелой цепи и вариательную область легкой цепи антитела против B7-H4, если биспецифическое антитело содержит полноразмерное антитело против 4-1BB и scFv против B7-H4.

В настоящем документе «легкий компонент» биспецифического антитела против B7-H4/4-1BB согласно настоящему изобретению может содержать: легкую цепь антитела против B7-H4, если биспецифическое антитело содержит полноразмерное антитело против B7-H4 и scFv против 4-1BB; или может содержать легкую цепь антитела против 4-1BB, если биспецифическое антитело содержит полноразмерное антитело против 4-1BB и scFv против B7-H4.

Терапевтическое применение биспецифического антитела

Биспецифическое антитело, предложенное в настоящем документе, способно одновременно связываться с белком B7-H4 и белком 4-1BB на поверхности клеток, тем самым демонстрируя улучшенные эффекты в иммунотерапии и/или терапии рака, например, путем активации иммунного ответа в микроокружении опухоли. Учитывая способность биспецифических антител согласно настоящему изобретению связываться с

белком В7-Н4 и стимулировать антиген-специфичные Т-клеточные реакции, в настоящем изобретении также предложена композиция или способы применения антител согласно настоящему изобретению *in vitro* и *in vivo* для стимуляции, усиления или положительной регуляции антиген-специфичных Т-клеточных реакций.

5 В одном варианте реализации предложена фармацевтическая композиция, содержащая биспецифичное антитело или антитело против В7-Н4 или антитело против 4-1ВВ, описанные выше. Фармацевтическая композиция может дополнительно содержать фармацевтически приемлемый носитель. Указанную фармацевтическую композицию можно применять для стимуляции иммунного ответа (например, антиген-специфичного Т-клеточного ответа) и/или лечения и/или профилактики заболевания, ассоциированного с В7-Н4, 4-1ВВ или обоими из них.

В еще одном варианте реализации предложено применение биспецифичного антитела или антитела против В7-Н4 для профилактики или лечения заболевания, связанного с В7-Н4.

15 В еще одном варианте реализации предложен способ стимуляции иммунного ответа (например, антиген-специфичного Т-клеточного ответа) и/или лечения и/или профилактики заболевания, ассоциированного с В7-Н4, 4-1ВВ или обоими из них, например рака, у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение указанному субъекту фармацевтически эффективного количества биспецифичного антитела или фармацевтической композиции. Субъект может нуждаться в стимуляции иммунного ответа (например, антиген-специфичного Т-клеточного ответа) и/или лечении и/или профилактике заболевания, ассоциированного с В7-Н4, 4-1ВВ или обоими из них, например, рака. Указанный способ может дополнительно включать этап выявления субъекта, нуждающегося в стимуляции иммунного ответа, или лечении и/или профилактике заболевания, ассоциированного с В7-Н4, 4-1ВВ или обоими из них, до этапа введения.

В еще одном варианте реализации предложено применение биспецифичного антитела или фармацевтической композиции для стимуляции иммунного ответа (например, антиген-специфичного Т-клеточного ответа) и/или лечения и/или профилактики заболевания, ассоциированного с В7-Н4, 4-1ВВ или обоими из них, например, рака. В еще одном варианте реализации предложено применение биспецифичного антитела для получения лекарственного средства для стимуляции иммунного ответа (например, антиген-специфичного Т-клеточного ответа) и/или лечения и/или профилактики заболевания, ассоциированного с В7-Н4, 4-1ВВ или обоими из них, например, рака.

В одном варианте реализации субъект может быть выбран из млекопитающих, включая людей, обезьян, крыс, мышей, собак, кошек, морских свинок, кроликов, крыс, мышей, лошадей, крупного рогатого скота, коров и т.д., или клетки или ткани, полученной из них, но не ограничиваться ими. Например, субъект может представлять собой субъекта,

нуждающегося в стимуляции иммунного ответа (например, антиген-специфичного Т-клеточного ответа) и/или лечении и/или профилактики заболевания, ассоциированного с B7-H4, 4-1BB или обоими из них, например, рака. Например, субъект может представлять собой млекопитающее (например, человека), страдающее от рака. В другом варианте реализации субъект может представлять собой клетку, отделенную (выделенную) от организма млекопитающего, например, млекопитающего, страдающего заболеванием, выбранным из злокачественных заболеваний, инфекционных заболеваний, аутоиммунных реакций, расстройств нервной системы и т.п. (например, раковую клетку или клетку, отделенную (выделенную) от области организма млекопитающего, пораженной инфекцией, или Т-клетку, например, опухоль-инфильтрирующий Т-лимфоцит, CD4+ Т-клетку, CD8+ Т-клетку или их комбинация). В конкретном варианте реализации заболевание может представлять собой заболевание, ассоциированное с экспрессией или высокой экспрессией (сверхэкспрессией) B7-H4, например, указанное заболевание может представлять собой рак, ассоциированный с экспрессией или высокой экспрессией (сверхэкспрессией) B7-H4. Например, термин «рак, ассоциированный с высокой экспрессией B7-H4» может относиться к раку, связанному с раковой клеткой, характеризующейся более высоким уровнем экспрессии B7-H4 по сравнению с раковой клеткой, не экспрессирующей B7-H4 (например, раковой клеточной линии SK-BR3, CAMA-1 и т. д.).

В фармацевтических композициях, способах и/или вариантах применения, предложенных в настоящем документе, заболевание, ассоциированное с B7-H4, 4-1BB или обоими из них, может представлять собой заболевание, ассоциированное с активацией (например, аномальной активацией или сверхактивацией) и/или сверхпродукцией (сверхэкспрессией) B7-H4, 4-1BB или обоих из них. Например, заболевание может представлять собой рак или инфекцию.

Рак может представлять собой солидный рак или гематологический рак. Рак может представлять собой одно или более из заболеваний, выбранных из группы, состоящей из рака молочной железы, рака толстой кишки, рака желудка, рака легкого (например, плоскоклеточной карциномы легкого, мелкоклеточного рака легкого, немелкоклеточного рака легкого, аденокарциномы легкого), карциномы брюшины, рака кожи, плоскоклеточной карциномы, меланомы кожи или глазного яблока, рака прямой кишки, рака, расположенного вблизи ануса, рака пищевода, опухоли тонкого кишечника, рака эндокринной железы, рака паращитовидной железы, рака надпочечников, саркомы мягких тканей, рака уретры, хронического или острого лейкоза, лимфоцитарной лимфомы, гепатомы, рака желудочно-кишечного тракта, рака поджелудочной железы, глиобластомы, рака шейки матки, рака яичника, рака печени, рака мочевого пузыря, гепатоцеллюлярной аденомы, рака толстого кишечника, карциномы эндометрия или карциномы матки, опухоли

слюнной железы, раку почки, рака шейки матки, рака предстательной железы, рака вульвы, рака щитовидной железы, рака головы и шеи, рака головного мозга, рака желчных путей, рака желчного пузыря и т.п., но не ограничиваться ими. Рак может представлять собой первичный рак или метастатический рак.

5 В настоящем документе термин «профилактика и/или лечение рака» может относиться к гибели раковых клеток, ингибированию пролиферации раковых клеток, облегчению симптомов, ассоциированных с раком, ингибированию метастазирования рака и т. д.

10 В настоящем документе термин «стимуляция иммунного ответа» может относиться к активации сигнала 4-1BB, усилению любого иммунного ответа, ассоциированного с 4-1BB, например, активации сигнала, индуцированной 4-1BB (например, активации сигнала NF- κ B, индуцированной 4-1BB, усилению высвобождения цитокина, уничтожению клеток-мишеней иммунными клетками, например, Т-клетками, и т.п., но не ограничиваться этим). В некоторых вариантах реализации усиление иммунного ответа биспецифичным антителом
15 согласно настоящему изобретению может происходить в присутствии B7-H4 (в условиях экспрессии B7-H4).

Конкретная дозировка и схема лечения для любого конкретного пациента зависит от множества факторов, включая конкретные используемые антитела, их вариант или производное, возраст, массу тела, общее состояние здоровья, пол и режим питания
20 пациента, а также время введения, скорость выведения, комбинацию лекарственных средств и тяжесть конкретного заболевания, подлежащего лечению. Используемое количество можно определить с помощью фармакологических и фармакокинетических принципов, хорошо известных в данной области техники.

Введение биспецифичного антитела или антитела против B7-H4 или антитела
25 против 4-1BB можно выполнить по меньшей мере одним путем, выбранным из группы, состоящей из внутрибрюшинного, внутривенного, подкожного, внутрикожного, внутримышечного, интраназального, эпидурального и перорального путей, но не ограничиваясь ими. Биспецифичное антитело или антитело против B7-H4 или против 4-1BB или их композиции можно вводить любым подходящим путем, например, путем
30 вливания или болюсной инъекции, за счет всасывания через эпителий или слизистую оболочку (например, слизистую оболочку полости рта, слизистую оболочку прямой кишки и кишечника и т. д.), и можно вводить вместе с другими биологически активными агентами. Таким образом, фармацевтические композиции, содержащие антигенсвязывающие полипептиды согласно настоящему изобретению, можно вводить перорально,
35 парентерально, интрацестерально, интравагинально, внутрибрюшинно, ректально, местно (например, с помощью порошков, мазей, капель или трансдермального пластыря), буккально или в виде перорального или назального спрея. В контексте настоящей заявки

термин «парентеральный» относится к способам введения, включающим внутривенную, внутримышечную, внутривнутрибрюшинную, интратермальную, внутриопухолевую, подкожную и внутрисуставную инъекцию и вливание.

5 Фармацевтически эффективное количество биспецифичных антител или антител против В7-Н4 или против 4-1ВВ для лечения, подавления, облегчения и/или профилактики воспалительного, иммунного или злокачественного заболевания, расстройства или состояния можно определить с помощью стандартных клинических методик.

10 Фармацевтические композиции могут содержать эффективное количество биспецифичного антитела или антитела против В7-Н4 или антитела против 4-1ВВ и приемлемый носитель. В некоторых вариантах реализации композиция дополнительно включает второй противораковый агент (например, ингибитор иммунных контрольных точек).

Диагностическое применение антитела

15 Сверхэкспрессия и/или избыточная активация В7-Н4 и/или 4-1ВВ наблюдается в биологическом образце (например, клетках, тканях, крови, сыворотке и т. д.) пациента, страдающего определенным видом рака и/или инфекцией (например, опухолевой клетке или ткани, крови или сыворотке у пациента с инфекцией), и/или пациенты, в организме которых есть клетки, сверхэкспрессирующие В7-Н4 и/или 4-1ВВ, вероятно, должны реагировать на лечение биспецифичным антителом или антителом против В7-Н4 или антителом против 4-1ВВ. Соответственно, биспецифичное антитело или антитело против В7-Н4 или против 4-1ВВ согласно настоящему изобретению также можно применять в целях диагностики и прогнозирования.

25 В одном варианте реализации предложена фармацевтическая композиция для диагностики заболевания, ассоциированного с В7-Н4, 4-1ВВ или обоими из них, причем указанная композиция содержит биспецифичное антитело или антитело против В7-Н4 или антитело против 4-1ВВ. В еще одном варианте реализации предложено применение биспецифичного антитела или антитела против В7-Н4 или антитела против 4-1ВВ для диагностики заболевания, ассоциированного с В7-Н4, 4-1ВВ или обоими из них.

30 В способе диагностики и/или способе обнаружения этап обнаружения реакции антиген-антитело или измерения уровня реакции антиген-антитело можно реализовать любым распространенным способом, известным в соответствующей области техники.

В еще одном варианте реализации предложен способ предоставления диагностической информации относительно заболевания, связанного с В7-Н4.

Полинуклеотиды, кодирующие антитела, и способы получения антител

35 В одном варианте реализации предложен полинуклеотид, кодирующий биспецифичное антитело или антитело против В7-Н4 или антитело против 4-1ВВ. В частности, в одном варианте реализации предложен полинуклеотид, кодирующий тяжелую

цепь биспецифичного антитела в форме IgG-scFv. В другом варианте реализации данного изобретения предложен полинуклеотид, кодирующий легкую цепь биспецифичного антитела в форме IgG-scFv. Форма IgG-scFv может относиться к виду биспецифичного антитела, содержащего полноразмерное антитело IgG, способное обеспечивать адресное воздействие по отношению к (связывающееся с) одному из белков B7-H4 и 4-1BB, и фрагмент scFv, способный обеспечивать адресное воздействие по отношению к (связывающийся) другому из них, причем scFv связан с С-концом и/или N-концом полноразмерного антитела IgG непосредственно (без пептидного линкера) или через пептидный линкер.

10 В одном варианте реализации, если биспецифичное антитело в форме IgG-scFv содержит полноразмерное антитело IgG против B7-H4 и фрагмент scFv против 4-1BB, полинуклеотид, кодирующий тяжелую цепь биспецифичного антитела, может кодировать тяжелую цепь полноразмерного антитела IgG против B7-H4 и фрагмент scFv против 4-1BB, связанный с С-концом и/или N-концом полноразмерного антитела IgG непосредственно
15 или через пептидный линкер; а полинуклеотид, кодирующий легкую цепь биспецифичного антитела, может кодировать легкую цепь полноразмерного антитела IgG против B7-H4.

В еще одном варианте реализации, если биспецифичное антитело в форме IgG-scFv содержит полноразмерное антитело IgG против 4-1BB и фрагмент scFv против B7-H4, полинуклеотид, кодирующий тяжелую цепь биспецифичного антитела, может кодировать
20 тяжелую цепь полноразмерного антитела IgG против 4-1BB и фрагмент scFv против B7-H4, связанный с С-концом и/или N-концом полноразмерного антитела IgG непосредственно или через пептидный линкер; а полинуклеотид, кодирующий легкую цепь биспецифичного антитела, может кодировать легкую цепь полноразмерного антитела IgG против 4-1BB.

В еще одном варианте реализации предложен рекомбинантный вектор, содержащий полинуклеотид, кодирующий тяжелую цепь биспецифичного антитела, и/или
25 полинуклеотид, кодирующий легкую цепь биспецифичного антитела. В еще одном варианте реализации предложена рекомбинантная клетка, трансфицированная указанным рекомбинантным вектором.

В одном варианте реализации предложен экспрессирующий вектор, содержащий
30 выделенный полинуклеотид, кодирующий антитело или антигенсвязывающий фрагмент согласно настоящему изобретению.

В еще одном варианте реализации предложен способ получения биспецифичного антитела, включающий экспрессию полинуклеотида, кодирующего тяжелую цепь биспецифичного антитела, полинуклеотида, кодирующего легкую цепь биспецифичного
35 антитела, в клетке. Этап экспрессии полинуклеотида можно выполнять путем культивирования клетки, содержащей полинуклеотид (например, в рекомбинантном векторе), в условиях, обеспечивающих экспрессию указанного полинуклеотида. Указанный

способ может дополнительно включать выделение и/или очистку биспецифичного антитела из клеточной культуры после этапа экспрессии или культивирования.

【Благоприятные эффекты】

Настоящее изобретение относится к биспецифичным антителам, каждое из которых содержит антитело, специфичное по отношению к B7-H4, и антитело, специфичное по отношению к 4-1BB, и вариантам их применения. Биспецифичное антитело против B7-H4/4-1BB может обладать высоким сродством к B7-H4 и/или 4-1BB и быть способным усиливать иммунный ответ и/или лечить опухоль (рак) у млекопитающего при сниженной токсичности по отношению к печени. Настоящее изобретение также относится к моноспецифичному антителу против B7-H4, обладающему функцией ингибирования активности иммунной контрольной точки B7-H4 за счет специфичного связывания, а также обнаружения B7-H4, экспрессируемого в раковых клетках, с высоким сродством.

Описание чертежей

Фиг. 1 представляет собой результат оценки антигенсвязывающей способности антител мыши против B7-H4 с помощью анализа FACS.

Фиг. 2 представляет собой результат оценки антигенсвязывающей способности гуманизированного антитела 16E3H3 M1, измеренной с помощью твердофазного ИФА.

Фиг. 3 представляет собой результат оценки свойства связывания раковых клеток с антителом против B7-H4 с помощью анализа FACS.

Фиг. 4 представляет собой результат оценки активности антитела против B7-H4 как лиганда контрольной точки в Т-клетках путем измерения секреции ИФН- γ Т-клетками.

Фиг. 5 представляет собой результат оценки активности антитела против B7-H4 как лиганда контрольной точки в Т-клетках в зависимости от дозы путем измерения секреции ИФН- γ Т-клетками.

Фиг. 6 представляет собой результат оценки антигенсвязывающей способности биспецифичного антитела против B7-H4/4-1BB по отношению к белкам B7-H4 и 4-1BB человека, измеренной с помощью DACE.

Фиг. 7 представляет собой результат оценки антигенсвязывающей способности биспецифичного антитела против B7-H4/4-1BB по отношению к белкам B7-H4 и 4-1BB обезьяны, измеренной с помощью DACE.

Фиг. 8 представляет собой результат оценки свойства связывания раковых клеток с биспецифичным антителом против B7-H4/4-1BB с помощью анализа FACS.

Фиг. 9 представляет собой результат оценки связывающей способности биспецифичного антитела против B7-H4/4-1BB по отношению к белкам семейства B7, измеренной с помощью твердофазного ИФА.

Фиг. 10 представляет собой результат оценки активности биспецифичного

антитела против В7-Н4/4-1ВВ как лиганда контрольной точки в Т-клетках путем измерения секреции ИФН- γ Т-клетками.

Фиг. 11 представляет собой результат оценки активности биспецифичного антитела против В7-Н4/4-1ВВ как лиганда контрольной точки в Т-клетках в зависимости от дозы путем измерения секреции ИФН- γ Т-клетками.

Фиг. 12 представляет собой результат анализа лизиса клеток-мишеней на основе МПК за счет биспецифичного антитела против В7-Н4/4-1ВВ.

Фиг. 13А-В представляют собой результаты анализа лизиса клеток-мишеней на основе МПК за счет биспецифичного антитела против В7-Н4/4-1ВВ с использованием различных партий МПК.

Фиг. 14 представляет собой результат анализа активности 4-1ВВ *in vitro* при использовании биспецифичного антитела против В7-Н4/4-1ВВ.

Фиг. 15 и 16 представляют собой результаты анализа эффективности (противоопухолевой активности) биспецифичного антитела против В7-Н4/4-1ВВ *in vivo* в зависимости от дозы.

Фиг. 17 представляет собой результат анализа повторного контрольного заражения (противоопухолевой активности) при использовании биспецифичного антитела против В7-Н4/4-1ВВ в зависимости от дозы.

【Способ реализации изобретения】

Далее подробно описаны один или более вариантов реализации настоящего изобретения со ссылкой на следующие примеры. В то же время эти примеры приведены только в иллюстративных целях и не предназначены для ограничения рамок одного или более вариантов реализации настоящего изобретения.

Пример получения 1. Получение антитела против В7-Н4

1-1. Получение моноклонального антитела мыши посредством иммунизации

Моноклональные антитела против В7-Н4 человека получали с помощью следующих процедур. Мышей SJL и Balb/C (Charles River Laboratories, Холлистер, штат Калифорния, США) гипериммунизировали клетками 293, сверхэкспрессирующими рекомбинантный В7-Н4 человека.

В частности, мышам вводили клетки 293, сверхэкспрессирующие В7-Н4 человека, в PBS (5 миллионов/дозу внутривенно) с последующим усилением иммунного ответа путем введения ВКД рекомбинантного белка В7-Н4 человека (4 Dg/дозу внутривенно). Титры в сыворотке оценивали с помощью стандартного твердофазного иммуноферментного анализа (твердофазного ИФА) и FACS после 6-9 инъекций. В-клетки селезенки, полученные от сероположительных по В7-Н4 мышей, сливали с клетками миеломы мыши (Х63.Ag8.653; Американская коллекция типовых культур, Манассас, штат Вирджиния, США) путем электрослияния (Hybrimmune; Harvard Apparatus, Inc., Холлистон,

штат Массачусетс, США). Через 10-14 дней супернатанты гибридом подвергали скринингу на предмет секреции антител с помощью твердофазного ИФА. Затем все положительные клоны размножали и повторно подвергали скринингу на предмет связывания с huB7-H4 с помощью твердофазного ИФА и FACS.

- 5 Выявили три клона гибридом: 16E3H3, 23B6C2 и 73B4F10 (получены из организма мыши SJL, иммунизированной B7-H4). Все клоны положительно связывались с линией клеток, экспрессирующих B7-H4 (CHOK-1 B7-H4, SK-BR-3) и рекомбинантным B7-H4 человека при анализе путем сортировки клеток с активацией флуоресценции (FACS), как показано на фиг. 1. Вариабельные области и CDR выявленных клонов мыши представляют собой:

[Таблица 9]

16E3H3		SEQ ID NO
Вариабельная область тяжелой цепи	QIQLVHSGPELKKPGETVKISCKASGYPFTTYGMNW VKQAPGKGLKWMGWIDTYSGVPTYADDFKGRFAFS LETSASTAYLQINNLKNEATATYFCARRSFWYFDVWG TGTTVTVSS	22
HCDR1	TYGMN	2
HCDR2	WIDTYSGVPTYADDFKG	3
HCDR3	RSFWYFDV	4
Вариабельная область легкой цепи	DVVMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSLVHSNGNT YLHWYLQKPGQSPKLLIYKVSNRFSGVDPDRFSGSGS GTDFTLKIRRVEAEDLGVYFCSQSTHVPWTFGGGTK LEIK	23
LCDR1	RSSQSLVHSNGNTYLH	7
LCDR2	KVSNRFS	9
LCDR3	SQSTHVPWT	10

[Таблица 10]

23B6C2		SEQ ID NO
Вариабельная область тяжелой цепи	QVTLKESGPGILQPSQTLTLTCSFSGFSLSTFGMGVGVWIR QPSGKGLEWLAHIWWDDDKYYNSALKSRLTISKETSKNQI FLKIANVDTTDTATYYCVRKDYGYRGFAYWGQGLTVTS A	24
HCDR1	TFGMGVG	25
HCDR2	HIWWDDDKYYNSALKS	26

HCDR3	KDYYGYRGFAY	27
Вариабельная область легкой цепи	QLVLTQSSSASFSLGASAKLTCTLSSQHHTTYTIEWYQQQPL KPPKYVMELKKDGGSHSTGDGIPDRFSGSSSGADRYLCISN IQPEDEAIYICGVGDTIKEQFVYVFGGGTKVTVL	28
LCDR1	TLSSQHHTTYTIE	29
LCDR2	LKKDGGSHSTGD	30
LCDR3	GVGDTIKEQFVYV	31

[Таблица 11]

73B4F10		SEQ ID NO
Вариабельная область тяжелой цепи	QVQLQQPGTELVKPGASVKLSCKASGYTFTSYWMH WVKQRPGQGLERIGHINPSNGGTNYNEKFKKATLT VDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARSEFYGGTVF AYWGQGLVTVSA	32
HCDR1	SYWMH	33
HCDR2	HINPSNGGTNYNEKFKK	34
HCDR3	SEFYGGTVFAY	35
Вариабельная область легкой цепи	DVLMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSIVHGNGNT YLEWYLQKPGQSPKLLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGS GTDFTLKISRVEAEDLGVYYCFQGSHDPPTFGGGTK LEIK	36
LCDR1	RSSQSIVHGNGNTYLE	37
LCDR2	KVSNRFS	9
LCDR3	FQGSHDPPT	38

1-2. Клонирование и химеризация моноклональных антител мыши

5 Моноклональные антитела мыши 16E3H3, 23B6C2 и 73B4F10 клонировали и химеризовали следующим образом.

Общую РНК выделяли из гибридомных клеток, продуцирующих 16E3H3, 23B6C2 и 73B4F10 мыши, с использованием стандартных способов. Вариабельные домены легкой (VL) и тяжелой цепи (VH) амплифицировали с использованием ОТ-ПЦР с вырожденными праймерами для тяжелой и легкой цепей. Прямые праймеры были специфичны по отношению к N-концевой аминокислотной последовательности областей VL и VH. Соответственно, обратные праймеры LC и HC конструировали для отжига в области константного домена легкой (CL) и константного домена 1 тяжелой цепи (CH1), которые являются высококонсервативными у различных видов животных. Полинуклеотидную

10

последовательность вставок определяли с использованием обычных способов секвенирования. Каждое антитело химеризовали путем клонирования вариабельной области тяжелой цепи мыши в константной области тяжелой цепи IgG1 человека и клонирования вариабельной области легкой цепи в константной области легкой каппа-цепи человека.

1-3. Гуманизация моноклональных антител мыши

Структуру исходного антитела моделировали с помощью компьютерной программы моделирования гомологии. Гуманизированные антитела конструировали с использованием пересадки CDR в комбинации с обратной мутацией. Вкратце, CDR исходных антител пересаживали в акцепторные последовательности человека с получением гуманизированных легких цепей. 16E3H3 выбрали в качестве ведущего среди трех (3) химеризованных клонов. Последовательности гуманизированной тяжелой и легкой цепи клона 16E3H3 представлены в таблицах 12 и 13. Легкую цепь дополнительно модифицировали для удаления посттрансляционной модификации (ПТМ). Модифицированная последовательность легкой цепи приведена в таблице 14 (клон 16E3H3 M1). Константную область антитела, содержащаяся в указанном антителе, можно дополнительно модифицировать путем введения более чем одной мутации или изменения (например, ADCC-редуцирующей мутации (мутация N297A; Cancer Cell, vol.19, issue 1, pp.101-113, и т.д.)) в IgG1 человека.

[Таблица 12] Пример тяжелой цепи IgG1 против B7-H4 (16E3H3 и 16E3H3 M1)

	Аминокислотная последовательность	SEQ ID NO
Полная последовательность	QVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYPTFTYGMNW VKQAPGQGLEWMGWIDTYSGVPT YADDFKGRVTMTR DTSISTAYMELSR LRSDDTAVYFCARRSFWYFDWGA GTTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK DYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKT HTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC WVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYAS TYRWSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTV DKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	11
Вариабельная область	QVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYPTFTYGMNW	1

тяжелой цепи (VH)	VKQAPGQGLEWMGWIDTYSGVPTYADDFKGRVTMTR DTSISTAYMELSRRLRSDDTAVYFCARRSFWYFDVWGA GTTVTVSS	
Каркасная область 1	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYPFT	12
CDR 1	TYGMN	2
Каркасная область 2	WVKQAPGQGLEWMG	13
CDR 2	WIDTYSGVPTYADDFKG	3
Каркасная область 3	RVTMTRDTSISTAYMELSRRLRSDDTAVYFCAR	14
CDR 3	RSFWYFDV	4
Каркасная область 4	WGAGTTVTVSS	15

[Таблица 13] Пример легкой цепи IgG1 против B7-H4 (16E3H3)

	Аминокислотная последовательность	SEQ ID NO
Полная последовательность	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSLVHSNGNTYL HWYLQRPGQSPRLLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTD FTLKISRVEAEDVGVYFCSQSTHVPWTFGGGTKVEIKR TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKV QWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLTK ADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	16
Вариабельная область легкой цепи (VL)	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSLVHSNGNTYL HWYLQRPGQSPRLLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTD FTLKISRVEAEDVGVYFCSQSTHVPWTFGGGTKVEIKR	5
Каркасная область 1	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISC	17
CDR 1 (ДТ)	RSSQSLVHSNGNTYLH	7
Каркасная область 2	WYLQRPGQSPRLLIY	18
CDR 2	KVSNRFS	9
Каркасная область 3	GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYFC	19
CDR 3	SQSTHVPWT	10
Каркасная область 4	FGGGTKVEIKR	20

[Таблица 14] Пример легкой цепи IgG1 против B7-H4 (16E3H3 M1)

5

	Аминокислотная последовательность	SEQ ID NO
Полная	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSLVHSNANTYL	21

последовательность	HWYLQRPGQSPRLLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTD FTLKISRVEAEDVGVYFCSQSTHVPWTFGGGTKVEIKR TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKV QWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLTK ADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	
Вариабельная область легкой цепи (VL)	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSLVHSNANTYL HWYLQRPGQSPRLLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTD FTLKISRVEAEDVGVYFCSQSTHVPWTFGGGTKVEIKR	6
Каркасная область 1	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISC	17
CDR 1 (мутация G29A для удаления PTM)	RSSQSLVHSNANTYLH	8
Каркасная область 2	WYLQRPGQSPRLLIY	18
CDR 2	KVSNRFS	9
Каркасная область 3	GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYFC	19
CDR 3	SQSTHVPWT	10
Каркасная область 4	FGGGTKVEIKR	20

Пример получения 2. Получение антитела против 4-1BB

2-1. Получение полных моноклональных антител человека против 4-1BB

Полные моноклональные антитела человека против 4-1BB получали, как описано в WO2020/111913. В частности, для пэннинга фаговой библиотеки (полученной из KBio Health) против молекул-мишеней выполнили в общей сложности четыре цикла пэннинга с использованием иммунологической пробирки с иммобилизованным 4-1BB (номер доступа NCBI NP_001552.2). Бактериальные колонии, полученные при 3 циклах пэннинга, выращивали в SB с карбенициллином в 96-луночных планшетах с глубокими лунками до появления мутности, после чего в каждую лунку добавляли 10^{11} БОЕ фага-помощника VCSM13. Через 1 час после инфицирования при 37 °C и осторожном встряхивании (80 об/мин) добавляли 70 мкг/мл канамицина и культивировали клетки в течение ночи при 30 C и встряхивании при 200 об/мин. На следующий день планшеты центрифугировали, супернатанты, содержащие фаги, добавляли в планшеты для твердофазного ИФА с иммобилизованным антигеном 4-1BB, заблокированные 3% БСА в PBST. Через 1 ч инкубирования при комнатной температуре планшеты трижды промывали PBST и добавляли антитело против M13. Планшеты инкубировали в течение 1 часа, трижды промывали PBST и измеряли активность связывания с использованием тетраметилбензидина (ТМБ).

Образцы, специфично связывающие 4-1BB, амплифицировали для

секвенирования плазмидной ДНК. Последовательности генов легкой цепи V (VL) и VH Ig анализировали для выявления уникальных последовательностей и определения разнообразия последовательностей.

5 2-2. Получение антител scFv против 4-1BB

Антитела scFv против 4-1BB со структурой (N')-VL-линкер-VH-(C') получали с использованием переменных областей полных моноклональных антител человека против 4-1BB, полученных выше в примере получения 2-1, где аминокислотный остаток "G" в положении 44 переменной области тяжелой цепи заменяли на "C", а аминокислотный остаток "G" в положении 103 переменной области легкой цепи заменяли на "C". Такая аминокислотная замена с «G» на «C» в scFv может способствовать повышению стабильности биспецифичных антител, содержащих scFv в качестве одного фрагмента, специфичного по отношению к мишени. Аминокислотные последовательности полученных scFv против 4-1BB показаны в таблицах 15-21, хотя специалисты в данной области техники могут использовать изменения или модификации аминокислотных последовательностей для конкретных целей, включая применение пептидных линкеров различных типов, например, (GGGG)₂, (GGGG)₃, (GGGG)₄ или (GS)₉.

[Таблица 15] scFv против 4-1BB (1A10)

	Аминокислотная последовательность	SEQ ID NO
Переменная область тяжелой цепи (VH)	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMSW VRQAPGKCLEWWS WISYSGGSIYYADSVKGRFTISRDN NSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARD GQRNSMREFD YWGQGT LTVSS	39
Каркасная область 1	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS	57
CDR 1	SYDMS	44
Каркасная область 2	WVRQAPGKCLEWWS	58
CDR 2	WISYSGGSIYYADSVKG	46
Каркасная область 3	RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR	59
CDR 3	DGQRNSMREFDY	48
Каркасная область 4	WGQGT LTVSS	60
Линкер между VL и VH	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS	68
Переменная область легкой цепи (VL)	QSVLTQPPSASGTPGRRVTIS CGSSSNIGNNYVTWY QQLPGTAPKLLIY ADSHRPSGVPDRFSGSKSGTSASL AISGLRSEDEADYYCAT WDYSLSGYVFGCGTKLTVL	52

Каркасная область 1	QSVLTQPPSASGTPGRRVTISC	61
CDR 1	SGSSSNIGNNYVT	54
Каркасная область 2	WYQQLPGTAPKLLIY	62
CDR 2	ADSHRPS	55
Каркасная область 3	GVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYC	63
CDR 3	ATWDYSLSGYV	56
Каркасная область 4	FGCGTKLTVL	64

[Таблица 16] scFv против 4-1BB (1A10M4)

	Аминокислотная последовательность	SEQ ID NO
Вариабельная область тяжелой цепи (VH)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMSW VRQAPGKCLEWWSWISYSGGSIYYADSVKGRFTISRDN NSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARD <u>DAQRNSMREFD</u> YWGQGTLLTVSS	40
Каркасная область 1	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS	57
CDR 1	SYDMS	44
Каркасная область 2	WVRQAPGKCLEWWS	58
CDR 2	WISYSGGSIYYADSVKGR	46
Каркасная область 3	RFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR	59
CDR 3	DAQRNSMREFDY	49
Каркасная область 4	WGQGTLLTVSS	60
Линкер между VL и VH	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS	68
Вариабельная область легкой цепи (VL)	QSVLTQPPSASGTPGRRVTISCSGSSSNIGNNYVTWY QQLPGTAPKLLIYADSHRPSGVPDRFSGSKSGTSASL AISGLRSEDEADYYCATWDYSLSGYVFGCGTKLTVL	52
Каркасная область 1	QSVLTQPPSASGTPGRRVTISC	61
CDR 1	SGSSSNIGNNYVT	54
Каркасная область 2	WYQQLPGTAPKLLIY	62
CDR 2	ADSHRPS	55
Каркасная область 3	GVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYC	63
CDR 3	ATWDYSLSGYV	56
Каркасная область 4	FGCGTKLTVL	64

[Таблица 17] scFv против 4-1BB (1A10M11)

	Аминокислотная последовательность	SEQ ID
--	-----------------------------------	--------

		NO
Вариабельная область тяжелой цепи (VH)	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSS <u>SYDMSW</u> VRQAPGKCLEWVSWISYSGGSIYYADSVKGRFTISRDN NSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARD <u>DAQRQSMREFD</u> YWGQGT LTVVSS	41
Каркасная область 1	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS	57
CDR 1	SYDMS	44
Каркасная область 2	WVRQAPGKCLEWVS	58
CDR 2	WISYSGGSIYYADSVKGG	46
Каркасная область 3	RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR	59
CDR 3	DAQRQSMREFDY	50
Каркасная область 4	WGQGT LTVVSS	60
Линкер между VL и VH	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS	68
Вариабельная область легкой цепи (VL)	QSVLTQPPSASGTPGRRVTISCSGSSSNIGNNYVTWY QQLPGTAPKLLIY <u>ADSHRPSGVPDRFSGSKSGTSASL</u> AISGLRSEDEADYYCATWDYSLSGYVFGCGTKLTVL	52
Каркасная область 1	QSVLTQPPSASGTPGRRVTISC	61
CDR 1	SGSSSNIGNNYVT	54
Каркасная область 2	WYQQLPGTAPKLLIY	62
CDR 2	ADSHRPS	55
Каркасная область 3	GVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYC	63
CDR 3	ATWDYSLSGYV	56
Каркасная область 4	FGCGTKLTVL	64

[Таблица 18] scFv против 4-1BB (1A10M12)

	Аминокислотная последовательность	SEQ ID NO
Вариабельная область тяжелой цепи (VH)	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSS <u>SYDMSW</u> VRQAPGKCLEWVSWISYSGGSIYYADSVKGRFTISRDN NSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARD <u>AQRNSMREFD</u> YWGQGT LTVVSS	40
Каркасная область 1	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS	57
CDR 1	SYDMS	44
Каркасная область 2	WVRQAPGKCLEWVS	58
CDR 2	WISYSGGSIYYADSVKGG	46
Каркасная область 3	RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR	59

CDR 3	DAQRNSMREFDY	49
Каркасная область 4	WGQGTLVTVSS	60
Линкер между VL и VH	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS	68
Вариабельная область легкой цепи (VL)	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGNNNYVTWY QQLPGTAPKLLIYADSHRPSGVPDRFSGSKSGTSASL AISGLRSEDEADYYCATWDYSLSGYVFGCGTKLTVL	53
Каркасная область 1	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISC	65
CDR 1	SGSSSNIGNNYVT	54
Каркасная область 2	WYQQLPGTAPKLLIY	62
CDR 2	ADSHRPS	55
Каркасная область 3	GVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYC	63
CDR 3	ATWDYSLSGYV	56
Каркасная область 4	FGCGTKLTVL	64

[Таблица 19] scFv против 4-1BB (1A10M13)

	Аминокислотная последовательность	SEQ ID NO
Вариабельная область тяжелой цепи (VH)	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLS CAASGFTF SSYDMSW VRQAPGKCLEWWS WISYSGGSIYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCARD AQRQSMREFDY WGQGTLVTVSS	41
Каркасная область 1	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFS	57
CDR 1	SYDMS	44
Каркасная область 2	WVRQAPGKCLEWWS	58
CDR 2	WISYSGGSIYYADSVKG	46
Каркасная область 3	RFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCAR	59
CDR 3	DAQRQSMREFDY	50
Каркасная область 4	WGQGTLVTVSS	60
Линкер между VL и VH	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS	68
Вариабельная область легкой цепи (VL)	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGNNNYVTWY QQLPGTAPKLLIYADSHRPSGVPDRFSGSKSGTSASLA ISGLRSEDEADYYCATWDYSLSGYVFGCGTKLTVL	53
Каркасная область 1	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISC	65
CDR 1	SGSSSNIGNNYVT	54
Каркасная область 2	WYQQLPGTAPKLLIY	62
CDR 2	ADSHRPS	55

Каркасная область 3	GVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYC	63
CDR 3	ATWDYSLSGYV	56
Каркасная область 4	FGGGTKTVL	64

[Таблица 20] scFv против 4-1BB (1A12)

	Аминокислотная последовательность	SEQ ID NO
Вариабельная область тяжелой цепи (VH)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSGYDMSW VRQAPGKCLEWWSVIYPDDGNTYYADSVKGRFTISRDN NSKNTLYLQMNSLRAEDAAVYYCAKHGGQKPTTKSS SAYGMDGWGQGLTVTVSS	42
Каркасная область 1	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS	57
CDR 1	GYDMS	45
Каркасная область 2	WVRQAPGKCLEWWS	58
CDR 2	VIYPDDGNTYYADSVKG	47
Каркасная область 3	RFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDAAVYYCAK	66
CDR 3	HGGQKPTTKSSSAYGMDG	51
Каркасная область 4	WGQGLTVTVSS	60
Линкер между VL и VH	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS	68
Вариабельная область легкой цепи (VL)	QSVLTQPPSASGTPGRRVTISCSGSSSNIGNNYVTWY QQLPGTAPKLLIYADSHRPSGVPDRFSGSKSGTSASL AISGLRSEDEADYYCATWDYSLSGYVFGCGTKLTVL	52
Каркасная область 1	QSVLTQPPSASGTPGRRVTISC	61
CDR 1	SGSSSNIGNNYVT	54
Каркасная область 2	WYQQLPGTAPKLLIY	62
CDR 2	ADSHRPS	55
Каркасная область 3	GVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYC	63
CDR 3	ATWDYSLSGYV	56
Каркасная область 4	FGCGTKLTVL	64

[Таблица 21] scFv против 4-1BB (1A12M1)

	Аминокислотная последовательность	SEQ ID NO
Вариабельная область тяжелой цепи (VH)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSGYDMSW VRQAPGKCLEWWSVIYPDDGNTYYADSVKGRFTISRDN NSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKHGGQKPTTKSSS	43

	AYGMDGWGQGTLTVSS	
Каркасная область 1	EVQLLES GG LVQP GG SLR L SCAASGFTFS	57
CDR 1	GYDMS	45
Каркасная область 2	WVRQAPGKCLEWVS	58
CDR 2	VIYPDDGNTYYADSVKG	47
Каркасная область 3	RFTISRDN SK N T LYLQ M NSLRAEDTAVYYCAK	67
CDR 3	<u>HGGQKPTTKSSSAYGMDG</u>	51
Каркасная область 4	WGQGT L TVSS	60
Линкер между VL и VH	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS	68
Вариабельная область легкой цепи (VL)	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGNN NY VTWY QQLPGTAPKLLIY <u>ADSHRPS</u> GVPDRFSGSKSGTSASL AISGLRSEDEADYYC <u>ATWDYSLSGYV</u> FGCGTKLTVL	53
Каркасная область 1	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISC	65
CDR 1	SGSSSNIGNN NY VT	54
Каркасная область 2	WYQQLPGTAPKLLIY	62
CDR 2	ADSHRPS	55
Каркасная область 3	GVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYC	63
CDR 3	ATWDYSLSGYV	56
Каркасная область 4	FGCGTKLTVL	64

[Таблица 22] Линкер между IgG1 и scFv

Линкер	Аминокислотная последовательность	SEQ ID NO
(GGGG)4	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS	68
(GS)9	GSGSGSGSGSGSGSGSGS	69

2-3. Получение антител scFv против 4-1BB в форме биспецифичного антитела

5 В качестве типичного примера биспецифичного антитела получили биспецифичные антитела против B7-H4x4-1BB, состоящие из следующих тяжелых и легких компонентов:

(1) Тяжелые компоненты (N'→C')

- 1) тяжелая цепь антитела против B7-H4;
- 2) линкер: (GS)9; и
- 3) scFv против 4-1BB, полученный в примере получения 2-2

10

(2) Легкие компоненты (N'→C')

Легкая цепь антитела против B7-H4

Пример получения 3. Получение биспецифичного антитела против B7-H4/4-

1BB

Клоны IgG против B7-H4 и scFv против 4-1BB, полученные в примере получения 1 и примере получения 2, соответственно, выбрали в качестве примера для получения биспецифичных антител против B7-H4/4-1BB в форме гибрида IgG-scFv, в котором фрагмент антитела scFv против одного антигена присоединен к С-концу IgG против другого антигена. При помещении B7-H4 в компонент, соответствующий полному IgG, использовали IgG1 с мутированным остовом и пониженной ADCC (мутация N297A), а при помещении 4-1BB в компонент, соответствующий полному IgG, использовали IgG4.

В частности, кандидаты биспецифичных антител против B7-H4/4-1BB получали в формате полноразмерного IgG (антитело против B7-H4)-scFv (антитело против 4-1BB). Константную область антитела против B7-H4, содержащуюся в биспецифичном антителе, модифицировали путем введения мутации NA (N297A). Аминокислотные последовательности биспецифичных антител (16E3H3 x1A10 M12 и 16E3H3 M1 x 1A10 M12), полученных в соответствии с этим примером получения, представлены в таблице 23 и таблице 24, соответственно.

Далее в настоящем документе моноспецифичное антитело 16E3H3 M1 также называют M40413, а биспецифичное антитело 16E3H3 M1 x 1A10 M12 также называют B10317.

[Таблица 23]

	16E3H3 x1A10 M12	SEQ ID NO
Тяжелая цепь	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYPTFTYGMNWWKQAPGQG LEWMGWIDTYSGVPTYADDFKGRVTMTRDTSISTAYMELSRLRSDD TAVYFCARRSFWYFDVWGAGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTS GGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL SSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPP CPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKF NWWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRWSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALPAIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKLSLSLSPGKSGSGSGSGSGSG SGSGSGSQSVLTQPPSASGTPGQRTISCSGSSSNIGNNYVTWYQ QLPGTAPKLLIYADSHRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEA DYYCATWDYSLSGYVFGCGTKLTVLGGGGSGGGGSGGGGSGGG GSEVQLLESGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMSWVRQAPGK CLEWVSWISYSGGSIYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAED	70

	TAVYYCARDARNSMREFDYWGQGLTVTVSS	
Легкая цепь	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSLVHSNGNTYLHWYLQRPG QSPRLLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYFC SQSTHVPWTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCL LNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLT SKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	16

[Таблица 24]

	16E3H3 M1 x1A10 M12 (B10317)	SEQ ID NO
Тяжелая цепь	QVQLVQSGAEVVKKPGASVKVSCKASGYPTFTYGMNWWKQAPG QGLEWMGWIDTYSYGVPTVYADDFKGRVTMTRDTSISTAYMELSRL RSDDTAVYFCARRSFWYFDVWGAGTTVTVSSASTKGPSVFPLA PSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAV LQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPK SCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL PPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTP PVLDSGDGFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMHEALHNHYTQ KLSLSLSPGKSGSGSGSGSGSGSGSGSQSVLTQPPSASGTPG QRVTISCSGSSSNIGNNYVTWYQQLPGTAPKLLIYADSHRPSGVP DRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCATWDYSLSGYVFGCG TKLTVLGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLLESGLLVQPGG SLRLSCAASGFTFSSYDMSWVRQAPGKCLEWVSWISYGGSIY YADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDARNS MREFDYWGQGLTVTVSS	71
Легкая цепь	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSLVHSNANTYLHWYLQR PGQSPRLLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDV GVYFCSQSTHVPWTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKS GTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK STYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	21

5 Клонирование биспецифичного антитела выполняли следующим образом: Сегмент ДНК 1 с нуклеотидной последовательностью, кодирующей тяжелую цепь антитела IgG биспецифичного антитела против B7-H4/4-1BB, встраивали в pcDNA 3.4 (Invitrogen, A14697; плаزمида 1), а сегмент ДНК 2 с нуклеотидной последовательностью, кодирующей легкую

цепь антитела IgG биспецифичного антитела против B7-H4/4-1BB, встраивали в pcDNA 3.4 (Invitrogen, A14697; плазмиды 2). После этого сегмент ДНК 3, кодирующий scFv, объединяли с фрагментом сегмента ДНК 1, соответствующим С-концу Fc-области антитела IgG, вставленной в плазмиду 1, с использованием сегмента ДНК 4, кодирующего линкерный пептид длиной 16 аминокислот, состоящий из (GGGGS)₄ (SEQ ID NO: 68), или с использованием сегмента ДНК 5, кодирующего линкерный пептид длиной 18 аминокислот, состоящий из (GS)₉ (SEQ ID NO: 69), для конструирования векторов для экспрессии биспецифичных антител. Кроме того, для стабилизации scFv, как описано в примере получения 2, использовали дополнительную модификацию с целью получения дисульфидного мостика, соединяющего VL103-VH44 (VL103: VL с мутацией G→C в положении 103; VH 44: VH с мутацией G→C в положении 44) с С-концом легкой цепи и С-концом тяжелой цепи, соответственно.

Экспериментальный пример 1. Антигенсвязывающая способность антител против B7-H4

1-1. Подтверждение связывания антитела мыши против B7-H4 с помощью анализа FACS

Для оценки антигенсвязывающих свойств антитела-кандидаты мыши, полученные в соответствии с примером получения 1-1, анализировали на предмет связывания с клетками, экспрессирующими B7-H4 (SK-BR3, CAMA-1 и MDA-MB-468), или клетками, отрицательными по B7-H4 (PANC-1). Вкратце, каждую клетку обрабатывали 100 нМ указанных антител при 4 °C в течение 1 ч. После промывки буфером для FACS (1% БСА в PBS) клетки инкубировали с антителом против Fc IgG мыши, конъюгированным с FITC, при 4 °C в течение 1 часа, а затем подвергали анализу FACS. Как показано на фиг. 1, антитела мыши против B7-H4 связывались с B7-H4-экспрессирующими клетками линий SK-BR3, CAMA-1 и MDA-MB-468, но не с B7-H4-отрицательными PANC-1. В результате клон 16E3H3 продемонстрировал самое высокое сродство связывания с раковыми клетками, экспрессирующими B7-H4, среди трех (3) антител-кандидатов мыши. На основании результатов ранжирования клон 16E3H3 выбрали для гуманизации.

1-2. Антигенсвязывающая способность моноспецифичного антитела против B7-H4 по отношению к белку B7-H4 человека

Для оценки антигенсвязывающей активности гуманизованного антитела 16E3H3 M1 подвергали твердофазному ИФА. Вкратце, на планшетах для твердофазного ИФА иммобилизовали гибриды Fc-белок B7-H4 человека в концентрации 1 мкг/мл в PBS, 100 мкл/лунку при 4 °C в течение ночи, а затем планшеты блокировали с использованием 1% BSA в PBS (200 мкл/лунку) при 37 °C. В каждую лунку добавляли четырехкратные разведения моноклонального антитела, начиная со 100 нМ, и инкубировали в течение 1 часа при 37 °C. Планшеты промывали PBST (0,05% твин-20 в PBS), а затем инкубировали

с ПХ (пероксидазой хрена), конъюгированной с антителом против Fab человека, в течение 1 часа при 37 °С. Планшеты промывали PBST (0,05% твин-20 в PBS), проявляли с помощью субстрата TMB, и анализировали ОП на спектрофотометре при длине волны 450 нм ~ 650 нм. Как показано на фиг. 2, 16E3H3 M1 связывалось с B7-H4 человека в зависимости от дозы. Значение EC50 составляло 0,079 нМ.

Экспериментальный пример 2. Способность моноспецифичного антитела против B7-H4 связываться с клетками

Для оценки свойства связывать опухолевый антиген клон 16E3H3 M1 анализировали на предмет связывания с B7-H4-экспрессирующими клетками млекопитающих с помощью FACS. Вкратце, B7-H4-положительные клетки (MX-1, CAMA-1, SK-BR3 и OVCAR-3) или B7-H4-отрицательные клетки (PANC-1) инкубировали с антителом M40413. После промывки буфером для FACS (1% BSA в PBS) в каждую лунку добавляли антитело против IgG1 человека, конъюгированное с FITC, и инкубировали при 4 °С в течение 45 минут. MFI FITC оценивали с помощью FACS Calibur. На фиг. 3 показано, что клон 16E3H3 M1 связывался с B7-H4-положительными клетками раковых линий в зависимости от дозы.

Экспериментальный пример 3. Активность моноспецифичного антитела против B7-H4 как лиганда контрольной точки в Т-клетках, измеренная по продукции ИФН-γ

Ингибирование активации Т-клеток за счет B7-H4 выполняли с использованием иммобилизованного на планшете рекомбинантного белка B7-H4 (rB7-H4) и МПК здорового донора. МПК здорового донора стимулировали антителом против CD3 с добавлением IgG, BMUR (урелумаб, антитело против 4-1BB производства BMS), M40413 (16E3H3 M1) или эталонного антитела против B7-H4 (FPA150, эталонное антитело от fiveprime) в присутствии контрольного белка (hIgG1) или растворимого rB7-H4 (фиг. 4).

rB7-H4 ясно демонстрировал активность лиганда контрольной точки в Т-клетках. Это можно видеть на графике, приведенном на фиг. 4 и демонстрирующем, что секреция ИФН-γ Т-клетками в планшете с иммобилизованным rB7-H4 была снижена по сравнению с секрецией в планшете с иммобилизованным IgG. С другой стороны, M40413 (график с косой штриховкой) и FPA150 (график с вертикальной штриховкой) блокировали активность лиганда контрольной точки rB7-H4 в Т-клетках, что подтверждалось увеличением уровня секреции ИФН-γ по сравнению с состоянием при обработке IgG (график с серой заливкой) или BMUR (график с белой заливкой).

Это означало, что при B7-H4-опосредованном иммуносупрессивном состоянии другие иммуномодуляторы, например, антитело против 4-1BB, не функционировали. Однако такое опосредованное B7-H4 подавление иммунитета можно было преодолеть с помощью антитела против B7-H4. В совокупности, антитело против B7-H4 согласно настоящему изобретению более эффективно устраняло B7-H4-опосредованную супрессию

Т-клеток по сравнению с антителами, не являвшимися специфичными по отношению к В7-Н4 (скорость восстановления активности Т-клеток: М40413 > FPA150 > BMUR).

Экспериментальный пример 4. Активность антитела против В7-Н4 как лиганда контрольной точки в Т-клетках в зависимости от дозы

5 Для исследования активности антител против В7-Н4 по отношению к блокаде контрольной точки в Т-клетках по реакции стимулированных мононуклеаров периферической крови человека (МПК) измеряли концентрацию ИФН-гамма в супернатанте, секретирuемом Т-клетками. Ингибирование активации Т-клеток за счет В7-Н4 выполняли с использованием иммобилизованного на планшете рекомбинантного белка
10 В7-Н4 и МПК здорового донора. Различные концентрации IgG1 человека, BMUR (антитело против 4-1BB производства BMS) и антител против В7-Н4 - М40413 или FPA150 - инкубировали с МПК в присутствии антитела против CD3 человека, подлежащего тестированию. После культивирования в камере с высокой влажностью и 5% CO₂ при 37 °С в течение 72 часов в супернатанте измеряли концентрацию ИФН-гамма с помощью
15 набора для количественной оценки ИФН-гамма человека (Human IFN-gamma Quantikine Kit, R&D system, SIF50).

Как показано на фиг. 5, М40413 (график с кружками) и FPA150 (график с перевернутыми треугольниками) блокировали активность лиганда контрольной точки гВ7-Н4 в Т-клетках, что подтверждалось повышением уровня секреции ИФН-γ по сравнению с
20 IgG (график с белыми квадратами) или BMUR (график с ромбами). Это означало, что при В7-Н4-опосредованном иммуносупрессивном состоянии другие иммуномодуляторы, например, антитело против 4-1BB, не функционировали. Однако такое опосредованное В7-Н4 подавление иммунитета можно было преодолеть с помощью антитела против В7-Н4. В совокупности, антитело против В7-Н4 согласно настоящему изобретению более
25 эффективно устраняло В7-Н4-опосредованную супрессию Т-клеток по сравнению с антителами, не являвшимися специфичными по отношению к В7-Н4.

Экспериментальный пример 5. Оценка относительной экспрессии В7-Н4 на клеточной поверхности с использованием набора Dako для определения способности связывать антитела

30 Уровень экспрессии В7-Н4 на поверхности клеток количественно определяли на различных раковых линиях клеток с использованием набора для количественного определения QIFIKIT (DAKO) в соответствии с рекомендациями производителя. Вкратце, клетки окрашивали немеченым моноклональным антителом мыши против В7-Н4 (abcam) или очищенным изотипическим контрольным IgG1k мыши (abcam) в насыщающей
35 концентрации. После промывки окрашенные клетки и калибровочные гранулы из набора одновременно метили одним и тем же вторичным антителом козы против IgG мыши, конъюгированным с FITC, из набора. Меченые клетки и калибровочные гранулы

анализировали на проточном цитометре. Линейную регрессию выполняли с использованием значений MFI для калибровочных гранул. ABC (способность связывать антитела) экстраполировали на основе этой линии регрессии, а sABC (удельную ABC) определяли путем вычитания ABC для изотипического контрольного антитела из ABC для антитела против B7-H4. Как показано в таблице 25, sABC определили для 11 линий раковых клеток. CHOK1, PANC1 и MC38 считали линиями B7-H4-отрицательных клеток.

[Таблица 25]

Линия клеток	SABC* [B7-H4]	MFI [B7-H4]	EC50 (нМ) [анализ NF-кВ]	Кратность индукции [анализ NF-кВ]
B-CAG-hB7-H4 MC38	284173	722	0,093	76,08
CAMA-1	47564	135	0,145	44,26
MX-1	43245	127	0,184	62,90
SK-BR3	29850	79,9	0,234	30,79
MDA-MB-468	13984	41	0,403	6,74
OVCAR3	671	7,7	0,288	5,02
HCC1954	411	9,6	0,647	3,01
CHOK1	64	3,7	Неоднозначно	1,49
PANC1	10	6,9	Неоднозначно	1,11
MC38	0	3,8	Неоднозначно	2,32

*SABC – удельная способность связывать антитела

10 **Экспериментальный пример 6. Антигенсвязывающая способность биспецифичных антител против B7-H4/4-1BB по отношению к белкам B7-H4 и 4-1BB человека**

Для оценки антигенсвязывающей активности биспецифичное антитело B10317 (16E3H3 M1 x 1A10M12) подвергали DACE (твёрдофазному ИФА с захватом двух антигенов). Вкратце, на титрационных микропланшетах иммобилизовали белок 4-1BB-Fc человека в концентрации 1 мкг/мл в PBS, 100 мкл/лунку при 4 °C в течение ночи, затем планшеты блокировали 1% БСА в PBS (200 мкл/лунку) при 37 °C. В каждую лунку добавляли трехкратные разведения биспецифичных антител, начиная со 100 нМ, и инкубировали в течение 1 часа при 37 °C. Планшеты промывали PBS/твин, а затем инкубировали с 1% БСА в BSA, содержащим белок B7-H4 his человека, 1 мкг/мл, в течение 1 часа при 37 °C. Планшеты промывали PBST (0,05% твин-20 в PBS), а затем инкубировали с ПХ (пероксидазой хрена), конъюгированной с антителом против his, в течение 1 часа при 37 °C.

После промывки планшеты проявляли с помощью субстрата ТМВ и анализировали на спектрофотометре при длине волны 450 нм ~ 650 нм. Как показано на фиг. 6, В10317 одновременно связывалось как с В7-Н4 человека, так и с 4-1ВВ человека в зависимости от дозы. Значение EC_{50} (нМ) составляло 1,2 нМ.

5 **Экспериментальный пример 7. Антигенсвязывающая способность биспецифичных антител против В7-Н4/4-1ВВ по отношению к белкам В7-Н4 и 4-1ВВ обезьяны**

Для оценки перекрестной реакционной способности биспецифичного антитела указанное биспецифичное антитело подвергали DАСЕ. Вкратце, на титрационных микропланшетах иммобилизовали белок 4-1ВВ-Fc макака-резуса (100 нг/лунку) при 4 °С в течение ночи, затем планшеты блокировали 200 мкл/лунку PBSB (1% БСА в PBS). В каждую лунку добавляли трехкратные разведения В10317, начиная со 100 нМ, и инкубировали при 37 °С в течение 1 часа. Планшеты промывали PBST (0,05% твин-20 в PBS), а затем инкубировали в течение 1 часа при 37 °С с белком В7-Н4-his макака-резуса (100 нг/лунку). Планшеты промывали PBST (0,05% твин-20 в PBS), а затем инкубировали с ПХ (пероксидазой хрена), конъюгированной с антителом против his, в течение 1 часа при 37 °С. После промывки планшеты проявляли с помощью субстрата ТМВ и анализировали на спектрофотометре при длине волны 450 нм ~ 650 нм. Как показано на фиг. 7, В10317 одновременно связывалось с В7-Н4 и 4-1ВВ макака-резуса в зависимости от дозы. Значение EC_{50} (нМ) составляло 2,58 нМ.

15 **Экспериментальный пример 8. Способность биспецифичного антитела против В7-Н4/4-1ВВ связываться с клетками**

Для оценки свойства связывать опухолевый антиген биспецифичное антитело В10317 анализировали на предмет связывания с В7-Н4-экспрессирующими клетками млекопитающих с помощью FACS. Вкратце, В7-Н4-положительные клетки (МХ-1 и САМА-1) инкубировали с антителами В10317. После промывки буфером для FACS (1% БСА в PBS) в каждую лунку добавляли антитело против IgG человека, конъюгированное с FITC, и инкубировали при 4 °С в течение 45 минут. MFI FITC оценивали с помощью FACS Calibur. Как показано на фиг. 8, В10317 связывалось с линиями В7-Н4-положительных раковых клеток в зависимости от дозы.

30 **Экспериментальный пример 9. Средство связывания биспецифичного антитела против В7-Н4/4-1ВВ с белками-мишенями В7-Н4 и 4-1ВВ (ППР)**

В эксперименте с использованием ППР биспецифичное антитело против В7-Н4/4-1ВВ, полученное в примере получения 3, иммобилизовали на проточных ячейках 2, 3 и 4, сохраняя проточную ячейку 1 в качестве эталона, на чипе с белком А, на котором иммобилизовали биспецифичное антитело против В7-Н4/4-1ВВ (В10317) по аминокруппам.

Рекомбинантный белок В7-Н4 (человек/обезьяна) или 4-1ВВ (человек/обезьяна) пропускали через чип в диапазоне концентраций от 100 нМ до 6,25 нМ для В7-Н4 или от 250 нМ до 15,625 нМ для 4-1ВВ при скорости потока 30 мкл/мин в течение 60 секунд с последующей фазой диссоциации в течение 180 секунд. Регенерацию выполняли с использованием 10 мМ глицина-НСI (рН 1,5). Полученные результаты показаны ниже в таблице 26. Как показано в таблице 26, В10317 демонстрировало высокое сродство к В7-Н4 и 4-1ВВ, и его сродство к каждой мишени человека и обезьяны (В7-Н4 или 4-1ВВ) было сопоставимо.

[Таблица 26]

10

Мишень	Вид	Ka (1/Мs)	Kd (Vs)	KD (M)	Rмакс (RU)
В7-Н4	Человек	5,169x10 ⁵	2,254x10 ⁻³	4,361x10 ⁻⁹	13,79
	Обезьяна	6,145x10 ⁵	2,782x10 ⁻³	4,527x10 ⁻⁹	13,60
4-1ВВ	Человек	2,132x10 ⁵	9,706x10 ⁻⁴	4,555x10 ⁻⁹	58,84
	Обезьяна	2,239x10 ⁵	8,986x10 ⁻⁴	4,015x10 ⁻⁹	57,93

Экспериментальный пример 10. Анализ связывания с белками семейства В7.

Для подтверждения специфического связывания биспецифичного антитела против В7-Н4/4-1ВВ с В7-Н4 антитело В10317 подвергали твердофазному ИФА. На титрационных микропланшетах иммобилизовали каждый белок (100 нг/лунку) при 4 °С в течение ночи, затем планшеты блокировали 200 мкл/лунку PBSB (1%(масс./об.) БСА в PBS). В каждую лунку добавляли трехкратные разведения В10317, начиная со 100 нМ, и инкубировали при 37 °С в течение 1 часа. Планшеты промывали PBST (0,05% (об./об.) твин-20 в PBS), а затем инкубировали в течение 1 часа при 37 °С со 100 мкл ПХ, конъюгированной с антителом против Fc (коэффициент разбавления 1:30000) или ПХ, конъюгированной с антителом против Fab (коэффициент разбавления 1:20000). Планшеты промывали PBST (0,05% (об./об.) твин-20 в PBS), а затем проявляли с помощью субстрата ТМВ и анализировали на спектрофотометре при длине волны 450-650 нм. Как показано на фиг. 9, для В10317 подтвердили специфическое связывание с В7-Н4 и отсутствие связывания с другими белками семейства В7.

25

Экспериментальный пример 11. Активность биспецифичного антитела против В7-Н4/4-1ВВ как лиганда контрольной точки в Т-клетках, измеренная по продукции ИФН-γ

Ингибирование активации Т-клеток за счет В7-Н4 выполняли с использованием

иммобилизованного на планшете рекомбинантного белка B7-H4 (rB7-H4) и МПК здорового донора. МПК здорового донора стимулировали антителом против CD3 с добавлением IgG, биспецифичного антитела B10317, Keytruda (антитело против PD-1 от MSD), моноспецифичного антитела M40413 или эталонного антитела против B7-H4 в присутствии 5 контрольного белка (hlgG1) или растворимого rB7-H4 (фиг. 10).

rB7-H4 ясно демонстрировал активность лиганда контрольной точки в Т-клетках. Как показано на фиг. 10, секреция ИФН- γ Т-клетками в планшете с иммобилизованным rB7-H4 была снижена по сравнению с секрецией в планшете с иммобилизованным IgG. С 10 другой стороны, B10317 (график с серой заливкой), M40413 (график с кривой штриховкой) и FPA150 (график с вертикальной штриховкой) блокировали активность лиганда контрольной точки rB7-H4 в Т-клетках, что подтверждалось увеличением уровня секреции ИФН- γ по сравнению с состоянием при обработке IgG (график с черной заливкой) или Keytruda (график с белой заливкой).

Это означало, что при B7-H4-опосредованном иммуносупрессивном состоянии 15 другие иммуномодуляторы, например, антитело против PD-1, не функционировали. Однако такое опосредованное B7-H4 подавление иммунитета можно было преодолеть с помощью антитела против B7-H4 согласно настоящему изобретению. В совокупности, моноспецифичные или биспецифичные антитела против B7-H4 согласно настоящему изобретению более эффективно устраняли B7-H4-опосредованную супрессию Т-клеток по 20 сравнению с контрольными антителами (скорость восстановления активности Т-клеток: B10317 > M40413 \approx FPA150).

Экспериментальный пример 12. Активность биспецифичного антитела против B7-H4/4-1BB как лиганда контрольной точки в Т-клетках в зависимости от дозы в различных системах совместного культивирования МПК.

В том же способе, что и в экспериментальном примере 4, для подтверждения 25 активности B10317 в отношении блокады контрольной точки в Т-клетках измеряли концентрацию ИФН-гамма в супернатанте в различных системах совместного культивирования партии МПК. Как показано на фиг. 11, несмотря на различия уровня ИФН-гамма в супернатанте в зависимости от партии МПК, уровень секреции ИФН-гамма 30 повышался в зависимости от дозы.

Экспериментальный пример 13. Анализ лизиса клеток-мишеней на основе МПК за счет биспецифичного антитела против B7-H4/4-1BB.

МПК человека совместно культивировали с клетками линии SK-BR3 (экспрессирующими B7-H4 человека) в присутствии антитела против CD3 человека и 35 анализируемых антител. Вкратце, МПК (партия № HNU20190711) высевали из расчета $3,0 \times 10^4$ клеток на лунку, а SK-BR3 высевали из расчета $1,0 \times 10^4$ клеток на лунку (соотношение E:T = 1:3). В лунку планшета добавляли биспецифичное антитело B10317 (начиная с 40 нМ,

4-кратные разведения), эталонное антитело FPA150, урелумаб (мАт против 4-1BB производства BMS) или комбинированную экспериментальную группу из моноспецифичных антител против В7-Н4 (M40413) и против 4-1BB (1A10M12) (начиная с 40 нМ, 4-кратные разведения). Через 6 дней культивирования измеряли % лизиса клеток-мишеней с помощью набора для подсчета клеток-8 (ССК-8, Dojindo_СК04-20). Как показано на фиг. 12, антитело против В7-Н4/4-1BB (В10317) индуцировало лизис клеток-мишеней в зависимости от дозы с большей эффективностью по сравнению с урелумабом (агонистическим антителом против 4-1BB), FPA150 или комбинированной экспериментальной группой (комбинацией моноспецифичных антител против В7-Н4 и против 4-1BB). Используя тот же способ, что и выше, выполнили анализ способности В10317 к лизису клеток-мишеней с использованием различных партий МПК; результаты показаны на фиг. 13А (SK-BR3) и фиг. 13В (САМА-1). Как показано на фиг. 13А и 13b, В10317 индуцировало лизис клеток-мишеней в зависимости от дозы даже при использовании различных партий МПК.

15 **Экспериментальный пример 14. Анализ активации 4-1BB с использованием биспецифичного антитела in vitro в различных условиях экспрессии В7-Н4.**

Активность биспецифичного антитела В10317 против В7-Н4/4-1BB по отношению к 4-1BB анализировали in vitro с использованием системы Promega Kit. Вкратце, клетки каждой из различных линий (МС38-hВ7-Н4: $2,5 \times 10^4$, САМА-1: $2,5 \times 10^4$, SK-BR3: $2,5 \times 10^4$, НСС1806-hВ7-Н4: $2,5 \times 10^4$, ОVСAR3: $2,5 \times 10^4$, НСС1954: $2,5 \times 10^4$, СНОК1: $2,5 \times 10^4$, Ранс-1: $2,5 \times 10^4$ и МС38: $2,5 \times 10^4$) высевали в белый 96-луночный планшет для анализа в 100 мкл культуральной среды.

Клетки культивировали в течение ночи в инкубаторе с высокой влажностью и 5% CO₂ при 37 °С. После культивирования в течение ночи удаляли 100 мкл культуральной среды и добавляли 25 мкл среды для анализа (RPMI1640, содержащей 1% FBS) к предварительно посеянными клеткам-мишеням. В планшет добавляли 25 мкл В10317 (начиная с 50 нМ, 3-кратные разведения) или ВМUR (начиная с 133 нМ, 6-кратные разведения). Линию клеток GloResponse™ NFκB-luc2/4-1BB Jurkat собирали и ресуспендировали со средой для анализа. 25 мкл клеток линии GloResponse™ NFκB-luc2/4-1BB Jurkat добавляли в каждую лунку из расчета $2,5 \times 10^4$ клеток на лунку планшета. Клетки культивировали в течение 6 часов в инкубаторе с высокой влажностью и 5% CO₂ при 37°С. Во время инкубирования готовили раствор реагента Bio-Glo™ в соответствии с инструкцией производителя. После 6-часового инкубирования в планшет для анализа добавляли 75 мкл реагента Bio-Glo™ на лунку. Через 5 минут измеряли люминесценцию с помощью планшет-ридера. Анализ с использованием четырехпараметрической логистической кривой выполняли с помощью программного обеспечения GraphPad.

Как показано на фиг. 14, В10317 активировало сигнальный путь 4-1BB только в

присутствии В7-Н4 в зависимости от дозы, и активность В10317 в отношении стимуляции Т-клеток была связана с уровнем экспрессии В7-Н4. В10317 не активировало сигнальный путь 4-1ВВ в отсутствие экспрессии В7-Н4. С другой стороны, в экспериментальной группе ВМUR активность в отношении стимуляции Т-клеток была повышена как в линии В7-Н4-положительных, так и в линии отрицательных клеток. Из вышеприведенных результатов следует, что В10317 особенно повышало активность Т-клеток в опухолевом окружении, экспрессирующем В7-Н4, в отличие от ВМUR.

Экспериментальный пример 15. Оценка эффективности биспецифичного антитела в зависимости от дозы у мышей, продуцирующих гуманизированный 4-1ВВ и несущих В-СAG-hВ7-Н4 МС38.

Для анализа эффективности биспецифичного антитела В10317 *in vivo* мышам В-h4-1ВВ TG для развития опухоли подкожно вводили опухолевые клетки В-СAG-hВ7-Н4 МС38 (1×10^6), суспендированные в 0,1 мл PBS, в правый передний бок. Животных с опухолями случайным образом включали в пять исследовательских групп по достижении опухоли среднего размера 103 мм^3 . Каждая группа состояла из 8 мышей. Указанные пять групп представляли собой G1 (изотипическое контрольное hlgG1, 10 мг/кг), G2 (ВМUR, 7,5 мг/кг, то же молярное соотношение, что и для 10 мг/кг В10317), G3 (В10317, 10 мг/кг), G4 (В10317, 2 мг/кг) и G5 (В10317, 0,4 мг/кг). Все анализируемые вещества внутривенно вводили мышам с опухолями с частотой раз в трое суток, в общей сложности восемь раз. Объем опухоли и массу тела измеряли и регистрировали два раза в неделю. Исследование прекратили через 22 суток после последнего введения дозы. На 25 сутки после распределения на группы средний объем опухоли в G1 (контрольной группе) составил $1752 \pm 269 \text{ мм}^3$. Средний объем опухоли в группе G2 составлял $48 \pm 40 \text{ мм}^3$ при $103,3\% \text{ TGI}$. В группах G3, G4 и G5 средний объем опухоли составлял $18 \pm 14 \text{ мм}^3$ при $\text{TGI } 105,1\%$, $136 \pm 110 \text{ мм}^3$ при $\text{TGI } 97,9\%$ и $470 \pm 192 \text{ мм}^3$ при $\text{TGI } 77,7\%$, соответственно. Средняя масса тела и средний объем опухоли приведены в таблицах 27 и 28. Как ВМUR, так и В10317 не оказывали отрицательного влияния на массу тела животного или очевидный клинический признак (таблица 27). Ингибирование роста опухоли (TGI_{TV}) рассчитывали и представили в таблице 28. Как ВМUR, так и В10317 продемонстрировали значимую противоопухолевую активность в отношении объема опухоли. В группах, получавших В10317, показана превосходная скорость ингибирования роста опухоли даже в группе, получавшей низкую дозу антитела, что указывало на более выраженную эффективность по сравнению с ВМUR.

Профиль среднего роста и объема опухоли при лечении показаны на фиг. 15, а объем отдельной опухоли показан на фиг. 16. Как показано на фиг. 15 и 16, В10317 значительно снижало рост опухоли *in vivo* в модели с МС38-hВ7-Н4 в зависимости от дозы. В экспериментальной группе, получавшей ВМUR (G2), также продемонстрирована противоопухолевая активность *in vivo*, однако В10317 демонстрировало более высокую

эффективность *in vivo* (т.е. приблизительно 100% ингибирование роста опухоли) даже в дозе 2 мг/кг (G4).

[Таблица 27] Изменение массы тела мышей B-h4-1BV с инокулированными клетками B-CAG-hB7-H4 MC38

5

Группа	Анализируемые вещества	Масса тела (г)			Изменение (г)
		До лечения	25 сутки после распределения на группы	P ^b	
G1	Изотипический контроль (7,5 мг/кг)	17,3±0,3	19,9±0,6	-	+2,6
G2	BMUR (7,5 мг/кг)	17,4±0,3	18,6±0,3	0,081	+1,2
G3	B10317 (10 мг/кг)	17,4±0,2	19,1±0,4	0,295	+1,7
G4	B10317 (2 мг/кг)	17,4±0,3	18,7±0,4	0,134	+1,3
G5	B10317 (0,4 мг/кг)	17,4±0,4	19,4±0,4	0,549	+2,0

b: Статистический анализ с использованием t-критерия для массы тела в экспериментальной группе по сравнению с группой, получавшей изотипический контрольный hlgG1, на 25 сутки после начала лечения

10 [Таблица 28] Ингибирование роста опухоли биспецифичными антителами против B7-H4/4-1BV у мышей B-h4-1BV с клетками B-CAG-hB7-H4 MC38

Группа	Анализируемые вещества	Объем опухоли (мм ³)		TGI (%)	P ^b
		До лечения	25 сутки после лечения		
G1	Изотипический контроль (7,5 мг/кг)	103±2	1752±269	-	-
G2	BMUR (7,5 мг/кг)	103±3	48±40	103,3	***<0,001
G3	B10317 (10 мг/кг)	103±3	18±14	105,1	***<0,001

G4	B10317 (2 мг/кг)	103±2	36±110	97,9	***<0,001
GS	B10317 (0,4 мг/кг)	103±3	470±192	77,7	**0,002

a: Среднее ± стандартная ошибка среднего

b: Статистический анализ с использованием t-критерия для массы тела в экспериментальной группе по сравнению с группой, получавшей изотипический контрольный hlgG1, на 25 сутки после начала лечения, **P<0,01; ***P<0,001.

5

Экспериментальный пример 16. Биспецифичное антитело полностью защищало мышей от повторного заражения MC38-hB7-H4

10 На 22 день после окончательной обработки 21 излеченной мыши (семи мышам из группы G2, семи мышам из G3, пяти мышам из G4 и двум мышам из G5) в группах, получавших антитела, и 5 наивным мышам имплантировали опухолевые клетки для эксперимента по повторному заражению. Мышам подкожно вводили клетки опухоли толстой кишки B-CAG-hB7-H4 MC38 (1×10^6) в левый передний бок для развития опухоли.

15 Как показано на фиг. 17, как BMUR, так и B10317 демонстрировали значимую противоопухолевую активность в тестируемых дозах и не демонстрировали отрицательного влияния на массу тела животного или индукции какого-либо очевидного клинического признака.

20 В экспериментальных группах, получавших B10317 (G3, G4 и G5), роста опухоли при повторной инокуляции B-CAG-hB7-H4 MC38, не наблюдали, это антитело способствовало долгосрочной защите от опухолей B-CAG-hB7-H4 MC38 на основе иммунологической памяти. Две из семи опухолей медленно росли в группе излеченных мышей, получавших BMUR (G2), другие опухоли появлялись на ранней стадии и почти исчезали на поздней стадии.

25 В целом B10317 демонстрировало более эффективную долгосрочную защиту против опухоли B-CAG-hB7-H4 MC38 на основе иммунологической памяти по сравнению с BMUR.

30 Рамки настоящего изобретения не должны ограничиваться конкретными описанными вариантами реализации, которые играют роль единичных иллюстраций отдельных аспектов настоящего изобретения, и любые композиции или способы, которые являются функционально эквивалентными, входят в рамки настоящего изобретения. Специалистам в данной области техники должно быть очевидно, что способы и композиции согласно настоящему изобретению можно подвергать различным модификациям и

изменениям без отклонения от сущности или рамок настоящего изобретения. Таким образом, подразумевается, что настоящее изобретение охватывает модификации и изменения настоящего изобретения при условии, что они входят в рамки прилагаемой формулы изобретения и ее эквивалентов.

- 5 Все публикации и заявки на патент, упомянутые в данном описании, включены в настоящую заявку посредством ссылок в той же степени, как если бы каждая отдельная публикация или заявка на патент была конкретным и индивидуальным образом включена посредством ссылки.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Биспецифичное антитело против В7-Н4/4-1ВВ, содержащее антитело против В7-Н4 или его антигенсвязывающий фрагмент и антитело против 4-1ВВ или его антигенсвязывающий фрагмент,
5 причем указанное антитело против В7-Н4 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи, содержащие:
область 1, определяющую комплементарность тяжелой цепи (CDR-H1), содержащую
10 аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, 25 и 33;
CDR-H2, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 3, 26 и 34;
CDR-H3, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы,
15 состоящей из SEQ ID NO: 4, 27 и 35;
область 1, определяющую комплементарность легкой цепи (CDR-L1), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 7, 8, 29 и 37;
CDR-L2, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы,
20 состоящей из SEQ ID NO: 9 и 30; и
CDR-L3, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 10, 31 и 38;
причем антитело против 4-1ВВ или его антигенсвязывающий фрагмент содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую по меньшей мере одну
25 аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 39-43; и переменную область легкой цепи, содержащую по меньшей мере одну аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 52 и 53.
- 30 2. Биспецифичное антитело против В7-Н4/4-1ВВ по п. 1, отличающееся тем, что указанное антитело против В7-Н4 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит:
переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1, 22, 24 и 32; и
переменную область легкой цепи, содержащую аминокислоту, выбранную из
35 группы, состоящей из SEQ ID NO: 5, 6, 23, 28 и 36.
3. Биспецифичное антитело против В7-Н4/4-1ВВ по п. 1 или п. 2, отличающееся тем, что

указанное антитело против В7-Н4 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит:

каркасную область 1 тяжелой цепи (H-FR1), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12;

5 каркасную область 2 тяжелой цепи (H-FR2), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13;

каркасную область 3 тяжелой цепи (H-FR3), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14;

каркасную область 4 тяжелой цепи (H-FR4), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15;

10 каркасную область 1 легкой цепи (L-FR1), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17;

каркасную область 2 легкой цепи (L-FR2), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18;

15 каркасную область 3 легкой цепи (L-FR3), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19; и

каркасную область 4 легкой цепи (L-FR4), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20.

4. Биспецифичное антитело против В7-Н4/4-1ВВ по любому из пп. 1-3, отличающееся тем, что каждое из антитела против В7-Н4 или его антигенсвязывающего фрагмента и антитела против 4-1ВВ или его антигенсвязывающего фрагмента независимо представляет собой химерное антитело, гуманизированное антитело или антитело человека.

5. Выделенный полинуклеотид, кодирующий антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-4.

6. Фармацевтическая композиция для профилактики или лечения заболевания, связанного с В7-Н4, 4-1ВВ или обоими из них, содержащая биспецифичное антитело против В7-Н4/4-1ВВ или антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-4.

7. Фармацевтическая композиция по п. 6, отличающаяся тем, что заболевание, связанное с В7-Н4, 4-1ВВ или обоими из них, представляет собой рак.

8. Фармацевтическая композиция по п. 7, отличающаяся тем, что указанный рак выбран из группы, состоящей из рака мочевого пузыря, рака печени, рака толстой кишки, рака прямой кишки, рака эндометрия, лейкоза, лимфомы, рака поджелудочной железы, мелкоклеточного рака легкого, немелкоклеточного рака легкого, рака молочной железы,

рака уретры, рака головы и шеи, рака желудочно-кишечного тракта, рака желудка, рака пищевода, рака яичника, рака почки, меланомы, рака предстательной железы и рака щитовидной железы.

5 **9.** Способ профилактики или лечения заболевания, связанного с B7-H4, 4-1BB или обоими из них, у индивида, включающий введение указанному индивиду биспецифичного антитела против B7-H4/4-1BB или антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп. 1-4 или фармацевтической композиции по любому из пп. 6-8.

10 **10.** Биспецифичное антитело против B7-H4/4-1BB или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-4 для применения при профилактике или лечении заболевания, связанного с B7-H4, 4-1BB или обоими из них.

15 **11.** Антитело против B7-H4 или его антигенсвязывающий фрагмент, обладающие специфичностью по отношению к белку B7-H4, причем указанное антитело против B7-H4 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи, содержащие:

20 область 1, определяющую комплементарность тяжелой цепи (CDR-H1), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, 25 и 33;

CDR-H2, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 3, 26 и 34;

CDR-H3, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 4, 27 и 35;

25 область 1, определяющую комплементарность легкой цепи (CDR-L1), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 7, 8, 29 и 37;

CDR-L2, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 9 и 30; и

30 CDR-L3, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 10, 31 и 38.

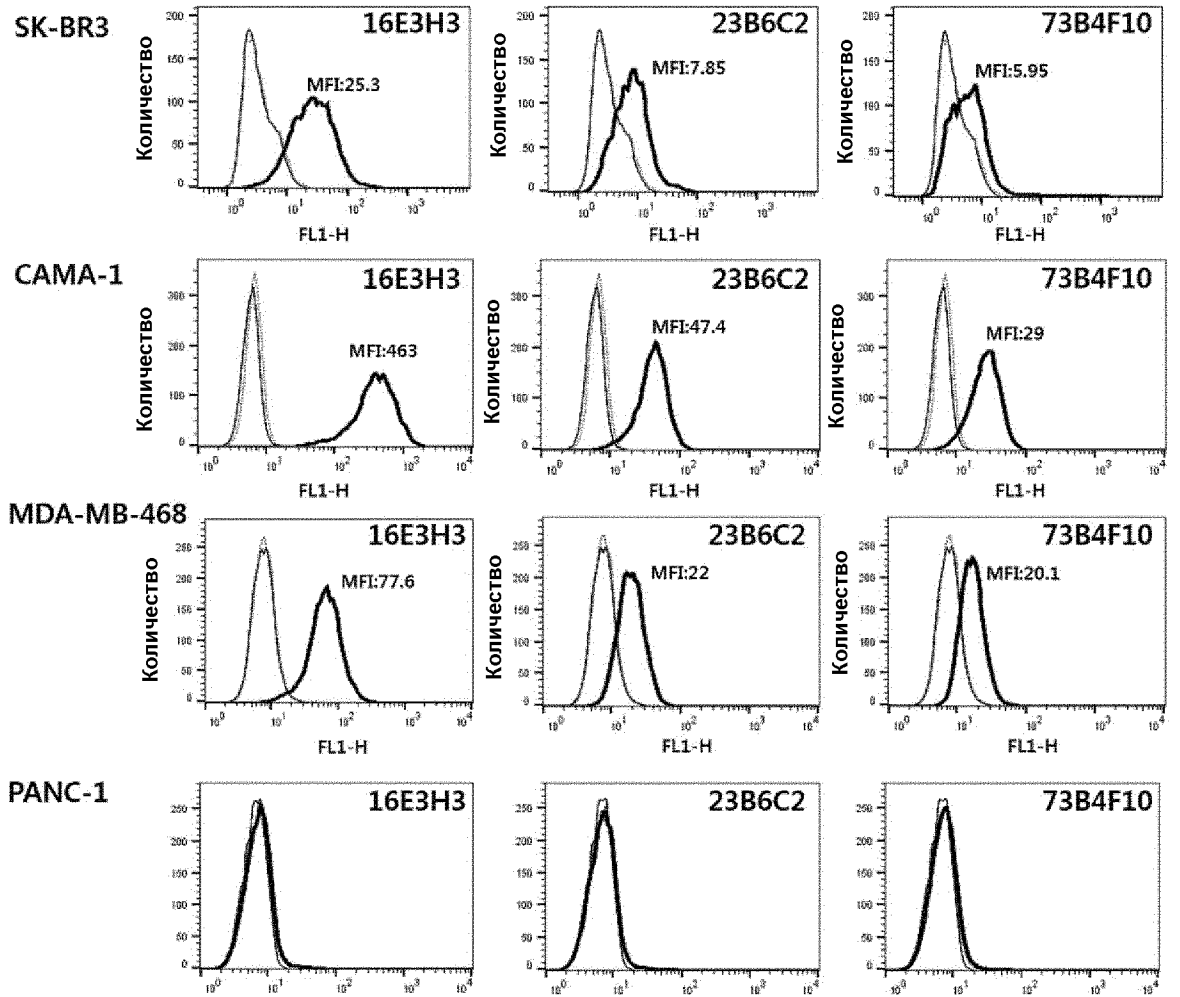
12. Антитело против B7-H4 или антигенсвязывающий фрагмент по п. 11, содержащее:

35 переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1, 22, 24 и 32;

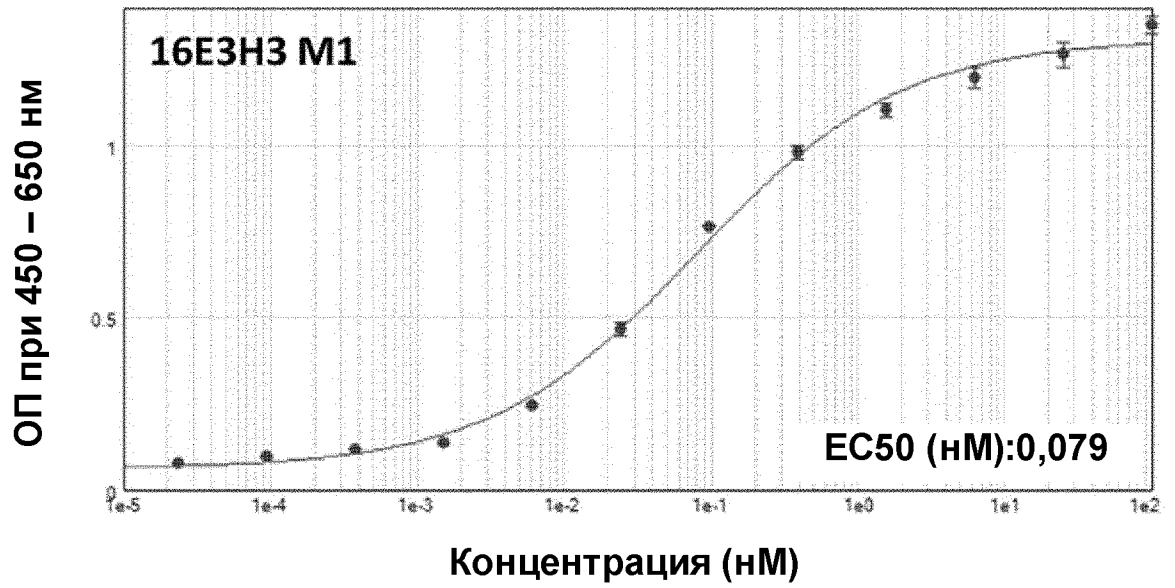
переменную область легкой цепи, содержащую аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 5, 6, 23, 28 и 36.

13. Антитело против В7-Н4 по п. 11 или п. 12, которое представляет собой химерное антитело, гуманизированное антитело или антитело человека.
- 5 14. Выделенный полинуклеотид, кодирующий антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 11-13.
15. Фармацевтическая композиция для профилактики или лечения заболевания, связанного с В7-Н4, содержащая антитело против В7-Н4 или антигенсвязывающий
10 фрагмент по любому из пп. 11-14.
16. Фармацевтическая композиция по п. 15, отличающаяся тем, что заболевание, связанное с В7-Н4, представляет собой рак.
- 15 17. Фармацевтическая композиция по п. 16, отличающаяся тем, что указанный рак выбран из группы, состоящей из рака мочевого пузыря, рака печени, рака толстой кишки, рака прямой кишки, рака эндометрия, лейкоза, лимфомы, рака поджелудочной железы, мелкоклеточного рака легкого, немелкоклеточного рака легкого, рака молочной железы, рака уретры, рака головы и шеи, рака желудочно-кишечного тракта, рака желудка, рака
20 пищевода, рака яичника, рака почки, меланомы, рака предстательной железы и рака щитовидной железы.
- 25 18. Способ профилактики или лечения заболевания, связанного с В7-Н4, у индивида, причем указанный способ включает введение указанному индивиду антитела против В7-Н4 или антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп. 11-14.
19. Антитело против В7-Н4 или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 11-14 для применения при профилактике или лечении заболевания, связанного с В7-Н4.

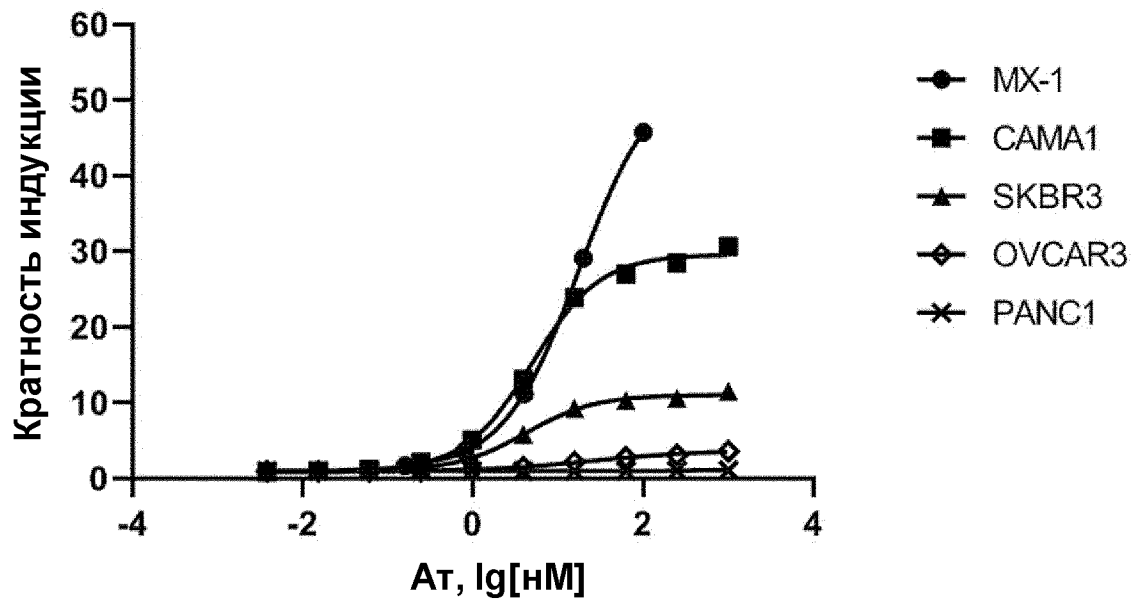
Фигура 1



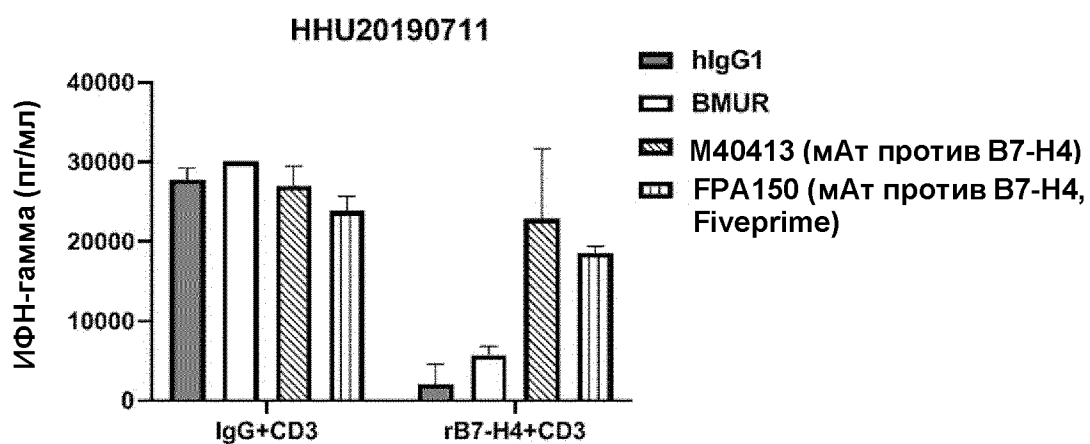
Фигура 2



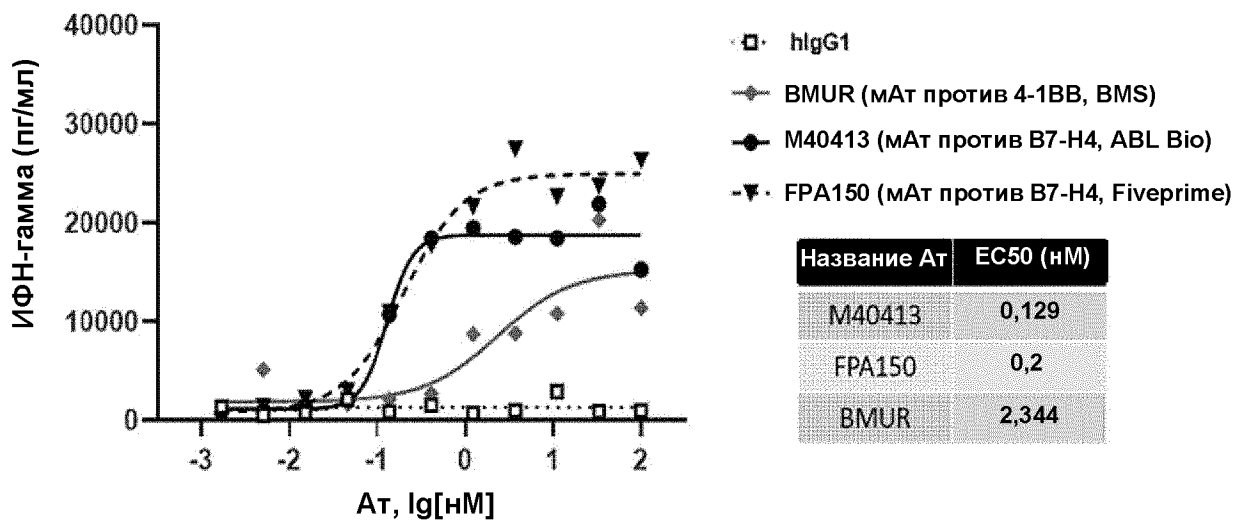
Фигура 3



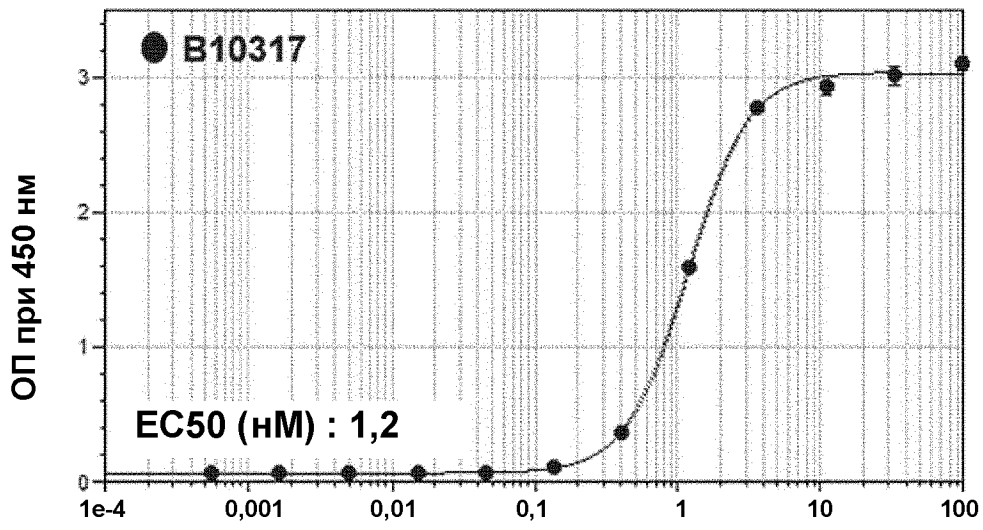
Фигура 4



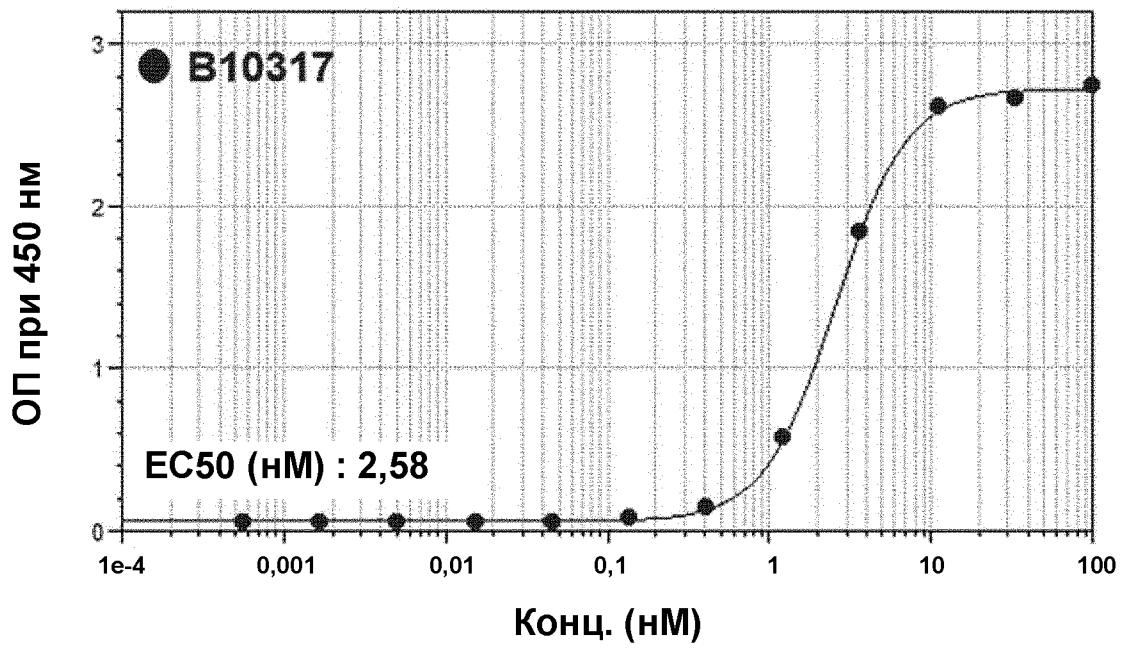
Фигура 5



Фигура 6

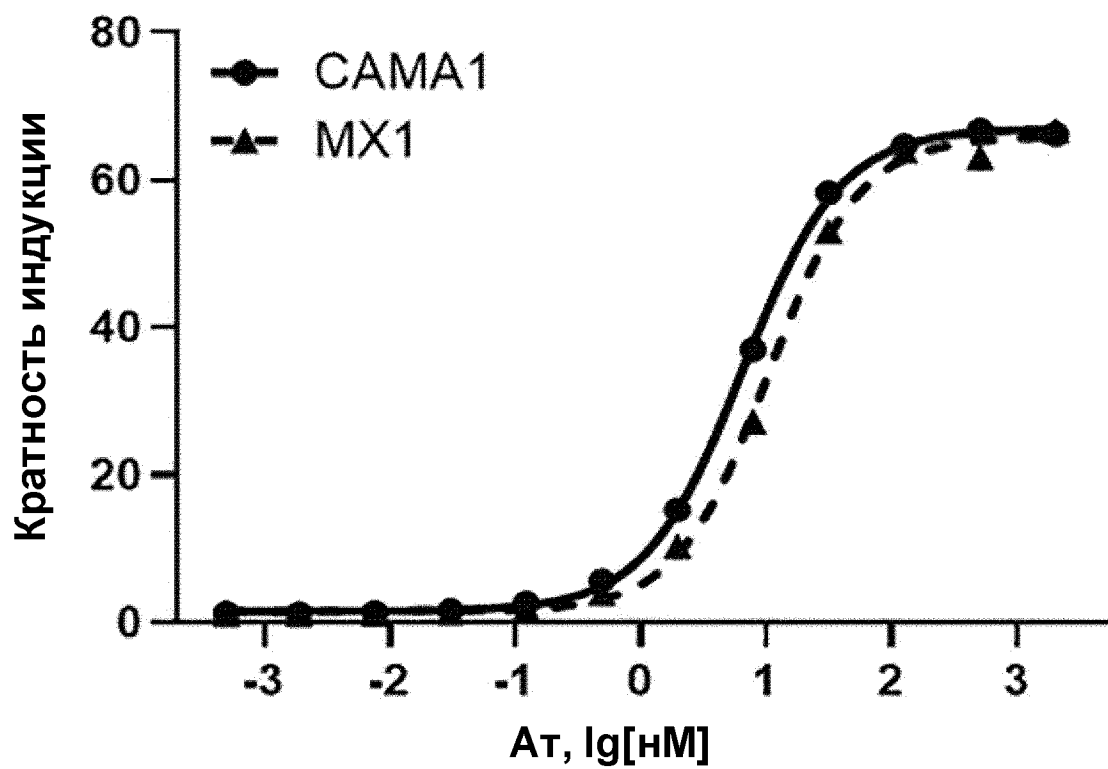


Фигура 7



Фигура 8

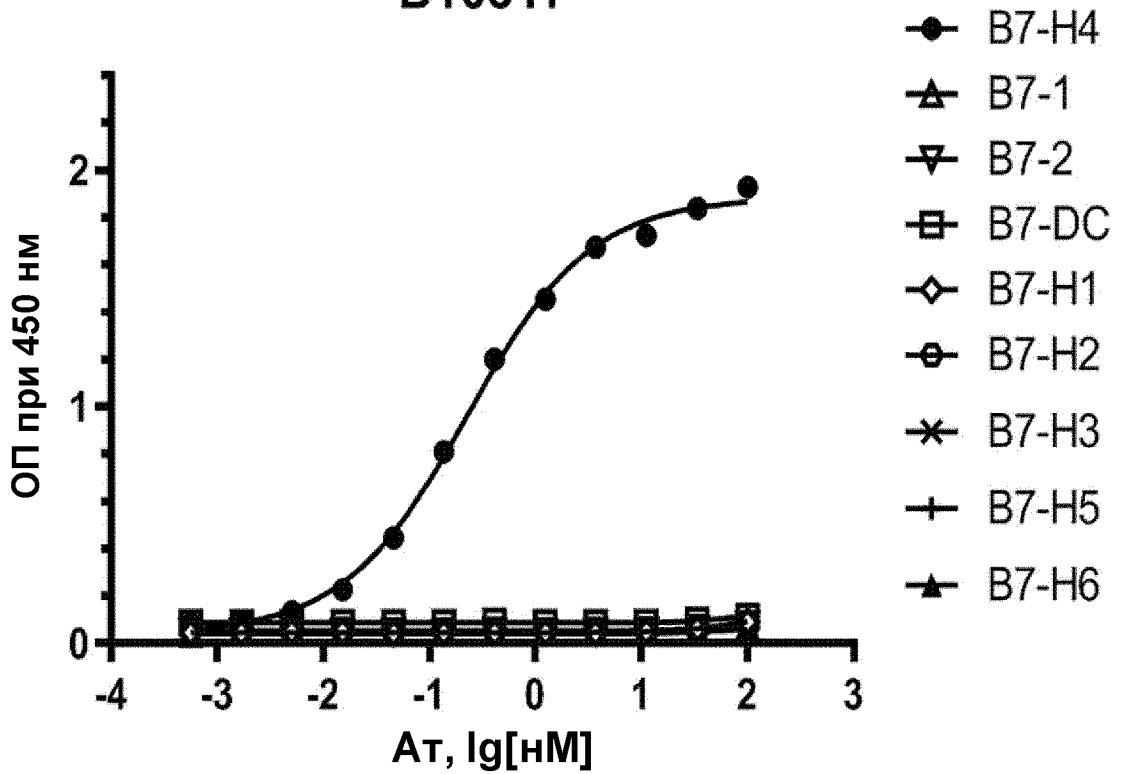
B10317



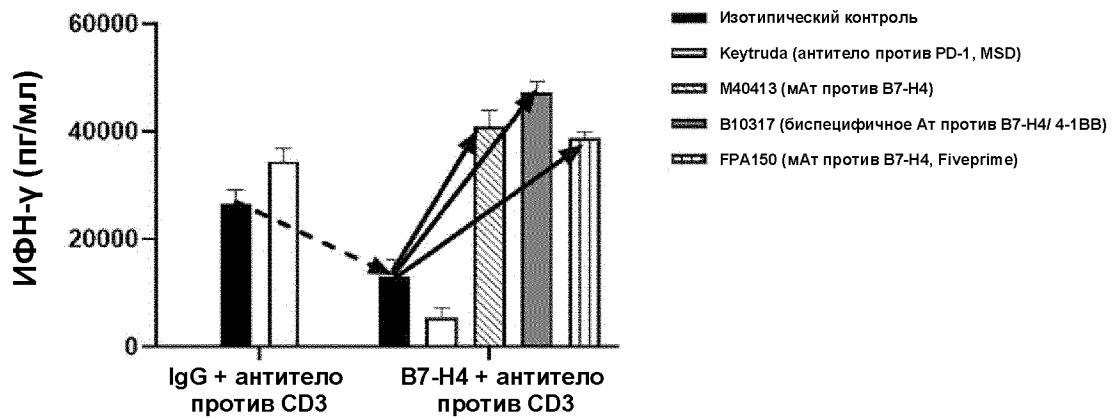
	CAMA1	MX1
EC50	6,457	10,33

Фигура 9

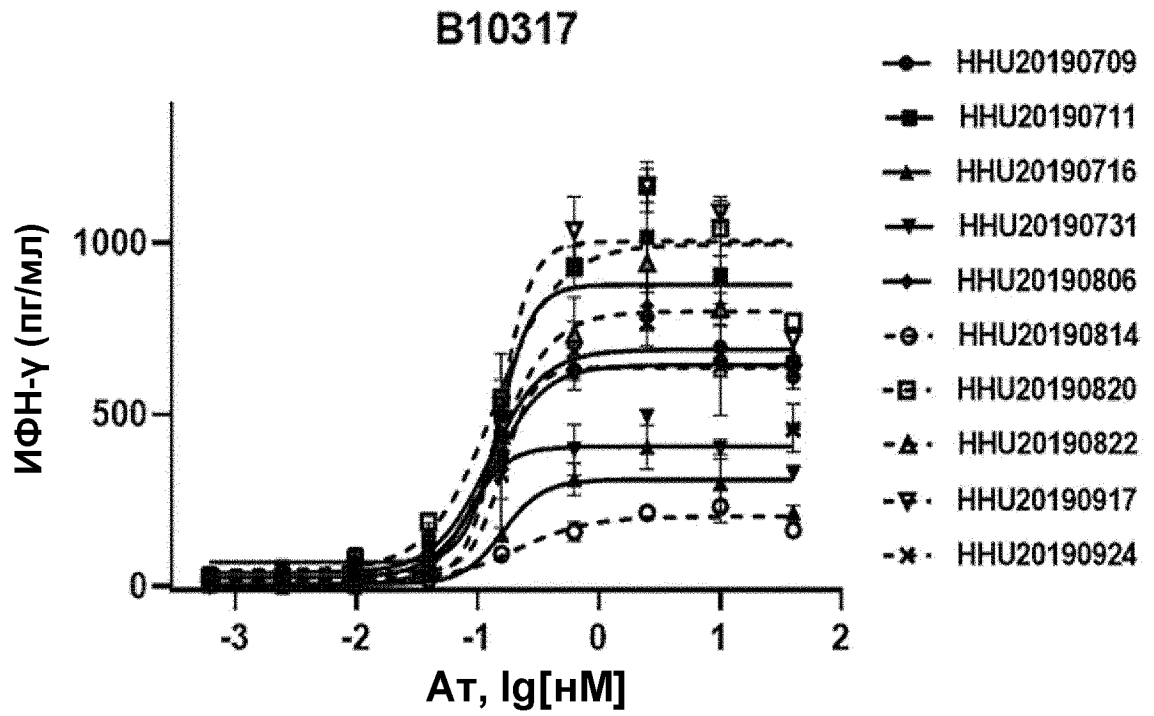
B10317



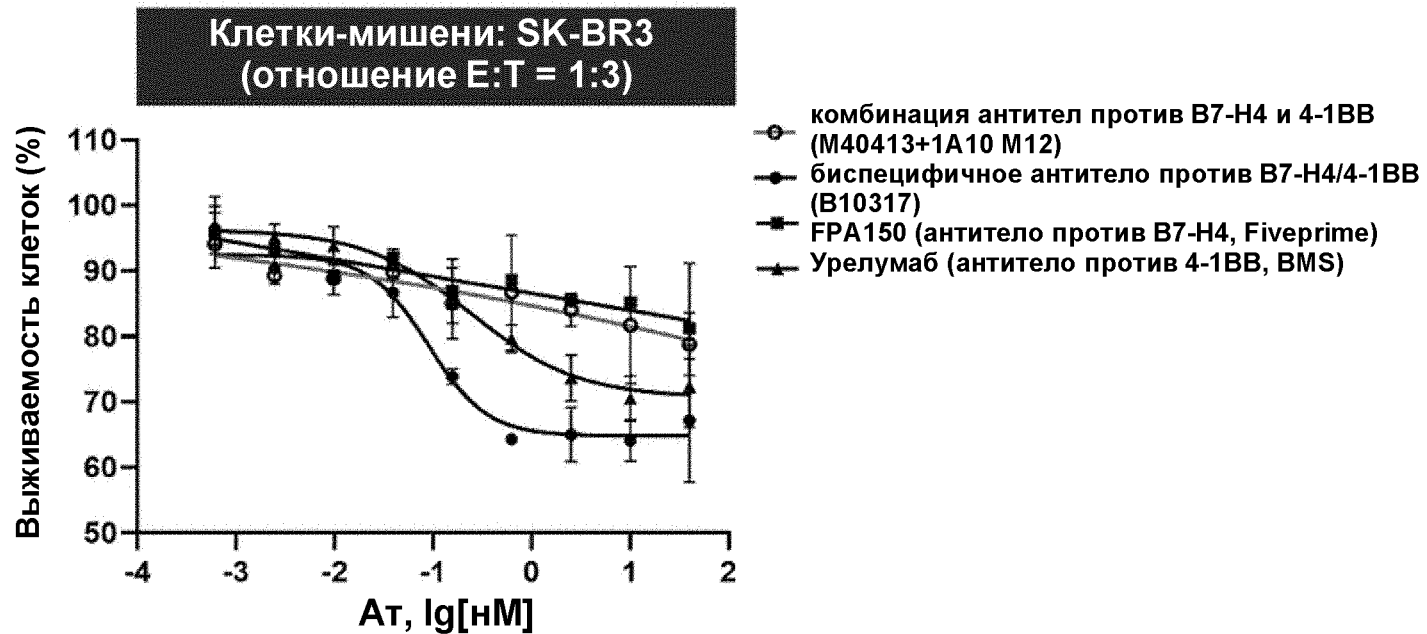
Фигура 10



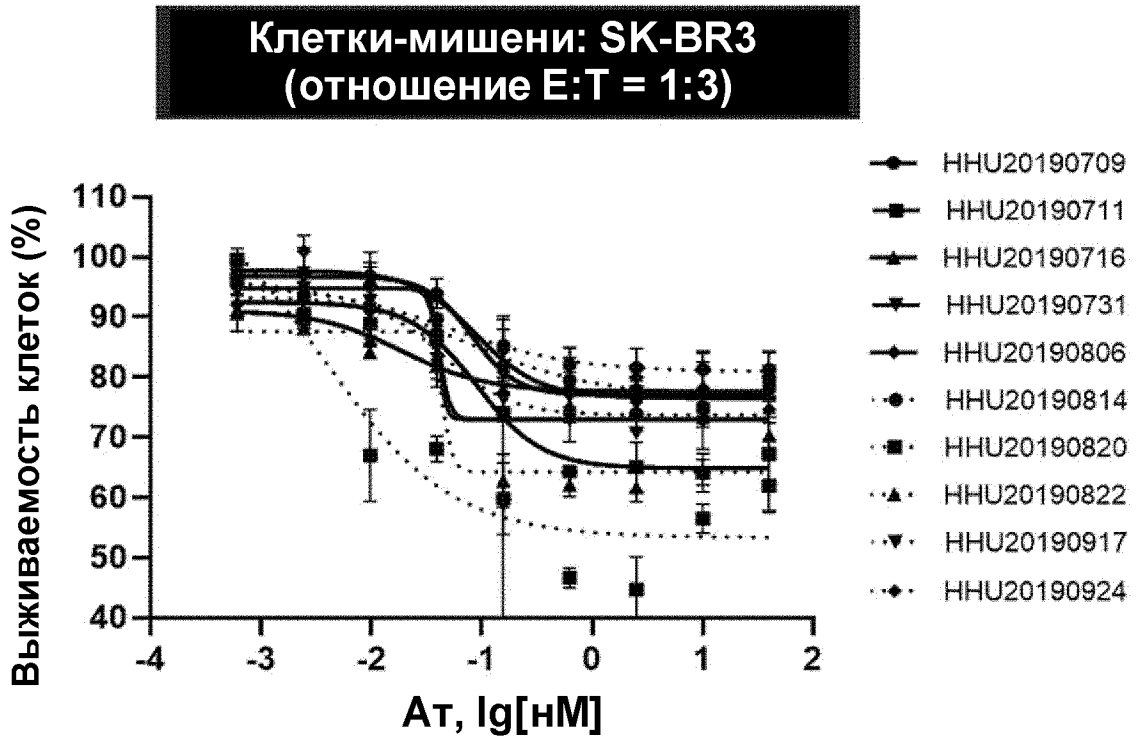
Фигура 11



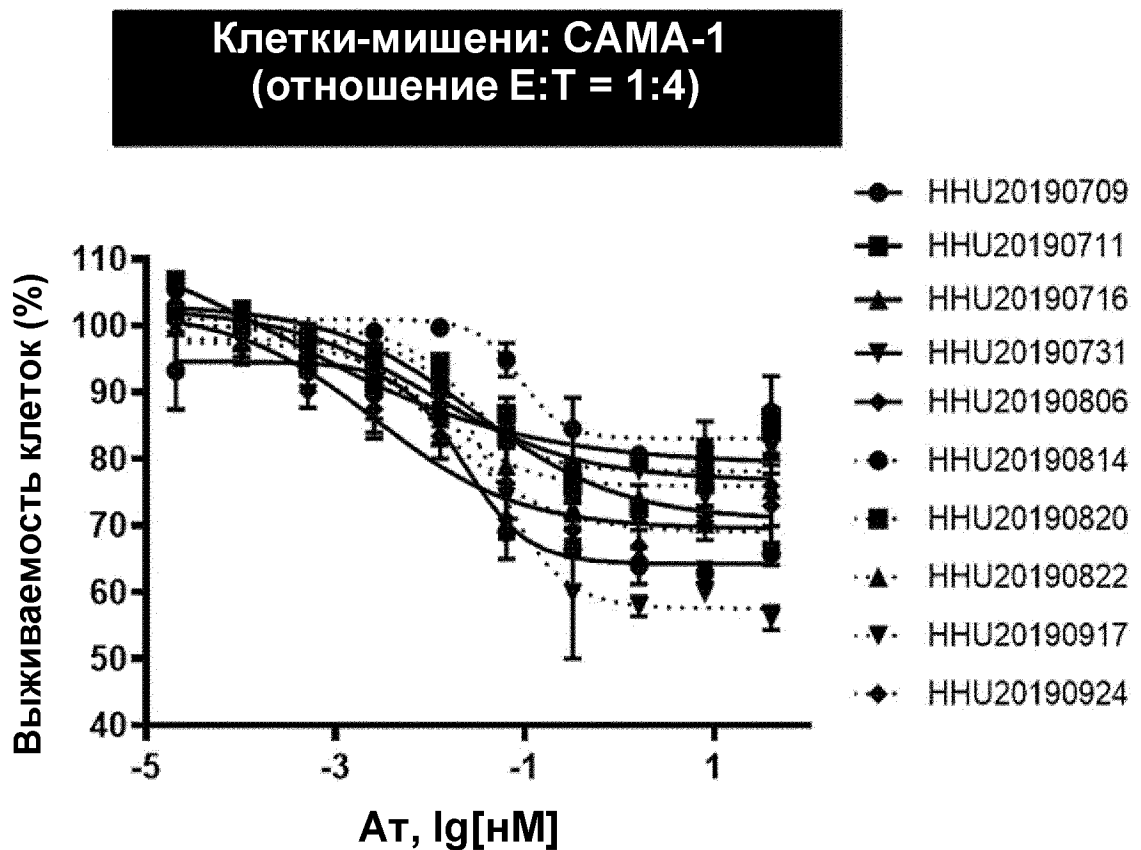
Фигура 12



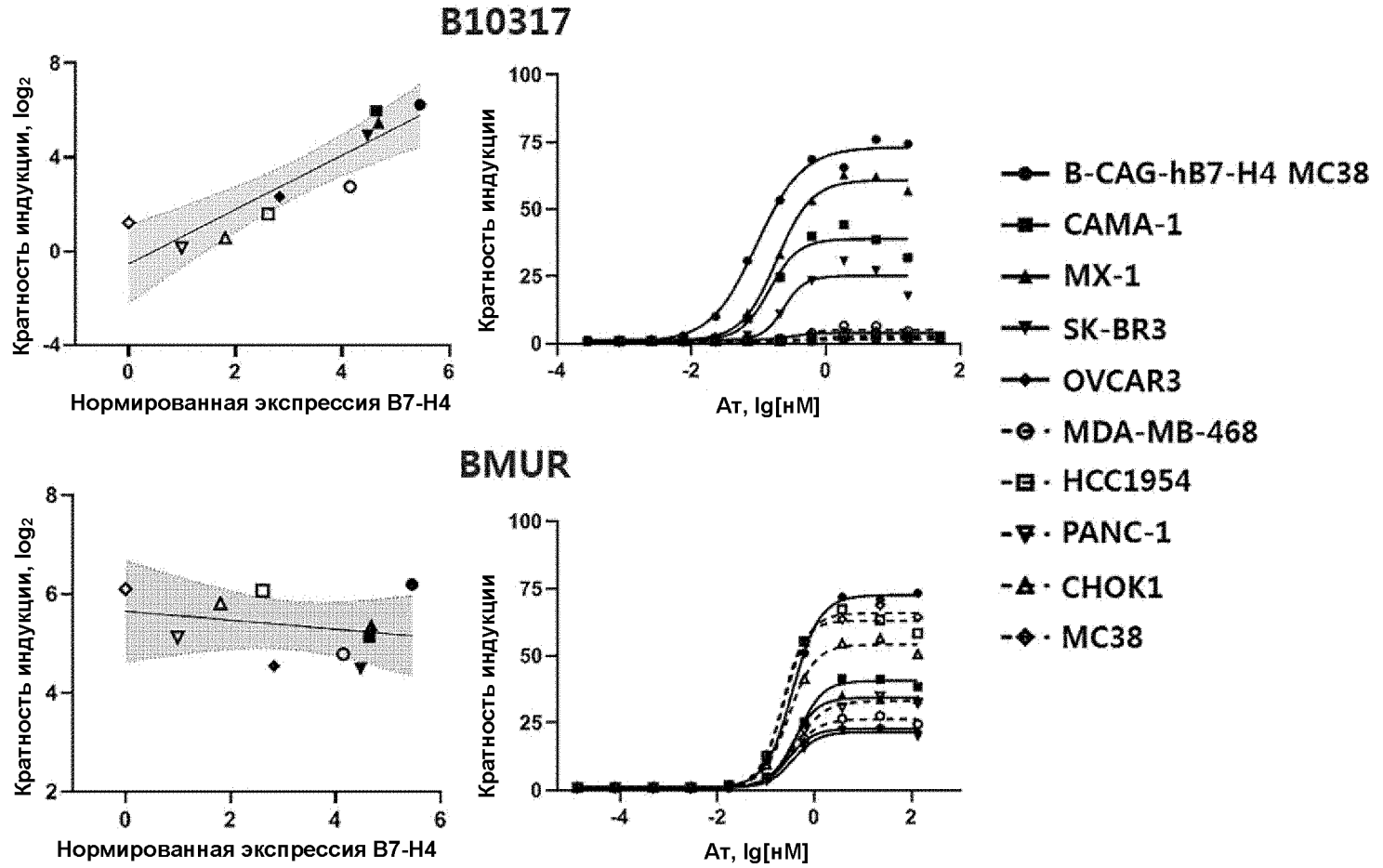
Фигура 13а



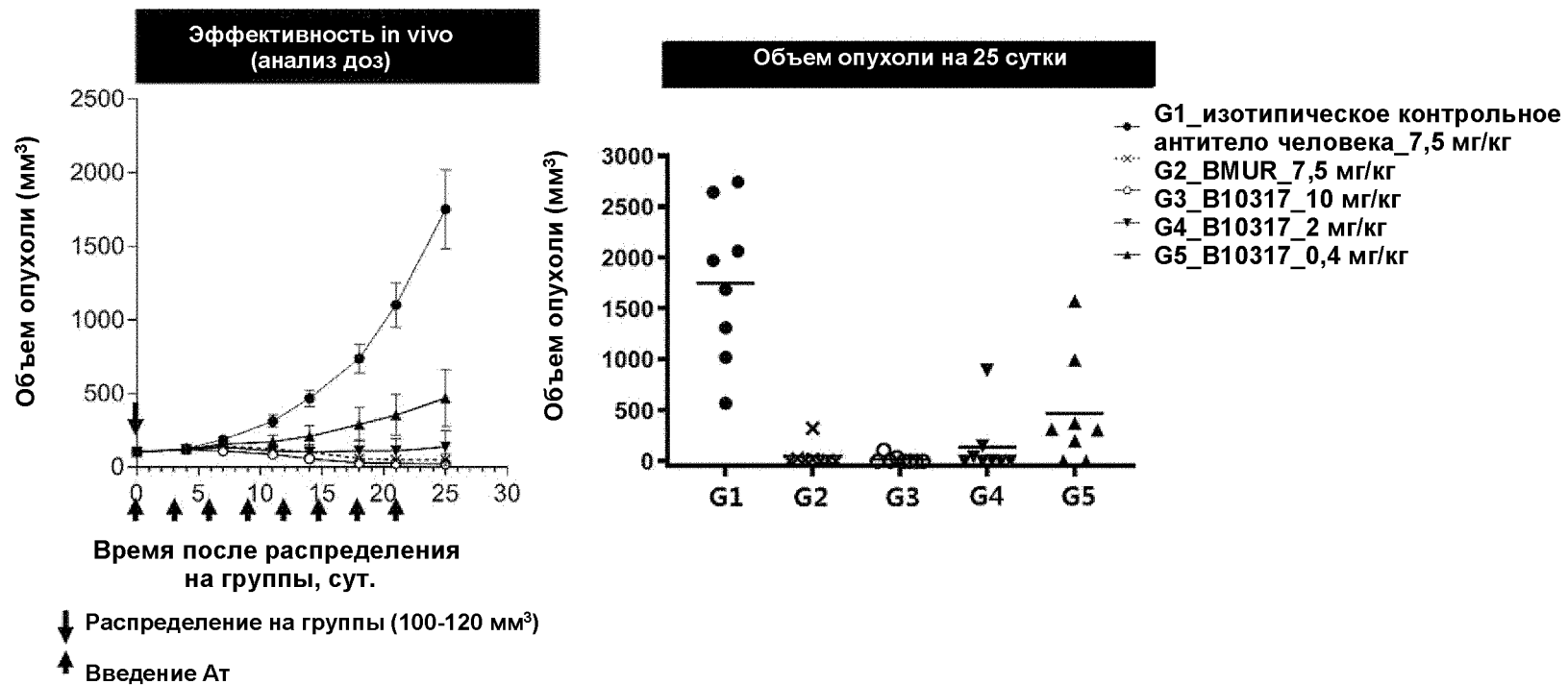
Фигура 13б



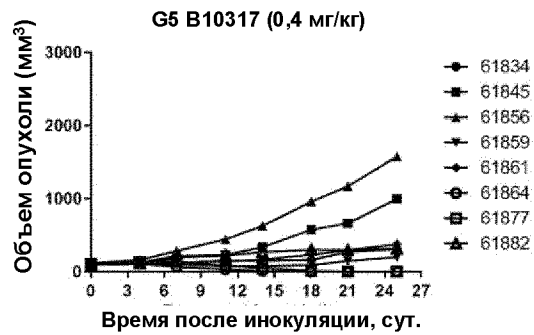
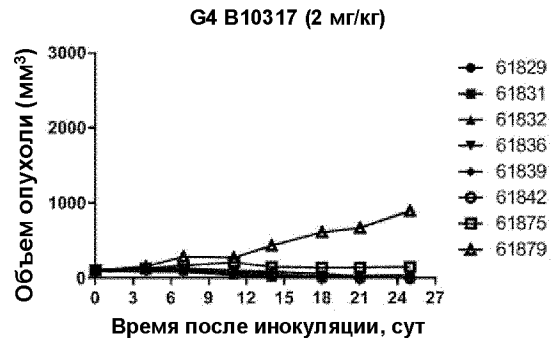
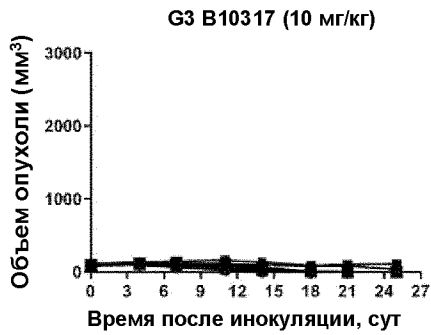
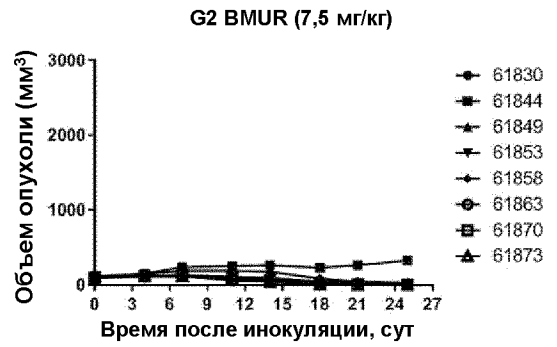
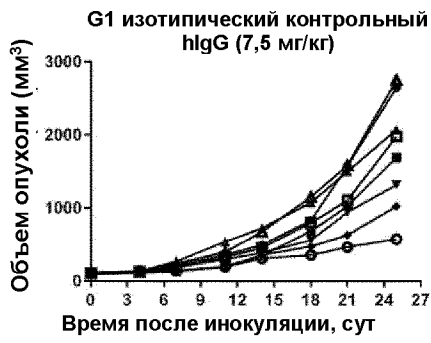
Фигура 14



Фигура 15



Фигура 16



Фигура 17

