# (12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

- (43) Дата публикации заявки 2020.07.21
- (22) Дата подачи заявки 2018.08.23

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

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

- (31) 62/550,173; 62/579,774; 62/607,810; 62/656,789
- (32) 2017.08.25; 2017.10.31; 2017.12.19; 2018.04.12
- (33) US
- (86) PCT/US2018/047805
- (87) WO 2019/040780 2019.02.28
- (71) Заявитель: ФАЙВ ПРАЙМ ТЕРАПЬЮТИКС, ИНК. (US)

**(72)** Изобретатель:

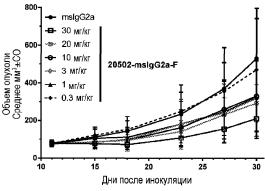
Каплан Чарльз, Хаусер Деррик, Боргес Луис, Браттич Глория, Белловин Дэвид, Кемп Фелисия, Гходдуси Маджид, Нильсон Нельс П., Миллер Кэти, Шмидт Майки (US)

(74) Представитель:

Строкова О.В., Глухарёва А.О., Лыу Т.Н., Угрюмов В.М., Христофоров А.А., Гизатуллина Е.М., Гизатуллин Ш.Ф., Костюшенкова М.Ю., Лебедев В.В., Парамонова К.В. (RU)

(57) Данное изобретение относится к антителам и их антигенсвязывающим фрагментам, которые специфически связываются с В7-Н4 человека (и необязательно В7-Н4 яванского макака (Cynomolgus), мыши и/или крысы), и к композициям, содержащим такие антитела или их антигенсвязывающие фрагменты. В конкретном аспекте указанные антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связываются с В7-Н4 человека, усиливают пролиферацию Т-клеток, увеличивают продукцию интерферона-гамма и/или деплетируют экспрессирующие В7-Н4 клетки посредством активности АЗКЦ. Данное изобретение также обеспечивает способы лечения расстройств, таких как рак, путем введения антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которые специфически связываются с В7-Н4 человека.





# АНТИТЕЛА К В7-Н4 И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА СВЯЗАННЫЕ ЗАЯВКИ

[0001] Данная заявка заявляет приоритет по предварительной заявке США № 62/550173, поданной 25 августа 2017 года, предварительной заявке США № 62/579774, поданной 31 октября 2017 года, предварительной заявке США № 62/607810, поданной 19 декабря 2017 года, и предварительной заявке США № 62/656789, поданной 12 апреля 2018 года, каждая из которых включена в данный документ в качестве ссылки.

# ССЫЛКА НА СПИСОК ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ, ПРЕДСТАВЛЕННЫХ В ЭЛЕКТРОННОМ ВИДЕ EFS-WEB

[0002] Содержание представленного в электронном виде перечня последовательностей (Имя: 3986.0090004\_SL\_ST25.txt; Размер:331354 байта; Дата создания: 3 августа 2018 года) полностью включена в данный документ посредством ссылки.

#### ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

# Область исследования

[0003] Данное изобретение относится к антителам, которые специфически связываются с В7-Н4 человека, композициями содержащими такие антитела, и к способам получения и применения антител, которые специфически связываются с В7-Н4.

#### Описание связанного уровня техники

[0004] В7-Н4 (также известный как В7х, В7-S1 и VTCN1) представляет собой иммунную регуляторную молекулу, которая разделяет гомологию с другими членами семейства В7, включая PD-L1. Это трансмембранный белок типа I, состоящий из эктодоменов IgV и IgC. Хотя экспрессия В7-Н4 в здоровых тканях относительно ограничена на уровне белка, В7-Н4 экспрессируется в нескольких солидных опухолях, таких как гинекологические карциномы молочной железы, яичника и эндометрия. Экспрессия В7-Н4 в опухолях имеет тенденцию коррелировать с плохим прогнозом. Рецептор В7-Н4 неизвестен, но считается, что он экспрессируется на Т-клетках. Считается, что В7-Н4 непосредственно ингибирует активность Т-клеток.

[0005] Учитывая экспрессию и функцию В7-Н4, в данном документе представлены антитела, которые специфически связываются с В7-Н4, и использование этих антител для модуляции активности В7-Н4, в том числе, например, при лечении рака.

### СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В [0006] данном документе представлено выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с В7-Н4 человека, содержащие последовательности определяющего комплементарность участка (CDR) 1 вариабельного участка тяжелой цепи (VH), CDR2 VH, CDR3 VH и CDR1, CDR2, CDR3 вариабельного участка легкой цепи (VL) выбраные из группы, состоящей из: SEQ ID NO: 5-10 соответственно; SEO ID NO: 15-20 соответственно; SEO ID NO: 25-30 соответственно; SEQ ID NO: 35-40 соответственно; SEQ ID NO: 458-463 соответственно; SEQ ID NO: 45-50 соответственно; SEQ ID NO: 55-60 соответственно; SEQ ID NO: 65-70 соответственно; SEQ ID NO: 75-80 соответственно; SEQ ID NO: 85-90 соответственно; SEQ ID NO: 95-100 соответственно; SEQ ID NO: 105-110 соответственно; SEQ ID NO: 115-120 соответственно; SEQ ID NO: 125-130 соответственно; SEQ ID NO: 135-140 соответственно; SEQ ID NO: 145-150 соответственно; SEQ ID NO: 155-160 соответственно; SEQ ID NO: 165-170 соответственно; SEQ ID NO: 175-180 соответственно; SEQ ID NO: 185-190 соответственно; и SEQ ID NO: 195-200 соответственно.

[0007] В одном варианте осуществления данного изобретения, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат VH, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 11, 21, 31, 41, 464, 51, 61, 71, 81, 91, 101, 111, 121, 131, 141, 151, 161, 171, 181, 191 или 201.

[0008] В одном варианте осуществления данного изобретения, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат VL, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 12, 22, 32, 42, 52, 62, 72, 82, 92, 102, 112, 122, 132, 142, 152, 162, 172, 182, 192 или 202.

[0009] В одном варианте осуществления данного изобретения, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат вариабельный участок тяжелой цепи и вариабельный участок легкой цепи, при этом вариабельный участок тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 11, 21, 31, 41, 464, 51, 61, 71, 81, 91, 101, 111, 121, 131, 141, 151, 161, 171, 181, 191 или 201.

[0010] В данном документе также предлагается выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с В7-Н4 человека, при этом антитело содержит вариабельный участок тяжелой цепи и вариабельный участок легкой цепи, при этом вариабельный участок легкой цепи содержит аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 12, 22, 32, 42, 52, 62, 72, 82, 92, 102, 112, 122, 132, 142, 152, 162, 172, 182, 192 или 202.

[0011] В данном документе также предлагаются выделенное антитело или его

антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с В7-Н4 человека, содержащим вариабельный участок тяжелой цепи и вариабельный участок легкой цепи, содержащий аминокислотные последовательности: SEQ ID NO: 11 и 12 соответственно; SEQ ID NO: 21 и 22 соответственно; SEQ ID NO: 31 и 32 соответственно; SEQ ID NO: 41 и 42 соответственно; SEQ ID NO: 51 и 52 соответственно; SEQ ID NO: 61 и 62 соответственно; SEQ ID NO: 71 и 72 соответственно; SEQ ID NO: 81 и 82 соответственно; SEQ ID NO: 91 и 92 соответственно; SEQ ID NO: 101 и 102 соответственно; SEQ ID NO: 111 и 112 соответственно; SEQ ID NO: 121 и 122 соответственно; SEQ ID NO: 131 и 132 соответственно; SEQ ID NO: 141 и 142 соответственно; SEQ ID NO: 151 и 152 соответственно; SEQ ID NO: 161 и 162 соответственно; SEQ ID NO: 171 и 172 соответственно; SEQ ID NO: 181 и 182 соответственно; SEQ ID NO: 181 и 182 соответственно; SEQ ID NO: 191 и 192 соответственно; SEQ ID NO: 201 и 202 соответственно; SEQ ID NO: 191 и 192 соответственно; или SEQ ID NO: 201 и 202 соответственно.

[0012] В одном варианте осуществления данного изобретения, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент дополнительно содержат константный участок тяжелой цепи. В одном варианте осуществления данного изобретения, константный участок тяжелой цепи выбран из группы, состоящей из константных участков тяжелой цепи иммуноглобулинов  $[gG_1, gG_2, gG_3, gG_4, gA_1]$  и  $[gA_2]$ .

[0013] В одном варианте осуществления данного изобретения, антитело или антигенсвязывающий фрагмент дополнительно содержат константный участок легкой цепи. В одном варианте осуществления данного изобретения, константный участок легкой цепи выбран из группы, состоящей из константных участков легкой цепи иммуноглобулинов человека IgGк и IgGλ.

[0014] В одном варианте осуществления данного изобретения, антитело или антигенсвязывающий фрагмент дополнительно содержат константный участок тяжелой цепи и константный участок легкой цепи, при этом константный участок тяжелой цепи представляет собой константный участок тяжелой цепи  $IgG_1$  человека, и где константный участок легкой цепи  $IgG_6$  человека.

[0015] В одном варианте осуществления данного изобретения, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 13, 23, 33, 43, 469, 53, 63, 73, 83, 93, 103, 113, 123, 133, 143, 153, 163, 173, 183, 193 или 203.

[0016] В одном варианте осуществления данного изобретения, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 14, 24, 34, 44, 54, 64, 74, 84, 94, 104, 114, 124, 134, 144,

154, 164, 174, 184, 194 или 204.

[0017] В одном варианте осуществления данного изобретения, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат тяжелую цепь и легкую цепь, содержащие аминокислотные последовательности: SEQ ID NO: 13 и 14 соответственно; SEQ ID NO: 23 и 24 соответственно; SEQ ID NO: 33 и 34 соответственно; SEQ ID NO: 43 и 44 соответственно; SEQ ID NO: 469 и 44 соответственно; SEQ ID NO: 53 и 54 соответственно; SEQ ID NO: 63 и 64 соответственно; SEQ ID NO: 73 и 74 соответственно; SEQ ID NO: 83 и 84 соответственно; SEQ ID NO: 93 и 94 соответственно; SEQ ID NO: 103 и 104 соответственно; SEQ ID NO: 113 и 114 соответственно; SEQ ID NO: 123 и 124 соответственно; SEQ ID NO: 153 и 154 соответственно; SEQ ID NO: 163 и 164 соответственно; SEQ ID NO: 173 и 174 соответственно; SEQ ID NO: 183 и 184 соответственно; SEQ ID NO: 193 и 194 соответственно; SEQ ID NO: 183 и 184 соответственно; SEQ ID NO: 193 и 194 соответственно; SEQ ID NO: 203 и 204 соответственно; SEQ ID NO: 193 и 194 соответственно; или SEQ ID NO: 203 и 204 соответственно; SEQ ID NO: 193 и 194 соответственно; или SEQ ID NO: 203 и 204 соответственно.

[0018] В данном документе также предлагается выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с В7-Н4 человека, при этом антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат VH CDR1, VH CDR2, VH CDR3, VL CDR1, VL CDR2 и VL CDR3 антитела, выбранного из группы, состоящей из 15461, 20500, 20501, 20502, 20502.1, 22208, 15462, 22213, 15465, 20506, 15483, 20513, 22216, 15489, 20516, 15472, 15503, 15495, 15478, 15441, и 20496.В одном варианте осуществления изобретения, CDR представляют собой CDR, определенные по Кабат, CDR, определенные по Хотиа, или CDR, определенные по AbM.

[0019] В данном документе также предлагается выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с В7-Н4 человека, содержащие последовательности определяющего комплементарность участка (CDR) 1 вариабельного участка тяжелой цепи (VH), CDR2 VH, CDR3 VH и CDR1, CDR2 и CDR3 вариабельного участка легкой цепи (VL) из SEQ ID NO: 458-463 соответственно. В одном варианте осуществления данного изобретения, (i) антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат вариабельный участок тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 464, и вариабельный участок легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 42, или (ii) антитело содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 469, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 44.

[0020] В данном документе также предлагается выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с В7-Н4 человека,

содержащие последовательности определяющего комплементарность участка (CDR) 1 вариабельного участка тяжелой цепи (VH), CDR2 VH, CDR3 VH и CDR1, CDR2 и CDR3 вариабельного участка легкой цепи (VL) из SEQ ID NO: 35-40 соответственно. В одном варианте осуществления изобретения (i) антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат вариабельный участок тяжелой цепи, содержащим аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 41, и вариабельный участок легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 42, или (ii) антитело содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 43, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 44.

[0021] В данном документе также предлагается выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с В7-Н4 человека, содержащие последовательности определяющего комплементарность участка (CDR) 1 вариабельного участка тяжелой цепи (VH), CDR2 VH, CDR3 VH и CDR1, CDR2 и CDR3 вариабельного участка легкой цепи (VL) из SEQ ID NO: 65-70 соответственно. В одном варианте осуществления изобретения, (i) антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат вариабельный участок тяжелой цепи, содержащим аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 71, и вариабельный участок легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 72, или (ii) при этом антитело содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 73, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 74.

[0022] В данном документе также предлагается выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с тем же эпитопом В7-Н4 человека, что и антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-20. В одном варианте осуществления изобретения, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связываются с тем же эпитопом В7-Н4 человека, который определен с помощью SPR.

[0023] В одном варианте осуществления изобретения, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляют собой антитело человека или его антигенсвязывающий фрагмент. В одном варианте осуществления изобретения, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляют собой мышиное, гуманизированное или химерное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент.

[0024] В одном варианте осуществления изобретения, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент индуцируют пролиферацию Т-клеток. В одном варианте осуществления изобретения, антитело или антигенсвязывающий фрагмент усиливают пролиферацию Т-клеток по меньшей мере на 21 % по сравнению с обработкой контрольным антителом. В одном варианте осуществления изобретения, антитело или его

антигенсвязывающий фрагмент усиливают пролиферацию Т-клеток на около на 5 % до на около 35 % по сравнению с обработкой контрольным антителом. В одном варианте осуществления изобретения, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент индуцируют пролиферацию CD4+ Т-клеток. В одном варианте осуществления изобретения, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент усиливают пролиферацию CD4+ T-клеток по меньшей мере на 9 % по сравнению с обработкой контрольным антителом. В одном варианте осуществления изобретения, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент усиливают пролиферацию СD4+ Т-клеток на около 5 % до около 15 % по сравнению с обработкой контрольным антителом. В одном варианте осуществления изобретения, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент индуцируют пролиферацию CD8+ Tклеток. В варианте осуществления изобретения, одном антитело антигенсвязывающий фрагмент усиливают пролиферацию СD8+ Т-клеток по меньшей мере на 11 % по сравнению с обработкой контрольным антителом. В одном варианте осуществления изобретения, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент усиливают пролиферацию CD8+ Т-клеток на около 5 % до около 15 % по сравнению с обработкой контрольным антителом.

[0025] изобретения, В одном варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент индуцируют продукцию интерферона-гамма (ИФНу). В осуществления изобретения, одном варианте данного антитело или антигенсвязывающий фрагмент способны увеличивать продукцию ИФНу по меньшей мере в 2 раза, по меньшей мере в 3 раза, по меньшей мере в 4 раза и по меньшей мере в 5 раз, по меньшей мере в 6 раз, по меньшей мере в 7 раз, по меньшей мере в 8 раз, от около 2 до около 10 раз или от около 3 до около 10 раз.

[0026] В одном варианте осуществления данного изобретения, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент способны индуцировать антитело-зависимую клеточно-опосредованную цитотоксичность (АЗКЦ) в В7-Н4-экспрессирующей клетке. В одном варианте осуществления данного изобретения, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент индуцируют специфический лизис по меньшей мере на 20 %, по меньшей мере на 30 %, по меньшей мере на 40 %, от около 20 % до около 50 % или от около 30 % до около 50 % В7-Н4-экспрессирующих клеток.

[0027] В одном варианте осуществления данного изобретения, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент ингибируют рост опухоли в модели мышиной СТ26 колоректальной карциномы, модели 4Т1 карциномы молочной железы мыши или модели линии клеток меланомы В16-moB7-H4/H3. В одном варианте осуществления данного изобретения, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент снижают рост опухоли по

меньшей мере на 25 %, по меньшей мере на 30 %, по меньшей мере на 40 %, по меньшей мере на 45 % или по меньшей мере на 50 % по сравнению с обработкой контрольным антителом.

[0028] В одном варианте осуществления данного изобретения, индукция пролиферации Т-клеток, индукция пролиферации CD4+ Т-клеток, индукция пролиферации CD8+ Т-клеток, индукция продукции ИФНү, активность АЗКЦ и/или ингибирование роста опухоли зависит от дозы.

В одном варианте осуществления данного изобретения, антитело или его [0029] антигенсвязывающий фрагмент связываются с B7-H4 яванского макака (Cynomolgus). В варианте осуществления данного изобретения, одном антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связываются с В7-Н4 крысы. В одном варианте осуществления данного изобретения, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связываются с В7-Н4 мыши. В одном варианте осуществления данного изобретения, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связываются с В7-Н4 человека, В7-Н4 яванского макака, В7-Н4 крысы и В7-Н4 мыши.

[0030] В одном варианте осуществления данного изобретения, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связываются с доменом IgV B7-H4 человека.

[0031] В одном варианте осуществления данного изобретения, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент являются афукозилированным.

[0032] В одном варианте осуществления данного изобретения, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляют собой полноразмерное антитело. В одном варианте осуществления данного изобретения, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляют собой антигенсвязывающий фрагмент. В одном варианте осуществления данного изобретения, антигенсвязывающий фрагмент содержит Fab, Fab',  $F(ab')_2$ , одноцепочечный Fv (scFv), дисульфидно-связанный Fv, домен V-NAR, IgNar, внутриклеточный,  $IgG\Delta CH2$ , минитело,  $F(ab')_3$ , тетратело, триатело, диатело, однодоменное антитело, DVD-Ig, Fcab,  $MAT^2$ , (scFv) $_2$  или scFv-Fc.

[0033] В одном варианте осуществления данного изобретения, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент дополнительно содержат детектируемую метку.

[0034] В данном документе также предоставлен выделенный полинуклеотид, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую вариабельный участок тяжелой цепи или тяжелую цепь антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, предоставленного в данном документе. В одном варианте осуществления данного изобретения, молекула нуклеиновой кислоты кодирует VH SEQ ID NO: 11, 21, 31, 41, 464, 51, 61, 71, 81, 91, 101, 111, 121, 131, 141, 151, 161, 171, 181, 191 или 201 или тяжелую цепь

SEQ ID NO: 13, 23, 33, 43, 469, 53, 63, 73, 83, 93, 103, 113, 123, 133, 143, 153, 163 173, 183, 193 или 203. В одном варианте осуществления данного изобретения, молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность из SEQ ID NO: 213, 223, 233, 243, 470, 253, 263, 273, 283, 293, 303, 313, 323, 333, 343, 353, 363, 373, 383, 393 или 403. В одном варианте осуществления данного изобретения, молекула нуклеиновой кислоты содержит (і) последовательность из SEQ ID NO: 213, 223, 233, 243, 470, 253, 263, 273, 283, 293, 303, 313, 323, 333, 343, 353, 363, 373, 383, 393 или 403 и (ii) последовательность из SEQ ID NO: 408. В данном документе также предоставлен выделенный полинуклеотид, [0035] содержащий молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую вариабельный участок легкой цепи или легкую цепь антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, предоставленного в данном документе. В одном варианте осуществления данного изобретения, молекула нуклеиновой кислоты кодирует VL SEO ID NO: 12, 22, 32, 42, 52, 62, 72, 82, 92, 102, 112, 122, 132, 142, 152, 162, 172, 182, 192 или 202 или легкую цепь SEQ ID NO: 14, 24, 34, 44, 54, 64, 74, 84, 94, 104, 114, 124, 134, 144, 154, 164, 174, 184 194 или 204. В одном варианте осуществления данного изобретения, молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность из SEQ ID NO: 214, 224, 234, 244, 254, 264, 274, 284, 294, 304, 314, 324, 334, 344, 354, 364, 374, 384, 394 или 404. В одном варианте осуществления данного изобретения, молекула нуклеиновой кислоты содержит (і) последовательность из SEQ ID NO: 214, 224, 234, 244, 254, 264, 274, 284, 294, 304, 314, 324, 334, 344, 354, 364, 374, 384, 394 или 404 и (ii) последовательность из SEQ ID NO: 406.

[0036] В данном документе также предлагается выделенный полинуклеотид, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую вариабельный участок тяжелой цепи или тяжелую цепь антитела или антигенсвязывающего фрагмента, представленную в данном документе, и вариабельный участок легкой цепи или легкую цепь антитела или его антигенсвязывающего фрагмента.

[0037] В данном документе также представлен выделенный вектор, содержащий полинуклеотид, представленный в данном документе.

[0038] В данном документе также предоставлена клетка-хозяин, содержащая полинуклеотид, представленный в данном документе, вектор, представленный в данном документе, первый вектор, содержащий один полинуклеотид, представленный в данном документе (например, полинуклеотид, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую вариабельную тяжелую цепь или тяжелую цепь), и второй вектор, содержащий другой полинуклеотид, предоставленный в данном документе (например, полинуклеотид, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую вариабельную легкую цепь или легкую цепь). В одном варианте осуществления данного изобретения, клетка-хозяин представляет

собой клетку, выбранную из группы, состоящей из *E.coli, Pseudomonas, Bacillus, Streptomyces*, дрожжей, CHO, YB/20, NS0, PER-C6, HEK-293T, NIH-3T3, HeLa, BHK, Hep G2, SP2/0, R1.1, BW, LM, COS 1, COS 7, BSC1, BSC40, клетки BMT10, клетки растения, клетки насекомого и клетки человека в культуре ткани. В одном варианте осуществления данного изобретения, клетка-хозяин представляет собой клетку CHO.В одном варианте осуществления данного изобретения, клетка-хозяин (например, клетка-хозяин млекопитающего, такая как клетка CHO) не имеет функционального гена альфа-1,6-фукозилтрансферазы (FUT8).

[0039] В данном документе также предложен способ (например, способ *in vitro*) получения антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которые связываются с В7-Н4 человека, включающий культивирование клетки-хозяина, предоставленной в данном документе, так что молекула нуклеиновой кислоты экспрессируется, и продуцируется антитело или его антигенсвязывающий фрагмент.

[0040] В данном документе также предлагается выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с В7-Н4 человека и кодируются полинуклеотидом, представленным в данном документе.

[0041] В данном документе также предоставлена фармацевтическая композиция, содержащая антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, представленный в данном документе, полинуклеотид, представленный в данном документе, вектор, представленный в данном документе, или клетка-хозяин, представленная в данном документе; и фармацевтически приемлемый наполнитель.

[0042] В данном документе также предлагается фармацевтическая композиция, содержащая (i) антитела или антигенсвязывающие фрагменты, представленные в данном документе, и (ii) фармацевтически приемлемый наполнитель, при этом по меньшей мере 80 %, по меньшей мере 90 %, по меньшей мере 95 %, при по меньшей мере 96 %, по меньшей мере 97 %, по меньшей мере 98 % или по меньшей мере 99 % антител или их антигенсвязывающих фрагментов в композиции являются афукозилированными.

[0043] В данном документе также предоставлена фармацевтическая композиция, содержащая (i) антитела или антигенсвязывающие фрагменты, представленные в данном документе, и (ii) фармацевтически приемлемый наполнитель, при этом по меньшей мере 95 % антител или их антигенсвязывающих фрагментов в композиции являются афукозилированными.

[0044] В данном документе также предложена фармацевтическая композиция, содержащая (i) антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связываются с В7-Н4 человека и содержат последовательности определяющего

комплементарность участка (CDR) 1 вариабельного участка тяжелой цепи (VH), CDR2 VH, CDR3 VH и CDR1, CDR2 и CDR3 вариабельного участка легкой цепи (VL) из SEQ ID NO: 458-463 соответственно и (ii) фармацевтически приемлемый наполнитель, при этом по меньшей мере 80 %, по меньшей мере 85 %, по меньшей мере 90 %, при по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99 % антител или их антигенсвязывающих фрагментов в композиции являются афукозилированными. В одном варианте осуществления изобретения, (i) антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельный участок тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 464, и вариабельный участок легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 42, (ii) содержит тяжелую содержащую или антитело цепь, аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 469, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 44.

[0045] В данном документе также предложена фармацевтическая композиция, содержащая (i) антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связываются с B7-H4 человека и содержат последовательности определяющего комплементарность участка (CDR) 1 вариабельного участка тяжелой цепи (VH), CDR2 VH, CDR3 VH и CDR1, CDR2 и CDR3 вариабельного участка легкой цепи (VL) из SEQ ID NO:458-463 соответственно и (ii) фармацевтически приемлемый наполнитель, при этом по меньшей мере 95 % антител или их антигенсвязывающих фрагментов в композиции являются афукозилированными. В одном варианте осуществления данного изобретения (i) антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат вариабельный участок тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность из SEQ ID NO:464, и вариабельный участок легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 42, или (ii) антитело содержащее тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 469, и легкую цепи, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 44.

[0046] В данном документе также предложена фармацевтическая композиция, содержащая (i) антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связываются с В7-Н4 человека и содержат последовательности определяющего комплементарность участка (CDR) 1 вариабельного участка тяжелой цепи (VH), CDR2 VH, CDR3 VH и CDR1, CDR2 и CDR3 вариабельного участка легкой цепи (VL) из SEQ ID NO: 35-40 соответственно и (ii) фармацевтически приемлемый наполнитель, при этом по меньшей мере 80 %, по меньшей мере 90 %, при по меньшей мере 95 %, по меньшей мере 96 %, по меньшей мере 98 % или по меньшей

мере 99 % антител или их антигенсвязывающих фрагментов в композиции являются афукозилированными. В одном варианте осуществления изобретения, (i) антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат вариабельный участок тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 41, и вариабельный участок легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 42, или (ii) антитело содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 43, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 44.

В данном документе также предложена фармацевтическая композиция, [0047] содержащая (і) антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связываются с В7-Н4 человека и содержат последовательности определяющего комплементарность участка (CDR) 1 вариабельного участка тяжелой цепи (VH), CDR2 VH, CDR3 VH и CDR1, CDR2 и CDR3 вариабельного участка легкой цепи (VL) из SEQ ID NO: 35-40 соответственно и (ii) фармацевтически приемлемый наполнитель, в которой по меньшей мере 95 % антител или их антигенсвязывающих фрагментов находятся в композиции в афукозилированном состоянии. В одном варианте осуществления изобретения, (i) антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат вариабельный участок тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 41, содержащий аминокислотную вариабельный участок легкой цепи, последовательность из SEQ ID NO: 42, или (ii) антитело содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 43, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 44.

[0048] В данном документе также предложена фармацевтическая композиция, содержащая (i) антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связываются с B7-H4 человека и содержат последовательности определяющего комплементарность участка (CDR) 1 вариабельного участка тяжелой цепи (VH), CDR2 VH, CDR3 VH и CDR1, CDR2 и CDR3 вариабельного участка легкой цепи (VL) из SEQ ID NO: 65-70 соответственно и (ii) фармацевтически приемлемый наполнитель, при этом по меньшей мере 80 %, по меньшей мере 85 %, по меньшей мере 90 %, при по меньшей мере 95 %, по меньшей мере 96 %, по меньшей мере 97 %, по меньшей мере 98 % или по меньшей мере 99 % антител или их антигенсвязывающих фрагментов в композиции являются афукозилированными. В одном варианте осуществления изобретения, (i) антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат вариабельный участок тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 71, и вариабельный участок легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 72,

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

[0049] В данном документе также предложена фармацевтическая композиция, содержащая (і) антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связываются с В7-Н4 человека и содержат последовательности определяющего комплементарность участка (CDR) 1 вариабельного участка тяжелой цепи (VH), CDR2 VH, CDR3 VH и CDR1, CDR2 и CDR3 вариабельного участка легкой цепи (VL) из SEQ ID NO: 65-70 соответственно и (ii) фармацевтически приемлемый наполнитель, в которой по меньшей мере 95 % антител или их антигенсвязывающих фрагментов находятся в композиции в афукозилированном состоянии. В одном варианте осуществления изобретения, (і) антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат вариабельный участок тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 71, вариабельный участок легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 72, или (ii) причем антитело содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 73, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 74.

[0050] В одном варианте осуществления данного изобретения, фукозилирование не обнаружено в композиции.

[0051] В данном документе также предложен способ индукции пролиферации Т-клеток, включающий приведение в контакт Т-клетки с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, представленным в данном документе, полинуклеотидом, представленным в данном документе, вектором, представленным в данном документе, клеткой-хозяином, предоставленной данном документе, или фармацевтической композицией, предоставленной в данном документе. В одном варианте осуществления данного изобретения, пролиферация Т-клеток снижается, по меньшей мере на 30 %, по меньшей мере на 40 %, по меньшей мере на 50 %, по меньшей мере на 60 %, по меньшей мере на 70 % или по меньшей мере на 80 % (например, по сравнению с обработкой контрольным антителом).

[0052] В данном документе также предложен способ индукции пролиферации CD4+ Т-клеток, включающий приведение в контакт CD4+ Т-клетки с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, представленным в данном документе, полинуклеотидом, представленным в данном документе, вектором, представленным в данном документе, клеткой-хозяином, предоставленной в данном документе, или фармацевтической композицией, предоставленной в данном документе. В одном варианте

осуществления данного изобретения, пролиферация CD4+ Т-клеток снижается, по меньшей мере на 30 %, по меньшей мере на 40 %, по меньшей мере на 50 %, по меньшей мере на 60 %, по меньшей мере на 70 % или по меньшей мере на 80 % (например, по сравнению с обработкой контрольным антителом).

[0053] В данном документе также предложен способ индукции пролиферации CD8+ Т-клеток, включающий приведение в контакт CD8+ Т-клетки с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, представленным в данном документе, полинуклеотидом, представленным в данном документе, вектором, представленным в данном документе, клеткой-хозяином, предоставленной в данном документе, или фармацевтической композицией, предоставленной в данном документе. В одном варианте осуществления данного изобретения, пролиферация CD8+ Т-клеток снижается, по меньшей мере на 30 %, по меньшей мере на 40 %, по меньшей мере на 50 %, по меньшей мере на 60 %, по меньшей мере на 70 % или по меньшей мере на 80 % (например, по сравнению с обработкой контрольным антителом).

[0054] В данном документе также предложен способ индукции образования гаммаинтерферона, включающий приведение в контакт Т-клетки с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, представленным в данном документе, полинуклеотидом, представленным в данном документе, вектором, представленным в данном документе, клеткой-хозяином, предоставленной в данном документе, или фармацевтической композицией, предоставленной в данном документе. В одном варианте осуществления данного изобретения, продукция гамма-интерферона увеличивается, по меньшей мере на 30 %, по меньшей мере на 40 %, по меньшей мере на 50 %, по меньшей мере на 60 %, по меньшей мере на 70 % или по меньшей мере на 80 % (например, по сравнению с обработкой контрольным антителом).

[0055] В данном документе также предложен способ уничтожения клетки, экспрессирующей В7-Н4, включающий приведение в контакт клетки с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, представленным в данном документе, полинуклеотидом, представленным в данном документе, вектором, представленным в данном документе, клеткой-хозяином, предоставленной в данном документе, или фармацевтической композицией, предоставленной в данном документе.

[0056] В данном документе также представлен способ деплетирования В7-Н4экспрессирующих клеток из популяции клеток, включающий приведение в контакт популяции клеток с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, представленным в данном документе, полинуклеотидом, представленным в данном документе, вектором, представленным в данном документе, клеткой-хозяином, предоставленной в данном документе, или фармацевтической композицией, предоставленной в данном документе.

[0057] В одном варианте осуществления данного изобретения, уничтожение или деплетирование происходит через АЗКЦ.

[0058] В одном варианте осуществления данного изобретения, приведение в контакт происходит *in vitro*. В одном варианте осуществления данного изобретения, приведение в контакт происходит у субъекта.

В данном документе также предложен способ лечения рака у субъекта, [0059] эффективного количества включающий введение субъекту антитела ИЛИ его антигенсвязывающего фрагмента, представленным в данном документе, полинуклеотидом, представленным в данном документе, вектором, представленным в данном документе, клеткой-хозяином, предоставленной в данном документе, или фармацевтической композицией, предоставленной в данном документе. В одном варианте осуществления данного изобретения, рак выбран из группы, состоящей из рака молочной железы, такого как тройной негативный рак молочной железы или инвазивный рак протоков, рак эндометрия, рак яичников, немелкоклеточный рак легких, рак поджелудочной железы, рак щитовидной железы, рак почки и мочевого пузыря рак. В одном варианте осуществления данного изобретения, рак молочной железы представляет собой тройной негативный рак молочной железы, или при этом немелкоклеточный рак легкого представляет собой плоскоклеточный рак. В одном варианте осуществления данного изобретения, немелкоклеточный рак легкого представляет собой аденокарциному. В одном варианте осуществления данного изобретения, рак выбран из группы, состоящей из рака головы и шеи, мелкоклеточного рака легкого, рака желудка и меланомы. В одном варианте осуществления данного изобретения, рак яичника представляет собой серозную аденокарциному. В одном варианте осуществления данного изобретения, рак молочной железы представляет собой аденокарциному протоков.

[0060] В одном варианте осуществления данного изобретения, рак представляет собой не отвечающий требованиям ингибитора PD-1, и/или не отвечающий требованиям ингибитора PD-L1. В одном варианте осуществления данного изобретения, рак экспрессирует низкий уровень PD-L1.

[0061] В одном варианте осуществления данного изобретения, субъект является человеком.

[0062] Также в данном документе представлен способ обнаружения В7-Н4 в образце, включающий приведение в контакт указанного образца с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, предоставленный в данном документе. В одном варианте осуществления данного изобретения, образец получают из рака субъекта-

человека.

[0063] В данном документе также предоставлен набор, содержащий антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, представленный в данном документе, полинуклеотид, представленный в данном документе, вектор, представленный в данном документе, клетка-хозяин, представленная в данном документе, или фармацевтическая композиция, представленная в данном документе, и а) реагент для детекции, б) антиген В7-Н4, с) уведомление, которое отражает одобрение использования или продажи для введения человеку, или d) их комбинация.

[0064] В данном документе также предлагается выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, при этом антитело или его антигенсвязывающий фрагмент ингибирует активность блокады Т-клеточной контрольной точки В7-Н4. В одном варианте осуществления данного изобретения, активность блокады Т-клеточной контрольной точки измеряют по увеличению продукции ИЛ-2 по сравнению с контрольными клетками.

[0065] В данном документе также предлагается фармацевтическая композиция, содержащая (i) антитела или антигенсвязывающие фрагменты и (ii) фармацевтически приемлемый наполнитель, при этом антитела или антигенсвязывающие фрагменты ингибируют активность блокады Т-клеточной контрольной точки В7-Н4. В варианте осуществления данного изобретения, активность блокады Т-клеточной контрольной точки измеряют по увеличению продукции ИЛ-2 по сравнению с контрольными клетками.

#### КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

[0066] На Фиг. 1А продемонстрирована экспрессия В7-Н4 в различных опухолевых тканях. (См. Пример 1.)

[0067] На Фиг. 1В продемонстрирована распространенность В7-Н4 при различных типах опухолей по данным ИГХ. (См. Пример 1.)

[0068] На Фиг. 2A продемонстрировано связывание антител B7-H4 с клетками HEK293T, экспрессирующими B7-H4 человека, яванского макака или мыши. (См. Пример 6.)

[0069] На Фиг. 2В продемонстрировано связывание антител В7-Н4 с клетками SK-BR-3 и с клетками НЕК293Т, экспрессирующими В7-Н4 мыши, яванского макака или крысы. (См. Пример 6.)

[0070] На Фиг. 3A продемонстрировано влияние антител B7-H4 на пролиферацию  $CD4^+$ ,  $CD8^+$  или общего количества Т-клеток. (См. Пример 7.)

[0071] На Фиг. 3В продемонстрировано влияние антител В7-Н4 на продукцию интерферона-гамма (ИФНү). (См. Пример 7.)

[0072] На Фиг. 3С продемонстрировано влияние антител В7-Н4 на пролиферацию  $CD4^+$ ,  $CD8^+$  или общего количества Т-клеток и на продукцию интерферона-гамма (ИФН $\gamma$ ). (См. Пример 7.)

[0073] На Фиг. 3D продемонстрировано влияние различных концентраций антител В7-Н4 на продукцию интерферона-гамма (ИФНу). (См. Пример 7.)

[0074] На Фиг. 4A-4D продемонстрировано связывание фукозилированных и афукозилированных антител с B7-H4 на клетках SK-BR-3 (Фиг. 4A) и с клетками HEK293T, экспрессирующими B7-H4 мыши (Фиг. 4B), яванского макака (Фиг. 4C) или крысы (Фиг. 4D). (См. Пример 9.)

[0075] На Фиг. 5А и 5В продемонстрировано связывание афукозилированных и фукозилированных антител В7-Н4 (соответственно) с аллелем V158 рецептора Ша (Fc□RIIIa) человека Fc□. (См. Пример 10.)

[0076] На Фиг. 6А продемонстрирована активность блокады Т-клеточной контрольной точки фукозилированных и афукозилированных антител В7-Н4. (См. Пример 11.)

[0077] На Фиг. 6В продемонстрирована активность лиганда контрольной точки Т-клеток афукозилированных антител В7-Н4 по сравнению с клетками, обработанными изотипическим контролем, по данным продукции ИЛ-2. (См. Пример 11.)

[0078] На Фиг. 7 продемонстрирована активность АЗКЦ фукозилированных и афукозилированных антител В7-Н4 против линии клеток, экспрессирующих В7-Н4. (См. Пример 12.)

[0079] На Фиг. 8 продемонстрирована активность АЗКЦ фукозилированных и афукозилированных антител В7-Н4 против клеток с различными уровнями экспрессии В7-Н4. (См. Пример 13.)

[0080] На Фиг. 9А продемонстрирована противоопухолевая эффективность *in vivo* антитела В7-Н4 20502. (См. Пример 14.)

[0081] На Фиг. 9В продемонстрирована противоопухолевая эффективность *in vivo* антитела В7-Н4 22213. (См. Пример 14.)

[0082] На Фиг. 10 продемонстрирована противоопухолевая эффективность *in vivo* мышиной версии антитела В7-Н4 20502 у мышей, которым имплантированы клетки 4Т1 (рак молочной железы) и В16 (меланома). (См. Пример 14.)

[0083] На Фиг. 11 продемонстрирована противоопухолевая эффективность *in vivo* афукозилированного 20502 в модели ксенотрансплантата рака молочной железы человека МХ-1. Изображения демонстрируют экспрессию В7-Н4 человека в опухоли ксенотрансплантата МХ-1 (слева) и экспрессию мышиного В7-Н4 в опухолях 4Т1 (справа). (См. Пример 14.)

[0084] На Фиг. 12А-12С продемонстрирована противоопухолевая эффективность *in vivo* 20502-msIgG2a-F, введенного в тот же день, что и анти-PD-1 антитело. (См. Пример 15.) \* обозначает р <0,05; и \*\*\*\* обозначает р <0,0001.

[0085] На Фиг. 13 продемонстрировано, что лечение с афукозилированным 20502 (нижние вставки) приводит к инфильтрации НК-клетками (левые вставки), инфильтрации Т-клетками (центральные вставки) и повышению уровня PD-L1 (правые вставки) по сравнению с лечением с контрольным антителом (верхние вставки). (См. Пример 16.)

[0086] На Фиг. 14А продемонстрировано, что антитело 20502-msIgG2a-F значительно снижает рост опухоли в клетках карциномы молочной железы 4Т1 в зависимости от дозы. (См. Пример 17.)

[0087] На Фиг. 14В продемонстрировано, что антитело 20502-msIgG2a-F значительно ингибирует рост опухоли при 30 мг/кг (p=0,0003), 20 мг/кг (p=0,0103), 10 мг/кг (p=0,0419), 3 мг/кг (p=0,0277) и 1 мг/кг (p=0,0333) согласно оценке однонаправленным ANOVA на 30-й день. (См. Пример 17.)

[0088] На Фиг. 15A продемонстрировано, что антитело 20502-msIgG2a-F значительно снижает рост В16, экспрессирующих В7-Н4/Н3. (См. Пример 17.)

[0089] На Фиг. 15В продемонстрировано, что антитело 20502-msIgG2a-F значительно ингибирует рост опухоли при 30 мг/кг (p = 0,0085), 20 мг/кг (p = 0,0041), 10 мг/кг (p = 0,0017) и 3 мг/кг (p = 0,0420) согласно оценке однонаправленным ANOVA на 23-й день. (См. Пример 17.)

### ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0090] В данном документе представлены антитела (например, моноклональные антитела) и их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связываются с В7-Н4 (например, В7-Н4 человека). Анти-В7-Н4 антитела и их антигенсвязывающие фрагменты могут, например, приводить к активности блокады контрольных точек Т-клеток (например, измеряемой по увеличению интерферона-гамма (ИФНү), пролиферации СD4 Т-клеток, пролиферации CD8 Т-клеток и/или пролиферации общего количества Т-клеток) и/или обладают антителозависимой клеточной цитотоксичностью (активность АЗКЦ).

[0091] Также представлены выделенные нуклеиновые кислоты (полинуклеотиды), такие как комплементарная ДНК (кДНК), кодирующая такие антитела и их антигенсвязывающие фрагменты. Кроме того, представлены векторы (например, векторы экспрессии) и клетки (например, клетки-хозяева), содержащие нуклеиновые кислоты (полинуклеотиды), кодирующие такие антитела, и их антигенсвязывающие фрагменты.

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

# 1.1 Терминология

[0092] Используемый в данном документе термин «В7-Н4» относится к полипептидам В7-Н4 млекопитающих, включая, но не ограничиваясь этим, нативные полипептиды В7-Н4 и изоформы полипептидов В7-Н4. «В7-Н4» охватывает полноразмерные необработанные полипептиды В7-Н4, а также формы полипептидов В7-Н4, которые возникают в результате процессинга внутри клетки. Используемый в данном документе термин «В7-Н4 человека» относится к полипептиду, содержащему аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 1. «Полинуклеотид В7-Н4», «нуклеотид В7-Н4» или «нуклеиновая кислота В7-Н4» относятся к полинуклеотиду, кодирующему В7-Н4.

[0093] Используемый в данном документе термин «PD-1» относится к полипептидам PD-1 млекопитающих, включая, но не ограничиваясь этим, нативные полипептиды PD-1 и изоформы полипептидов PD-1. PD-1 также упоминается как белок 1 запрограммированной смерти или белок 1 запрограммированной смерти клеток. «PD-1» охватывает полноразмерные необработанные полипептиды PD-1, а также формы полипептидов PD-1, которые возникают в результате процессинга в клетке. Используемый в данном документе термин «PD-1 человека» относится к полипептиду, содержащему аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 439.

**PGWFLDSPDR PWNPPTFSPA** LLVVTEGDNA **TFTCSFSNTS ESFVLNWYRM SPSNQTDKLA AFPEDRSOPG QDCRFRVTQL PNGRDFHMSV VRARRNDSGT** YLCGAISLAP KAQIKESLRA **ELRVTERRAE** VPTAHPSPSP **RPAGQFQTLV** VGVVGGLLGS LVLLVWVLAV **EDPSAVPVFS** ICSRAARGTI GARRTGQPLK **REKTPEPPVP** VDYGELDFQW **CVPEQTEYAT IVFPSGMGTS SPARRGSADG** PRSAQPLRPE DGHCSWPL (SEQ ID NO: 439) (зрелый PD-1 человека без сигнальной последовательности). «Полинуклеотид PD-1», «нуклеотид PD-1» или «нуклеиновая кислота PD-1» относятся к полинуклеотиду, кодирующему PD-1.

[0094] Термин «антитело» означает молекулу иммуноглобулина, которая распознает и специфически связывается с мишенью, такой как белок, полипептид, пептид, углевод, полинуклеотид, липид или их комбинации, по меньшей мере, через один сайт распознавания антигена в вариабельном участке молекулы иммуноглобулина. Используемый в данном документе термин «антитело» охватывает интактные

поликлональные антитела, интактные моноклональные антитела, химерные антитела, гуманизированные антитела, антитела человека, слитые белки, содержащие антитело, и любую другую модифицированную молекулу иммуноглобулина, при условии, что антитела проявляют желаемую биологическую активность. Антитело может относиться к любому из пяти основных классов иммуноглобулинов: IgA, IgD, IgE, IgG и IgM или их подклассы (изотипы) (например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и IgA2) на основании идентичности их константных доменов тяжелой цепи, называемых альфа, дельта, эпсилон, гамма и мю, соответственно. Различные классы иммуноглобулинов имеют разные и хорошо известные структуры субъединиц и трехмерные конфигурации. Антитела могут быть обнажены или конъюгированы с другими молекулами, такими как токсины, радиоизотопы и т. д.

[0095] Термин «фрагмент антитела» относится к части интактного антитела. «Антигенсвязывающий «антигенсвязывающий фрагмент», домен» или «антигенсвязывающий участок» относится к части интактного антитела, которая связывается с антигеном. Антигенсвязывающий фрагмент может содержать антигенные определяющие участки интактного антитела (например, определяющие комплементарность участки (CDR)). Примеры антигенсвязывающих фрагментов антител включают, но не ограничиваются ими, фрагменты Fab, Fab', F(ab')2 и Fv, линейные антитела и одноцепочечные антитела. Антигенсвязывающий фрагмент антитела может быть получен от любых видов животных, таких как грызуны (например, мышь, крыса или хомяк), и человека, или может быть получен искусственно.

[0096] Термины «анти-В7-Н4 антитело», «антитело В7-Н4» и «антитело, которое связывается с В7-Н4» относятся к антителу, которое способно связывать В7-Н4 с достаточной аффинностью, так что антитело может быть использовано в качестве диагностического и/или терапевтического средства для нацеливания на В7-Н4. Степень связывания анти-В7-Н4 антитела с неродственным белком, не относящимся к В7-Н4, может составлять менее чем около 10 % от связывания антитела с В7-Н4, измеренного, например, радиоиммуноанализом (РИА).

[0097] Термины «анти-PD-1 антитело», «антитело PD-1» и «антитело, которое связывается с PD-1» относятся к антителу, которое способно связывать PD-1 с достаточной аффинностью, так что антитело может быть использовано в качестве диагностического и/или терапевтического средства для нацеливания на PD-1. Степень связывания анти-PD-1 антитела с неродственным белком, не относящимся к PD-1, может составлять менее чем около 10 % от связывания антитела с PD-1, измеренного, например, радиоиммуноанализом (РИА).

[0098] «Моноклональное» антитело или его антигенсвязывающий фрагмент относится

к популяции гомогенных антител или антигенсвязывающих фрагментов, участвующих в высокоспецифичном распознавании и связывании одной антигенной детерминанты или эпитопа. Это отличается от поликлональных антител, которые обычно включают разные антитела, направленные против разных антигенных детерминант. «моноклональное» антитело или его антигенсвязывающий фрагмент охватывает как интактные, так и полноразмерные моноклональные антитела, а также фрагменты антител (такие как Fab, Fab', F(ab')2, Fv), одноцепочечные (scFv) мутанты, слитые белки, любую содержащие часть антитела, И другую модифицированную молекулу иммуноглобулина, содержащую сайт узнавания антигена. Кроме того, «моноклональное» антитело или его антигенсвязывающий фрагмент относится к таким антителам и их антигенсвязывающим фрагментам, полученным любым числом способов, включая, но не ограничиваясь ими, гибридому, отбор фага, рекомбинантную экспрессию и трансгенных животных.

[0099] Используемые в данном документе термины «вариабельный участок» или «вариабельный домен» используются взаимозаменяемо и являются общими в данной области техники. Вариабельный участок обычно относится к части антитела, обычно к части легкой или тяжелой цепи, обычно к аминоконцу от 110 до 120 аминокислот или от 110 до 125 аминокислот в зрелой тяжелой цепи и от около 90 до 115 аминокислоты в зрелой легкой цепи, которые значительно различаются по последовательности среди антител и используются в связывании и специфичности конкретного антитела к его конкретному антигену. Изменчивость в последовательности сконцентрирована в тех участках, которые называются определяющими комплементарность участками (CDR), в то время как более высоко консервативные участки в вариабельном домене называются каркасными участками (FR). Не желая быть связанными каким-либо конкретным механизмом или теорией, полагают, что CDR легкой и тяжелой цепей несут основную ответственность за взаимодействие и специфичность антитела с антигеном. В определенных вариантах осуществления данного изобретения, вариабельный участок представляет собой вариабельный участок человека. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, вариабельный участок включает CDR грызунов или мышей и каркасные участки человека (FR). В конкретных вариантах осуществления данного изобретения, вариабельный участок представляет собой вариабельный участок примата (например, отличного от человека). В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, вариабельный участок содержит CDR грызунов или мышей и каркасные участки (FR) приматов (например, приматов, отличных от человека).

[00100] Термины «VL» и «домен VL» используются взаимозаменяемо для обозначения

вариабельного участка легкой цепи антитела.

[00101] Термины «VH» и «домен VH» используются взаимозаменяемо для обозначения вариабельного участка тяжелой цепи антитела.

Термин «нумерация по Кабат» и подобные термины известны в данной области [00102] и относятся к системе нумерации аминокислотных остатков в вариабельных участках тяжелой и легкой цепи антитела или его антигенсвязывающего фрагмента. В определенных аспектах CDR могут быть определены в соответствии с системой нумерации Кабат (см., например, Kabat EA & Wu TT (1971) Ann NY Acad Sci 190:382-391 and Kabat EA et al., (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S.Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242). Используя систему нумерации по Кабат, CDR в молекуле тяжелой цепи антитела обычно присутствуют в положениях аминокислот от 31 до 35, которые необязательно могут включать одну или две дополнительные аминокислоты, следующие за 35 (упоминается в схеме нумерации по Кабат как 35A и 35B) (CDR1), положения аминокислот от 50 до 65 (CDR2) и положения аминокислот от 95 до 102 (CDR3). Используя систему нумерации по Кабат, CDR в молекуле легкой цепи антитела обычно присутствуют в положениях аминокислот 24-34 (CDR1), положениях аминокислот 50-56 (CDR2) и положениях аминокислот 89-97 (CDR3). В конкретном варианте осуществления данного изобретения, CDR антител, описанных в данном документе, были определены в соответствии со схемой нумерации по Кабат.

[00103] Хотиа ссылается вместо этого на расположение структурных петель (Chothia and Lesk, J. Mol. Biol. 196: 901-917 (1987)). Конец петли CDR-H1 по Хотиа при нумерации с использованием соглашения о нумерации по Кабат варьируется между H32 и H34 в зависимости от длины петли (это связано с тем, что схема нумерации по Кабат размещает вставки в H35A и H35B; если ни 35A, ни 35B не присутствуют, петля заканчивается на 32; если присутствует только 35A, петля заканчивается на 33; если присутствует обе 35A и 35B, петля заканчивается на 34). Гипервариабельные участки AbM представляют собой компромисс между CDR по Кабат и структурными петлями по Хотиа и используются программным обеспечением для моделирования антител AbM Oxford Molecular.

Петля	Кабат	AbM	Хотиа
L1	L24-L34	L24-L34	L24-L34
L2	L50-L56	L50-L56	L50-L56
L3	L89-L97	L89-L97	L89-L97
H1	H31-H35B	H26-H35B	H26-H3234
		(Нумерация по Кабат)	
H1	H31-H35	H26-H35	H26-H32

		(Нумерация по Хотиа)	
H2	H50-H65	H50-H58	H52-H56
H3	H95-H102	H95-H102	H95-H102

[00104] Используемый в данном документе термин «константный участок» или «константный домен» являются взаимозаменяемыми и имеют общее значение в данной области техники. Константный участок представляет собой часть антитела, например, карбоксильную концевую часть легкой и/или тяжелой цепи, которая непосредственно не участвует в связывании антитела с антигеном, но которая может проявлять различные эффекторные функции, такие как взаимодействие с Fc-рецептором. Константный участок молекулы иммуноглобулина обычно имеет более консервативную аминокислотную последовательность относительно вариабельного домена иммуноглобулина. определенных аспектах антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит константный участок или его часть, достаточный для антителозависимой клеточноопосредованной цитотоксичности (АЗКЦ).

[00105] Используемый в данном документе термин «тяжелая цепь» при использовании в отношении антитела может относиться к любому отдельному типу, например, альфа ( $\alpha$ ), дельта ( $\delta$ ), эпсилон ( $\epsilon$ ), гамма ( $\gamma$ ) и мю ( $\mu$ ), на основе аминокислотной последовательности константного домена, которая приводит к классам антител IgA, IgD, IgE, IgG и IgM соответственно, включая подклассы IgG, например, IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub> и IgG<sub>4</sub>. Аминокислотные последовательности тяжелой цепи хорошо известны в данной области. В конкретных вариантах осуществления данного изобретения, тяжелая цепь представляет собой тяжелую цепь человека.

[00106] Используемый в данном документе, термин «легкая цепь» при использовании в отношении антитела может относиться к любому отдельному типу, например, каппа (к) или лямбда ( $\lambda$ ) на основе аминокислотной последовательности константных доменов. Аминокислотные последовательности легкой цепи хорошо известны в данной области. В конкретных вариантах осуществления данного изобретения, легкая цепь представляет собой легкую цепь человека.

[00107] Термин «химерные» антитела или их антигенсвязывающие фрагменты относятся к антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, при этом аминокислотная последовательность происходит из двух или более видов. Как правило, вариабельный участок легкой и тяжелой цепей соответствует вариабельному участку антител или их антигенсвязывающих фрагментов, полученных от одного вида млекопитающих (например,

мыши, крысы, кролика и т. д.) с желаемой специфичностью, аффинностью и способностью в то время как константные участки гомологичны последовательностям антител или их антигенсвязывающих фрагментов, полученных от другого (обычно человека), чтобы избежать иммунного ответа у этого вида.

[00108] Термин «гуманизированное» антитело или его антигенсвязывающий фрагмент относится к формам отличных от человека (например, мышиных) антител или антигенсвязывающих фрагментов, которые представляют собой специфические цепи иммуноглобулинов, химерные иммуноглобулины или их фрагменты, которые содержат минимальное количество отличной от человека (например, мышиной) последовательности. Как правило, гуманизированные антитела или их антигенсвязывающие фрагменты представляют собой человеческие иммуноглобулины, в которых остатки из определяющего комплементарность участка (CDR) заменены остатками из CDR отличного от человека вида (например, мыши, крысы, кролика, хомяка), которые имеют желаемую специфичность, аффинность и способность («привитая CDR») (Jones et al., Nature 321: 522-525 (1986); Riechmann et al., Nature 332: 323-327 (1988); Verhoeyen et al., Science 239: 1534-1536 (1988)).В некоторых случаях остатки каркасного участка Fv (FR) человеческого иммуноглобулина заменяются соответствующими остатками в антителе или фрагменте отличного от человека вида, который обладает желаемой специфичностью, аффинностью и способностью. Гуманизированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент могут быть дополнительно модифицированы путем замены дополнительных остатков либо в каркасном участке Fv, и/или внутри замещенных отличных от человека остатков, чтобы очистить и оптимизировать антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, специфичность, аффинность, и/или способность. В общем, гуманизированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент будет содержать по существу все по меньшей мере один, и, как правило, два или три вариабельных домена, содержащие все или по существу все участки CDR, которые соответствуют отличному от человека иммуноглобулину, тогда как все или по существу все участки FR являются участками консенсусной последовательности человеческого иммуноглобулина. Гуманизированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент также могут содержать по меньшей мере часть константного участка или домена иммуноглобулина (Fc), обычно иммуноглобулина человека. Примеры способов, используемых для получения гуманизированных антител, описаны в патенте США.5225539; Roguska et al., Proc Natl Acad Sci USA, 91(3):969-973 (1994), и Roguska et al., Protein Eng. 9(10):895-904 (1996). В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, «гуманизированное антитело» представляет собой антитело с измененной поверхностью.

[00109] Термин «человеческое» антитело или его антигенсвязывающий фрагмент означает антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, имеющие аминокислотную последовательность, полученную из локуса гена иммуноглобулина человека, при этом такое антитело или антигенсвязывающий фрагмент получают с использованием любого метода, известного в данной области техники. Это определение антитела человека или его антигенсвязывающего фрагмента включает интактные или полноразмерные антитела и их фрагменты.

[00110] «Афукозилированное» антитело или его антигенсвязывающий фрагмент или антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, «лишенные фукозы», относится к антителу изотипа IgG1 или IgG3 или его антигенсвязывающему фрагменту, в котором отсутствует гликозилирование константного участка фукозы. Гликозилирование человеческого IgG1 или IgG3 происходит в Asn297 в виде гликозилирования олигосахарида центрального фукозилированного биантеннального комплекса, оканчивающегося до 2 Galостатков. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, афукозилированное антитело лишено фукозы в Asn297. Эти структуры обозначены как остатки гликана G0, Gl (а 1,6 или 1,3) или G2 в зависимости от количества концевых остатков Gal. См., например, Raju, T.S., BioProcess Int. 1:44-53 (2003). Гликозилирование типа CHO Fc антитела описано, например, в Routier, F.FL, Glycoconjugate J. 14:201-207 (1997).

[00111] Способы измерения фукозы включают любые способы, известные в данной области. Для целей данного изобретения фукозу обнаруживают способом, описанным в Примере 1 WO2015/017600, который полностью включен в данное описание посредством ссылки. Вкратце, анализ гликанов осуществляют путем высвобождения гликанов из антитела (например, путем ферментативного высвобождения), маркировки гликанов антраниловой кислотой (2-AA) и затем очистки меченых гликанов. ВЭЖХ с нормальной фазой с флуоресцентным детектированием используют для разделения гликанов и измерения относительного количества каждого гликана в антителе. Гликаны могут быть положительно идентифицированы как лишенные или включающие фукозу с помощью масс-спектрометрии. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, фукоза не обнаруживается в композиции, содержащей множество афукозилированных антител или их антигенсвязывающих фрагментов. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, афукозилированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент обладает повышенной активностью АЗКЦ, что может быть измерено с помощью анализа, приведенного в примере 12 данного документа. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, афукозилированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент обладает повышенной аффинностью к Fc-гамма RIIIA. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, афукозилированное антитело или его фрагмент обладает повышенной аффинностью антигенсвязывающий к Гс-гамма RIIIA(V158). В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, афукозилированное или его антигенсвязывающий фрагмент обладает антитело повышенной аффинностью к Fc-гамма RIIIA(F158). Аффинность к Fc-гамма RIIIA или его аллелям можно измерить с помощью анализа, приведенного в примере 10 данного документа.

обычно [00112] «Аффинность связывания» относится к силе обшей суммы нековалентных взаимодействий между одним сайтом связывания молекулы (например, антителом или его антигенсвязывающим фрагментом) и его партнером по связыванию (например, антигеном). Если не указано иное, как используется в данном документе, «аффинность связывания» относится к внутренней аффинности связывания, которая отражает взаимодействие 1:1 между членами пары связывания (например, антителом или его антигенсвязывающим фрагментом и антигеном). Аффинность молекулы X к своему партнеру У обычно может быть представлено константой диссоциации (Кр). Аффинность может быть измерена и/или выражена несколькими способами, известными в данной области, включая, но не ограничиваясь этим, константу равновесной диссоциации (KD) и константу равновесной ассоциации (K<sub>A</sub>). К<sub>D</sub> рассчитывается по коэффициенту k<sub>off</sub>/k<sub>on</sub>, тогда как K<sub>A</sub> рассчитывается по коэффициенту k<sub>on</sub>/k<sub>off</sub>. k<sub>on</sub> относится к константе скорости ассоциации, например, антитела или его антигенсвязывающего фрагмента с антигеном, а k<sub>off</sub> относится к диссоциации, например, антитела или его антигенсвязывающего фрагмента из антигена. kon и koff могут быть определены способами, известными специалисту в данной области, такими как BIAcore® или KinExA.

[00113] Используемый в данном документе термин «эпитоп» является термином в данной области и относится к локализованному участку антигена, с которым антитело или его антигенсвязывающий фрагмент могут специфически связываться. Эпитоп может представлять собой, например, смежные аминокислоты полипептида (линейный или непрерывный эпитоп), или эпитоп, например, может объединяться из двух или более несмежных участков полипептида или полипептидов (конформационный, нелинейный, прерывистый или несмежный эпитоп). В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, эпитоп, с которым связывается антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, может быть определен, например, с помощью ЯМР-спектроскопии, исследований дифракционной кристаллографии, анализов ИФА, обмена водорода/дейтерия масс-спектрометрией (например, хроматография, сочетании жидкостная электрораспылительная масс-спектрометрия), анализов на основе олигопептидного

сканирования на основе матрицы и/или картирования мутагенеза (например, картирование сайт-направленного мутагенеза). Для рентгеновской кристаллографии кристаллизация может быть выполнена с использованием любого из известных в данной области способов (например, Giegé R et al., (1994) Acta Crystallogr D Biol Crystallogr 50 (Pt 4):339-350; McPherson A (1990) Eur J Biochem 189:1-23; Chayen NE (1997) Structure 5:1269-1274; McPherson A (1976) J Biol Chem 251:6300-6303). Антитело/его антигенсвязывающий фрагмент:кристаллы антигена могут быть изучены с использованием хорошо известных способов дифракции рентгеновских лучей и могут быть уточнены с использованием компьютерного программного обеспечения, такого как X-PLOR (Yale University, 1992, distributed by Molecular Simulations, Inc.; see, e.g., Meth Enzymol (1985) volumes 114 & 115, eds Wyckoff HW et al., U.S. 2004/0014194), and BUSTER (Bricogne G (1993) Acta Crystallogr D Biol Crystallogr 49(Pt 1):37-60; Bricogne G (1997) Meth Enzymol 276A:361-423, ed Carter CW; Roversi P et al., (2000) Acta Crystallogr D Biol Crystallogr 56(Pt 10):1316-1323). Исследования картирования мутагенеза могут быть выполнены с использованием любого способа, известного специалисту в данной области. См., например, Champe M et al., (1995) J Biol Chem 270:1388-1394 and Cunningham BC & Wells JA (1989) Science 244:1081-1085 для описания способа мутагенеза, включая способы аланинового сканирующего мутагенеза. Антитело B7-H4, которое «связывается с тем же эпитопом», что и эталонное [00114] антитело В7-Н4, относится к антителу, которое связывается с теми же аминокислотными

антитело В7-Н4, которое «связывается с тем же эпитопом», что и эталонное антитело В7-Н4, относится к антителу, которое связывается с теми же аминокислотными остатками В7-Н4, что и эталонное антитело В7-Н4. Способность антитела В7-Н4 связываться с тем же эпитопом, что и эталонное антитело В7-4, определяется анализом обмена водорода/дейтерия (см. Coales et al. Rapid Commun.Mass Spectrom.2009; 23:639—647).

[00115] Используемые в данном документе термины «иммуноспецифически связывает», «иммуноспецифически распознает», «специфически связывает» и «специфически распознает» являются аналогичными терминами в контексте антител или их антигенсвязывающих фрагментов. Эти термины указывают, что антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с эпитопом через его антигенсвязывающий домен и что связывание влечет за собой некоторую комплементарность между антигенсвязывающим доменом и эпитопом. Соответственно, антитело, которое «специфически связывается» с В7-Н4 человека (SEQ ID NO: 1), может также связываться с В7-Н4 от других видов (например, обезьяны cynomolgous, мыши и/или крысы В7-Н4), и/или В7-Н4 белками, продуцируемыми из других аллелей человека, но степень связывания с несвязанным белком, не относящимся к В7-Н4 (например, другими членами семейства белков В7, такими как PD-L1), составляет менее чем около 10 % связывания антитела к В7-

Н4, как измерено, например, радиоиммуноанализом (РИА).

[00116] В конкретном варианте осуществления данного изобретения, в данном документе представлено антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который связывается с В7-Н4 человека, яванского макака, мыши и крысы.

[00117] Считается, что антитело «конкурентно ингибирует» связывание эталонного антитела с данным эпитопом, если оно предпочтительно связывается с этим эпитопом или перекрывающимся эпитопом в той степени, в которой оно, до некоторой степени, блокирует связывание эталонного антитела с эпитопом. Конкурентное ингибирование может быть определено любым способом, известным в данной области, например, конкурентными анализами ИФА. Можно сказать, что антитело конкурентно ингибирует связывание эталонного антитела с данным эпитопом по меньшей мере на 90 %, по меньшей мере на 80 %, по меньшей мере на 60 % или по меньшей мере на 50 %.

[00118] Полипептид, антитело, полинуклеотид, вектор, клетка или композиция, которая «выделена», представляет собой полипептид, антитело, полинуклеотид, вектор, клетку или композицию, которая находится в форме, не встречающейся в природе. Выделенные полипептиды, антитела, полинуклеотиды, векторы, клетки или композиции включают те, которые были очищены до такой степени, что они больше не находятся в форме, в которой они встречаются в природе. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, антитело, полинуклеотид, вектор, клетка или композиция, которые выделены, являются по существу чистыми. Используемый в данном документе термин «по существу чистый» относится к материалу, который имеет чистоту по меньшей мере 50 % (т.е. не содержит загрязнений), чистоту по меньшей мере 95 %, чистоту по меньшей мере 95 %.

Термины «полипептид», «пептид» и «белок» используются в данном документе [00119] взаимозаменяемо для обозначения полимеров аминокислот любой длины. Полимер может линейным или разветвленным, он может содержать модифицированные аминокислоты, и он может прерываться не аминокислотами. Термины также охватывают аминокислотный полимер, который был модифицирован естественным путем или путем вмешательства; например, образованием дисульфидной связи, гликозилированием, липидированием, ацетилированием, фосфорилированием или любыми манипуляциями или модификациями, такими как конъюгация с метящим компонентом. В определение также включены, например, полипептиды, содержащие один или более аналогов аминокислоты (включая, например, неприродные аминокислоты и т. д.), а также другие модификации, известные в данной области. Понятно, что поскольку полипептиды по данному изобретению основаны на антителах, в некоторых вариантах осуществления данного изобретения, полипептиды могут встречаться в виде отдельных цепей или связанных цепей.

«Процент идентичности» относится к степени идентичности между двумя [00120] последовательностями (например, аминокислотными последовательностями или последовательностями нуклеиновых кислот). Процент идентичности может быть определен путем выравнивания двух последовательностей, введения пробелов для максимизации идентичности между последовательностями. Выравнивания могут быть созданы с использованием программ, известных в данной области техники. Для целей данного описания выравнивание нуклеотидных последовательностей может быть выполнено с помощью программы blastn, установленной с параметрами по умолчанию, а выравнивание аминокислотных последовательностей может быть выполнено с программой blastp, установленной с параметрами по умолчанию (см. Национальный центр биотехнологической информации (NCBI) во всемирной сети Интернет, ncbi.nlm.nih.gov). Используемый в данном документе термин «клетка-хозяин» может представлять

гобой клетку любого типа, например, первичную клетку, клетку в культуре или клетку из клеточной линии. В конкретных вариантах осуществления данного изобретения, термин «клетка-хозяин» относится к клетке, трансфицированной молекулой нуклеиновой кислоты, и потомству или потенциальному потомству такой клетки. Потомство такой клетки может не быть идентичным родительской клетке, трансфицированной молекулой нуклеиновой кислоты, например, из-за мутаций или влияний окружающей среды, которые могут возникнуть в последующих поколениях, или интеграции молекулы нуклеиновой кислоты в геном клетки-хозяина.

[00122] Термин «фармацевтическая композиция» относится к препарату, который находится в такой форме, при которой биологическая активность активного ингредиента эффективна, и который не содержит никаких дополнительных компонентов, которые являются неприемлемо токсичными для субъекта, которому будет вводиться композиция. Состав может быть стерильным.

[00123] Термины «ввести», «вводить», «введение» и тому подобное, используемые в данном документе, относятся к способам, которые можно использовать для обеспечения доставки лекарственного средства, например, анти-В7-Н4 антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, на желаемый сайт биологического действия (например, внутривенное введение). Способы введения, которые можно применять с агентами и способами, описанными в данном документе, можно найти, например, в Goodman and Gilman, The Pharmacological Basis of Therapeutics, текущее издание, Pergamon; и

Remington's, Pharmaceutical Sciences, текущее издание, Mack Publishing Co., Истон, Пенсильвания.

[00124] Введение «в сочетании с» одним или более дополнительными терапевтическими агентами включает одновременное (одновременное) или последовательное введение в любом порядке.

[00125] Комбинированная терапия может обеспечивать «синергизм», то есть эффект, достигаемый, когда активные агенты, используемые вместе, больше, чем сумма эффектов, которые являются результатом использования активных агентов по отдельности. Синергетический эффект может быть достигнут, когда активными агентами являются: (1) совместно составленные и вводимые или доставленные одновременно в комбинированной дозированной лекарственной форме; (2) доставленные последовательно, поочередно или параллельно в виде отдельных составов; или (3) по какой-либо другой схеме. При доставке в альтернативной терапии синергетический эффект может быть достигнут, когда активные агенты вводятся или доставляются последовательно, например, посредством различных инъекций в отдельных шприцах. «Синергетическая комбинация» дает эффект, который больше, чем сумма эффектов отдельных активных агентов комбинации.

[00126] Комбинированная терапия может обеспечить «аддитивный» эффект, то есть эффект, достигаемый, когда активные агенты, используемые вместе, равен сумме эффектов, возникающих в результате использования активных агентов по отдельности.

[00127] Используемые в данном документе термины «субъект» и «пациент» используются взаимозаменяемо. Субъектом может быть животное. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, субъект представляет собой млекопитающее, такое как отличное от человека животное (например, корова, свинья, лошадь, кошка, собака, крыса, мышь, обезьяна или другой примат и т.д.). В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, субъект представляет собой яванского макака. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, субъект представляет собой человек.

[00128] Термин «терапевтически эффективное количество» относится к количеству лекарственного средства, например, анти-В7-Н4 антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, эффективного для лечения заболевания или расстройства у субъекта. В случае рака терапевтически эффективное количество лекарственного средства может уменьшить количество раковых клеток; уменьшить размер или тяжесть опухоли; ингибировать (т.е. замедлять до некоторой степени и в определенном варианте осуществления данного изобретения, останавливать) инфильтрацию раковых клеток в периферические органы; ингибировать (т.е. замедлять до некоторой степени и в определенном варианте осуществления данного изобретения, останавливать) метастазирование опухоли;

ингибировать до некоторой степени рост опухоли; облегчить до некоторой степени один или более симптомов, связанных с раком; и/или приводить к благоприятному ответу, такому как увеличение выживаемости без прогрессирования (PFS), выживаемости без заболевания (DFS) или общей выживаемости (OS), полному ответу (CR), частичному ответу (PR) или, в некоторых случаях, стабилизации заболевание (SD), уменьшения прогрессирования заболевания (PD), уменьшения времени до прогрессирования (TTP) или любой их комбинации. В той степени, в которой лекарственное средство может предотвращать рост и/или убивать существующие раковые клетки, оно может быть цитостатическим и/или цитотоксическим.

[00129] Такие термины, как «лечение» или «лечение» или «лечить» или «облегчение» или «облегчать» относятся к терапевтическим мерам, которые излечивают, замедляют, уменьшают симптомы и/или останавливают прогрессирование диагностированного патологического состояния или расстройства. Таким образом, те, кто нуждается в лечении, включают тех, у кого уже диагностировано или есть подозрение на наличие расстройства. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, субъект успешно "лечится" от рака в соответствии со способами по данному изобретению, если пациент демонстрирует одно или более из следующего: уменьшение количества или полное отсутствие раковых клеток; уменьшение размера опухоли; ингибирование или отсутствие инфильтрации раковых клеток в периферические органы, включая, например, распространение рака в мягкие ткани и кости; ингибирование или отсутствие метастазирования опухоли; торможение или отсутствие роста опухоли; облегчение одного или более симптомов, связанных с конкретным раком; снижение заболеваемости и смертности; улучшение качества жизни; уменьшение онкогенности, онкогенной частоты или онкогенной способности опухоли; уменьшение количества или частоты раковых стволовых клеток в опухоли; дифференцировка онкогенных клеток в неопухолевое состояние; увеличение выживаемости без прогрессирования (PFS), выживаемости без заболевания (DFS) или общей выживаемости (OS), полного ответа (CR), частичного ответа (PR), стабилизации заболевания (SD), уменьшение прогрессирования заболевания (PD), уменьшение времени до прогрессирования (ТТР) или любой их комбинация.

[00130] Термины «рак» и «раковый» относятся или описывают физиологическое состояние у млекопитающих, при котором популяция клеток характеризуется нерегулируемым ростом клеток. Примеры рака включают, но не ограничиваются ими, гинекологические раковые заболевания (например, рак молочной железы (включая тройной негативный рак молочной железы, рак протоков), рак яичников и рак эндометрия), немелкоклеточный рак легких, рак поджелудочной железы, рак щитовидной железы, рак

почки (например, почечно-клеточный рак) и рак мочевого пузыря (например, уротелиоцитарный рак). Немелкоклеточный рак легкого может быть, например, аденокарциномой. Дополнительные примеры рака включают, например, рак головы и шеи, мелкоклеточный легкого, рак желудка, меланому, холангиокарциному, мультиформную глиобластому или глиобластому (GBM) и карциному клеток Меркеля. В одном варианте осуществления данного изобретения, рак яичника представляет собой серозную аденокарциному. В одном варианте осуществления данного изобретения, рак молочной железы представляет собой протоковую аденокарциному. Рак может представлять собой «рак, который экспрессирует B7-H4» или «рак, экспрессирующий B7-H4». Такие термины относятся к раку, включающему клетки, которые экспрессируют В7-Н4. Рак может быть первичной опухолью или может быть распространенным или метастатическим раком.

[00131] «Рефрактерный» рак - это рак, который прогрессирует, несмотря на то, что противораковое лечение, такое как химиотерапия, назначается больному раком.

[00132] «Рецидивирующий» рак - это рак, который возобновился либо в начальном, либо в отдаленном месте после ответа на начальную терапию.

[00133] «Рецидивирующий» пациент - это тот, у кого есть признаки или симптомы рака после ремиссии. Необязательно, у пациента возник рецидив после адъювантной или неоадъювантной терапии.

[00134] «Активность блокады Т-клеточной контрольной точки» означает блокирование или ингибирование активности или ответа Т-клеточной контрольной точки. Активность блокады Т-клеточной контрольной точки можно измерить в анализе искусственных антигенпрезентирующих клеток (иАПК) на основе изменений в продукции ИФНу. Первичные человеческие Т-клетки могут быть обогащены МКПК с использованием набора для обогащения Т-клеток (такого как набор для обогащения Т-клеток EasySep<sup>тм</sup> человека или аналогичный набор). Обогащенные Т-клетки инкубируют с шариками (например, анти-СD3/анти-CD28 гранулами). Через некоторое время шарики магнитно удаляют, а Т-клетки промывают и инкубируют. Затем Т-клетки промывают и инкубируют вместе с искусственными антигенпрезентирующими клетками (иАПК) в присутствии титрования дозы антитела В7-Н4. иАПК могут быть обработаны митомицином С, а затем тщательно промыты перед добавлением к совместной культуре Т-клеток. После совместного культивирования Т-клеток, иАПК и В7-Н4 антител планшеты можно центрифугировать, а супернатанты можно собирать и оценивать на предмет продуцирования ИФН с помощью ИФА. Продукция ИФН может быть нанесена на график в зависимости от концентрации антитела, а эффективность ЕС50 может быть рассчитана с использованием подгонки

кривой нелинейной регрессии. Результаты могут быть измерены как EC50 +/- STD в нМ. Активность блокады Т-клеточной контрольной точки антителами В7-Н4 может быть продемонстрирована увеличением продукции ИФН. «Активность блокады Т-клеточной контрольной точки» также можно измерить в анализе с использованием клеток, которые эндогенно экспрессируют В7-Н4. Первичные Т-клетки человека могут быть обогащены донорскими МКПК HLA-A2+ с использованием набора для выделения Т-клеток (например, набора для выделения Т-клеток человека Pan). Экспрессирующие MART-I TCR Т-клетки могут быть получены путем первой активации обогащенных Pan Т-клеток шариками (например, анти-CD3/анти-CD28 парамагнитные частицы Dynabeads), ИЛ-2 и ИЛ-7 в течение 48 часов. Затем активированные Т-клетки могут быть трансдуцированы MART-I TCR лентивирусными частицами в присутствии ИЛ-2, ИЛ-7 и полибрена. После трансдукции MART-I TCR+ Pan Т-клетки могут размножаться в течение определенного периода времени в присутствии ИЛ-2 и ИЛ-7. Для создания линий клеток-мишеней, экспрессирующих HLA-A2, эндогенные линии раковых клеток, экспрессирующих B7-H4, могут быть трансдуцированы лентивирусными частицами HLA-A2 в течение периода времени (например, 48 часов). Кроме того, В7-Н4 может быть нокаутирован из линии клеток HLA-A2+. Затем MART-I TCR+ Pan Т-клетки можно совместно культивировать в присутствии различных клеточных линий-мишеней в соотношении 1:1 Е:Т, пептида MART-I и антитела B7-H4 или изотипического контроля человека. После совместной инкубации планшеты могут быть центрифугированы, а супернатанты могут быть собраны и оценены на продуцирование ИЛ-2. Продукцию ИЛ-2 можно измерить с помощью стандартного набора для иммуноанализа (такого как анализ AlphaLISA или аналогичный анализ).

[00135] Как используется в данном описании и формуле изобретения, единственные формы включают множественные ссылки, если контекст явно не диктует иное.

[00136] Понятно, что везде, где варианты осуществления данного изобретения описаны в данном документе на языке «содержащий», в противном случае также предоставляются аналогичные варианты осуществления данного изобретения, описанные в терминах «состоящий из» и/или «состоящий по существу из». В этом описании «содержит», «содержащий», «состоящий» и «имеющий» и т.п. может иметь значение, приписываемое им в США. Патентное право и может означать «включает», «включая» и тому подобное; «состоящий по существу из» или «состоит по существу» также имеет значение, приписанное в США. Патентное право и термин имеют неограниченный срок действия, допускающий присутствие большего, чем то, что указано, при условии, что основные или новые характеристики того, что указано, не изменяется при наличии более чем то, что

указано, но исключает предшествующие в технике способы осуществления изобретения.

[00137] Если специально не указано или не очевидно из контекста, используемый в данном документе термин «или» понимается как включающий. Термин «и/или», как он используется в фразе, такой как «А и/или В», в данном документе предназначен для обозначения «А и В», «А или В», «А» и «В». Аналогично, термин «и/или», используемый в фразе, такой как «А, В и/или С», предназначен для охвата каждого из следующих вариантов осуществления данного изобретения: А, В и С; А, В или С; А или С; А или В; В или С; А и С; А и В; В и С; А (только); и С (только).

[00138] Используемые в данном документе термины «около» и «приблизительно», когда используются для изменения числового значения или числового диапазона, указывают, что отклонения от 5 % до 10 % выше и от 5 % до 10 % ниже значения или диапазона остаются в пределах предполагаемого значение приведенного значения или диапазона.

[00139] Любые композиции или способы, представленные в данном документе, могут быть объединены с одной или более любыми другими композициями и способами, представленными в данном документе.

#### 1.2 Антитела

[00140] В конкретном аспекте в данном документе представлены антитела (например, моноклональные антитела, такие как химерные, гуманизированные или человеческие антитела) и их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связываются с В7-Н4 (например, В7-Н4 человека). Аминокислотные последовательности для В7-Н4 человека, яванского макака, мыши и крысы известны в данной области и также представлены в данном документе, как представлено SEQ ID NO: 1-4, соответственно.

# В7-Н4 человека:

MASLGQILFWSIISIIIILAGAIALIIGFGISGRHSITVTTVASAGNIGEDGILSCTFEPDIKLSD IVIQWLKEGVLGLVHEFKEGKDELSEQDEMFRGRTAVFADQVIVGNASLRLKNVQLTD AGTYKCYIITSKGKGNANLEYKTGAFSMPEVNVDYNASSETLRCEAPRWFPQPTVVWA SQVDQGANFSEVSNTSFELNSENVTMKVVSVLYNVTINNTYSCMIENDIAKATGDIKVT ESEIKRRSHLQLLNSKASLCVSSFFAISWALLPLSPYLMLK (SEQ ID NO:1)

#### В7-Н4 яванского макака:

MASLGQILFWSIISIIFILAGAIALIIGFGISGRHSITVTTVASAGNIGEDGILSCTFEPDIKLS DIVIQWLKEGVIGLVHEFKEGKDELSEQDEMFRGRTAVFADQVIVGNASLRLKNVQLTD AGTYKCYIITSKGKGNANLEYKTGAFSMPEVNVDYNASSETLRCEAPRWFPQPTVVWA SQVDQGANFSEVSNTSFELNSENVTMKVVSVLYNVTINNTYSCMIENDIAKATGDIKVT ESEIKRRSHLQLLNSKASLCVSSFLAISWALLPLAPYLMLK (SEQ ID NO:2) В7-Н4 мыши:

MASLGQIIFWSIINIIIILAGAIALIIGFGISGKHFITVTTFTSAGNIGEDGTLSCTFEPDIKLNG IVIQWLKEGIKGLVHEFKEGKDDLSQQHEMFRGRTAVFADQVVVGNASLRLKNVQLTD AGTYTCYIRTSKGKGNANLEYKTGAFSMPEINVDYNASSESLRCEAPRWFPQPTVAWAS QVDQGANFSEVSNTSFELNSENVTMKVVSVLYNVTINNTYSCMIENDIAKATGDIKVTD SEVKRRSQLQLLNSGPSPCVFSSAFVAGWALLSLSCCLMLR (SEQ ID NO:3) B7-H4 крысы:

MASLGQIIFWSIINVIIILAGAIVLIIGFGISGKHFITVTTFTSAGNIGEDGTLSCTFEPDIKLN GIVIQWLKEGIKGLVHEFKEGKDDLSQQHEMFRGRTAVFADQVVVGNASLRLKNVQLT DAGTYTCYIHTSKGKGNANLEYKTGAFSMPEINVDYNASSESLRCEAPRWFPQPTVAW ASQVDQGANFSEVSNTSFELNSENVTMKVVSVLYNVTINNTYSCMIENDIAKATGDIKV TDSEVKRRSQLELLNSGPSPCVSSVSAAGWALLSLSCCLMLR (SEQ ID NO:4)

[00141] В определенных вариантах осуществления данного изобретения, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанный в данном документе, связывается с В7-Н4 человека. В некоторых вариантах осуществления данного изобретении, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с В7-Н4 человека и яванского макака. В некоторых вариантах осуществления данного изобретении, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с В7-Н4 человека, мыши и крысы. В некоторых вариантах осуществления данного изобретении, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с В7-Н4 человека, яванского макака, мыши и крысы.

[00142] В7-Н4 содержит эктодомен IgC (аминокислоты 153-241 SEQ ID NO: 1) и домен IgV (аминокислоты 35-146 SEQ ID NO: 1).

[00143] В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанный в данном документе, связывается с доменом IgV В7-Н4 человека. Соответственно, в данном документе представлены антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые связываются с полипептидом, состоящим из аминокислот 35-146 SEQ ID NO: 1.

[00144] В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанный в данном документе, связывается с В7-Н4 человека и содержит шесть CDR антитела, перечисленных в Таблицах 1 и 2 (то есть три CDR VH антитела, перечисленных в Таблице 1, и три CDR VL одного и того же антитела перечислены в Таблице 2).

Таблица 1. Аминокислотные последовательности CDR VH 1

Антит	CDR1 VH	CDR2 VH	CDR3 VH
ело	(SEQ ID NO:)	(SEQ ID NO:)	(SEQ ID NO:)
15461	GSISSSSYYWG	NIYYSGSTYYNPSLKS	AREGSYPNWFDP
	(SEQ ID NO:5)	(SEQ ID NO:6)	(SEQ ID NO:7)
20500	GSIKSGSHYWG	NIYYSGSTYYNPSLRS	AREGSYPNWFDP
	(SEQ ID NO:15)	(SEQ ID NO:16)	(SEQ ID NO:17)
20501	GSIKSGSHYWG	NIYYSGSTYYNPSLKS	AREGSYPNWLDP
	(SEQ ID NO:25) GSIKSGSYYWG	(SEQ ID NO:26) NIYYSGSTYYNPSLRS	(SEQ ID NO:27) AREGSYPNQFDP
20502	(SEQ ID NO:458)	(SEQ ID NO: 459)	(SEQ ID NO: 460)
20502	GSIKSGSYYWG	NIYYSGSTYYNPSLKS	AREGSYPNQFDP
,1	(SEQ ID NO: 35)	(SEQ ID NO: 36)	(SEQ ID NO: 37)
22208	GSIKSGSHYWG	NIYYSGSTYYNPSLKS	AREGSYPNWFDP
	(SEQ ID NO: 45)	(SEQ ID NO: 46)	(SEQ ID NO: 47)
15462	GSISSSSYYWG	NIYYSGSTYYNPSLKS	AREGSYTTVLNV
	(SEQ ID NO: 55) GSIGRGSYYWG	(SEQ ID NO: 56) NIYYSGSTYYNPSLKS	(SEQ ID NO: 57) AREGSYTTVLNV
22213	(SEQ ID NO: 65)	(SEQ ID NO: 66)	(SEQ ID NO: 67)
	GSISSGGYYWS	NIYYSGSTYYNPSLKS	ARESSTISADFDL
15465	(SEQ ID NO: 75)	(SEQ ID NO: 76)	(SEQ ID NO: 77)
20506	GSISHGGYYWS	NIYYSGSTYYNPSLKS	ARESSTISADFDL
20506	(SEQ ID NO: 85)	(SEQ ID NO: 86)	(SEQ ID NO: 87)
15483	GSISSGGYYWS	NIYYSGSTYYNPSLKS	ARGLSTIDEAFDP
	(SEQ ID NO: 95)	(SEQ ID NO: 96)	(SEQ ID NO: 97)
20513	GSISDGSYYWS	NIYYSGSTYYNPSLRS	ARGLSTIDEAFDP
	(SEQ ID NO: 105)	(SEQ ID NO: 106)	(SEQ ID NO: 107)
22216	GSISDGSYYWS	NIYYSGSTYYNPSLRS	ARGLSTIDEAFDP
	(SEQ ID NO: 115) GSISSYYWS (SEQ	(SEQ ID NO: 116) YIYSSGSTNYNPSLKS	(SEQ ID NO: 117) ARGSGQYAAPDYG
15489	ID NO: 125)	(SEQ ID NO: 126)	MDV (SEQ ID NO:
20516	GSIISYYWG (SEQ	YIYSSGSTSYNPSLKS	ARGSGLYAAPDYG
	ID NO: 135)	(SEQ ID NO: 136)	LDV (SEQ ID NO:
15472	FTFSSYAMS (SEQ	TISGSGGSTYYADSVKG	ARGAGHYDLVGR
	ID NO: 145)	(SEQ ID NO: 146)	Y (SEQ ID NO: 147)
15503	FTFSSYAMS (SEQ	AISGSGGSTYYADSVKG	ARVGFRALNY
	ID NO: 155)	(SEQ ID NO: 156)	(SEQ ID NO: 157)
15495	GTFSSYAIS (SEQ ID	GIIPIFGTASYAQKFQG	ARQQYDGRRYFGL
	NO: 165)	(SEQ ID NO: 166)	(SEQ ID NO: 167)
15478	GTFSSYAIS (SEQ ID	GIPIFGTANYAQKFQG	ARGGPWFDP (SEQ
	NO: 175)	(SEQ ID NO: 176)	ID NO: 177)
15441	FTFSSYAMS (SEQ ID NO: 185)	AISGSGGSTSYADSVKG (SEQ ID NO: 186)	AKPSLATMLAFDI (SEQ ID NO: 187)
	, , ,	,	
20496	GSISSSVYYWS (SEQ ID NO: 195)	SILVSGSTYYNPSLKS (SEQ ID NO: 196)	ARAVSFLDV (SEQ ID NO: 197)
DD VIII	(SEQ ID NO: 195) : Таблице 1 определяютс		ID NO. 19/)

<sup>1</sup>CDR VH в Таблице 1 определяются по Кабат.

Таблица 2. Аминокислотные последовательности CDR VL<sup>2</sup>

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

20496	RASQSISSYLN	GASSLQS	(SEQ	ID	QQSYDPPWT (SEQ
20490	(SEQ ID NO:198)	NO:199)			ID NO:200)

[00145] <sup>2</sup> CDR VL в Таблице 2 определяются по Кабат.

[00146] В определенных вариантах осуществления данного изобретения, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанный в данном документе, связывается с В7-Н4 человека и содержит VH антитела, указанного в Таблице 3.

Таблица 3: Аминокислотные последовательности с вариабельной тяжелой цепью (VH)

Антитело	Аминокислотная последовательность VH (SEQ ID NO)
	QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSSSYYWGWIRQPPGK
15461	GLEWIGNIYYSGSTYYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAA
	DTAVYYCAREGSYPNWFDPWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:11)
	QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSIKSGSHYWGWIRQPPG
20500	KGLEWIGNIYYSGSTYYNPSLRSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTA
	ADTAVYYCAREGSYPNWFDPWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:21)
	QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSIKSGSHYWGWIRQPPG
20501	KGLEWIGNIYYSGSTYYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTA
	ADTAVYYCAREGSYPNWLDPWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:31)
	QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSIKSGSYYWGWIRQPPG
20502	KGLEWIGNIYYSGSTYYNPSLRSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTA
	ADTAVYYCAREGSYPNQFDPWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:464)
	QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSIKSGSYYWGWIRQPPG
20502,1	KGLEWIGNIYYSGSTYYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTA
	ADTAVYYCAREGSYPNQFDPWGQGILVTVSS (SEQ ID NO:41)
	QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSIKSGSHYWGWIRQPPG
22208	KGLEWIGNIYYSGSTYYNPSLKSRVTMSVDTSKNQFSLKLSSVT
	AADTAVYYCAREGSYPNWFDPWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:51)
	QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSSSYYWGWIRQPPGK
15462	GLEWIGNIYYSGSTYYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAA
	DTAVYYCAREGSYTTVLNVWGQGTMVTVSS (SEQ ID NO:61)
	QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSIGRGSYYWGWIRQPPG
22213	KGLEWIGNIYYSGSTYYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTA
	ADTAVYYCAREGSYTTVLNVWGQGTMVTVSS (SEQ ID NO:71)

	QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGGSISSGGYYWSWIRQHPG
15465	KGLEWIGNIYYSGSTYYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTA
	ADTAVYYCARESSTISADFDLWGRGTLVTVSS (SEQ ID NO:81)
	QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTASGGSISHGGYYWSWIRQHPG
20506	KGLEWIGNIYYSGSTYYNPSLKSRVTMSVDTSKNQFSLKLSSVT
	AADTAVYYCARESSTISADFDLWGRGTLVTVSS (SEQ ID NO:91)
	QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGGSISSGGYYWSWIRQHPG
15483	KGLEWIGNIYYSGSTYYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTA
	ADTAVYYCARGLSTIDEAFDPWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:101)
	QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISDGSYYWSWIRQHPG
20513	KGLEWIGNIYYSGSTYYNPSLRSRVTMSVDTSKNQFSLKLSSVT
20313	AADTAVYYCARGLSTIDEAFDPWGQGTLVTVSS (SEQ ID
	NO:111)
	QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGGSISDGSYYWSWIRQHPG
22216	KGLEWIGNIYYSGSTYYNPSLRSRVTMSVDTSKNQFSLKLSSVT
22210	AADTAVYYCARGLSTIDEAFDPWGQGTLVTVSS (SEQ ID
	NO:121)
	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSYYWSWIRQPPGKG
15489	LEWIGYIYSSGSTNYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAAD
13489	TAVYYCARGSGQYAAPDYGMDVWGQGTTVTVSS (SEQ ID
	NO:131)
	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSIISYYWGWIRQPPGKG
20516	LEWIGYIYSSGSTSYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAAD
20516	TAVYYCARGSGLYAAPDYGLDVWGQGTTVTVSS (SEQ ID
	NO:141)
	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGK
15470	GLEWVSTISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLR
15472	AEDTAVYYCARGAGHYDLVGRYWGQGTLVTVSS (SEQ ID
	NO:151)
	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGK
15503	GLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSL
	RAEDTAVYYCARVGFRALNYWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO:161)
15405	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAISWVRQAPGQ
15495	GLEWMGGIIPIFGTASYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRS

	EDTAVYYCARQQYDGRRYFGLWGRGTLVTVSS (SEQ ID
	NO:171)
	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAISWVRQAPGQ
15478	GLEWMGGIIPIFGTANYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLR
	SEDTAVYYCARGGPWFDPWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:181)
	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGK
15441	GLEWVSAISGSGGSTSYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLR
13441	AEDTAVYYCAKPSLATMLAFDIWGQGTMVTVSS (SEQ ID
	NO:191)
	QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSSVYYWSWIRQPPGK
20496	GLEWIGSILVSGSTYYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAA
	DTAVYYCARAVSFLDVWGQGTMVIVSS (SEQ ID NO:201)

[00147] В определенных вариантах осуществления данного изобретения, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанный в данном документе, связывается с В7-Н4 человека и содержит VL антитела, указанного в Таблице 4.

Таблица 4: Аминокислотные последовательности вариабельной легкой цепи (VL)

Антитело	Аминокислотная последовательность VL (SEQ ID NO)
	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSNLAWYQQKPGQAP
15461	RLLIYGASTRATGIPARFSGSGSGTEFTLTISSLQSEDFAVYYCQQ
	YHSFPFTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:12)
	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSNLAWYQQKPGQAP
20500	RLLIYGASTRATGIPARFSGSGSGTEFTLTISSLQSEDFAVYYCQQ
	YHSFPFTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:22)
	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSNLAWYQQKPGQAP
20501	RLLIYGASTRATGIPARFSGSGSGTEFTLTISSLQSEDFAVYYCQQ
	YHSFPFTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:32)
	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSNLAWYQQKPGQAP
20502 и 20502,1	RLLIYGASTRATGIPARFSGSGSGTEFTLTISSLQSEDFAVYYCQQ
	YHSFPFTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:42)
	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSTNLAWYQQKPGQAP
22208	RLLIYDASARVTGIPARFSGSGSGTEFTLTISSLQSEDFAVYYCQ
	QYHSFPFTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:52)

	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQA
15462	PRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQ
	QAASYPLTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:62)
	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVASSHLAWYQQKPGQA
22213	PRLLIYDAVSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYC
	QQAASYPLTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:72)
	DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISRWLAWYQQKPGKA
15465	PKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQ
	QAHTFPYTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:82)
	DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISRWLAWYQQKPGKA
20506	PKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQ
	QAHTFPYTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:92)
	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQSISSWLAWYQQKPGKAP
15483	KLLIYKASSLESGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFATYYCQQ
	DNSYPYTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:102)
	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQSISSWLAWYQQKPGKAP
20513	KLLIYKASSLESGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFATYYCQQ
	DNSYPYTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:112)
	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASKSISSWLAWYQQKPGKAP
22216	KLLIYEASSLHSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFATYYCQQ
	DNSYPYTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:122)
	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQSISSWLAWYQQKPGKAP
15489	KLLIYKASSLESGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFATYYCQQ
	DNSFPFTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:132)
	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQSISSWLAWYQQKPGKAP
20516	KLLIYKASSLESGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFATYYCQQ
	DNSFPFTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:142)
	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAP
15472	KLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQ
	QLYSLPPTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:152)
	DIQLTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQDISSWLAWYQQKPGKAP
15503	KLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQ
	QATSYPPWTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:162)
15495	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSNLAWYQQKPGQAP

	RLLIYSASTRATGIPARFSGSGSGTEFTLTISSLQSEDFAVYYCQQ
	VNVWPPTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:172)
	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQSISSWLAWYQQKPGKAP
15478	KLLIYKASSLESGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFATYYCQQ
	YNSYPPFTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:182)
	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQSISSWLAWYQQKPGKAP
15441	KLLIYDASSLESGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFATYYCQQ
	SKSYPRTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:192)
	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAP
20496	KLLIYGASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQ
	QSYDPPWTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:202)

[00148] В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанный в данном документе, связывается с В7-Н4 человека и содержит VH и VL антитела, перечисленного в Таблицах 3 и 4 (то есть VH антитела, указанного в Таблице 3, и VL того же антитела, перечисленные в Таблице 4).

[00149] В определенных вариантах осуществления данного изобретения, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанный в данном документе, связывается с В7-Н4 человека и содержит каркасные участки VH антитела, указанного в Таблице 5.

Таблица 5. Аминокислотные последовательности FR VH 4

Антит	FR1 VH	FR2 VH	FR3 VH	FR4 VH
ело	(SEQ ID NO:)	(SEQ ID NO:)	(SEQ ID NO:)	(SEQ ID NO :)
	QLQLQESGPGLVK	WIRQPPGKGLE	RVTISVDTSKN	WGQGTLVT
15461	PSETLSLTCTVSG	WIG (SEQ ID	QFSLKLSSVTA	VSS (SEQ ID
13401	(SEQ ID NO:205)	NO: 206)	ADTAVYYC	NO:208)
			(SEQ ID NO:207)	
	QLQLQESGPGLVK	WIRQPPGKGLE	RVTISVDTSKN	WGQGTLVT
	PSETLSLTCTVSG	WIG (SEQ ID	QFSLKLSSVTA	VSS (SEQ ID
20500	(SEQ ID NO: 215)	NO: 216)	ADTAVYYC	NO: 218)
			(SEQ ID NO:	
			217)	
20501	QLQLQESGPGLVK	WIRQPPGKGLE	RVTISVDTSKN	WGQGTLVT
20301	PSETLSLTCTVSG	WIG (SEQ ID	QFSLKLSSVTA	VSS (SEQ ID

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

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

	EVQLLESGGGLVQ	WVRQAPGKGL	RFTISRDNSKN	WGQGTTVT
	PGGSLRLSCAASG	EWVS (SEQ ID	TLYLQMNSLR	VSS (SEQ ID
15503	(SEQ ID NO: 355)	NO: 356)	AEDTAVYYC	NO: 358)
			(SEQ ID NO:	
			357)	
	QVQLVQSGAEVK	WVRQAPGQGL	RVTITADESTS	WGRGTLVT
	KPGSSVKVSCKAS	EWMG (SEQ ID	TAYMELSSLRS	VSS (SEQ ID
15495	G (SEQ ID NO: 365)	NO: 366)	EDTAVYYC	NO: 368)
			(SEQ ID NO:	
			367)	
	QVQLVQSGAEVK	WVRQAPGQGL	RVTITADESTS	WGQGTLVT
	KPGSSVKVSCKAS	EWMG (SEQ ID	TAYMELSSLRS	VSS (SEQ ID
15478	G (SEQ ID NO: 375)	NO: 376)	EDTAVYYC	NO: 378)
			(SEQ ID NO:	
			377)	
	EVQLLESGGGLVQ	WVRQAPGKGL	RFTISRDNSKN	WGQGTMVT
	PGGSLRLSCAASG	EWVS (SEQ ID	TLYLQMNSLR	VSS (SEQ ID
15441	(SEQ ID NO: 385)	NO: 386)	AEDTAVYYC	NO: 388)
			(SEQ ID NO:	
			387)	
	QLQLQESGPGLVK	WIRQPPGKGLE	RVTISVDTSKN	WGQGTMVI
	PSETLSLTCTVSG	WIG (SEQ ID	QFSLKLSSVTA	VSS (SEQ ID
20496	(SEQ ID NO: 395)	NO: 396)	ADTAVYYC	NO: 398)
			(SEQ ID NO:	
			397)	
	l .		l .	

<sup>&</sup>lt;sup>4</sup> Каркасные участки VH, описанные в Таблице 5, определяются на основе границ системы нумерации по Кабат для CDR. Другими словами, CDR VH определяются с помощью Кабат, а каркасные участки представляют собой аминокислотные остатки, окружающие CDR в вариабельном участке в формате FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 и FR4.

[00150] В определенных вариантах осуществления данного изобретения, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанный в данном документе, связывается с В7-Н4 человека и содержит каркасные участки VL антитела, указанного в Таблице 6.

Таблица 6. Аминокислотные последовательности FR VL  $^3$ 

				FR4 VL
Антитело	FR1 VL	FR2 VL	FR3 VL	(SEQ ID
	(SEQ ID NO :)	(SEQ ID NO :)	(SEQ ID NO:)	NO :)
	EIVMTQSPATLSVS	WYQQKPGQAP	GIPARFSGSGS	FGGGTKVEI
	PGERATLSC (SEQ	RLLIY (SEQ ID	GTEFTLTISSLQ	K (SEQ ID
15461	ID NO: 209)	NO: 210)	SEDFAVYYC	NO: 212)
			(SEQ ID NO:	
			211)	
	EIVMTQSPATLSVS	WYQQKPGQAP	GIPARFSGSGS	FGGGTKVEI
	PGERATLSC (SEQ	RLLIY (SEQ ID	GTEFTLTISSLQ	K (SEQ ID
20500	ID NO: 219)	NO: 220)	SEDFAVYYC	NO: 222)
			(SEQ ID NO:	
			221)	
	EIVMTQSPATLSVS	WYQQKPGQAP	GIPARFSGSGS	FGGGTKVEI
	PGERATLSC (SEQ	RLLIY (SEQ ID	GTEFTLTISSLQ	K (SEQ ID
20501	ID NO: 229)	NO: 230)	SEDFAVYYC	NO: 232)
			(SEQ ID NO:	
			231)	
	EIVMTQSPATLSVS	WYQQKPGQAP	GIPARFSGSGS	FGGGTKVEI
20502 и	PGERATLSC (SEQ	RLLIY (SEQ ID	GTEFTLTISSLQ	K (SEQ ID
20502,1	ID NO: 239)	NO: 240)	SEDFAVYYC	NO: 242)
20302,1			(SEQ ID NO:	
			241)	
	EIVMTQSPATLSVS	WYQQKPGQAP	GIPARFSGSGS	FGGGTKVEI
	PGERATLSC (SEQ	RLLIY (SEQ ID	GTEFTLTISSLQ	K (SEQ ID
22208	ID NO:249)	NO: 250)	SEDFAVYYC	NO: 252)
			(SEQ ID NO:	
			251)	
	EIVLTQSPGTLSLS	WYQQKPGQAP	GIPDRFSGSGS	FGGGTKVEI
	PGERATLSC (SEQ	RLLIY (SEQ ID	GTDFTLTISRLE	K (SEQ ID
15462	ID NO: 259)	NO: 260)	PEDFAVYYC	NO: 262)
			(SEQ ID NO:	
			261)	

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

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

<sup>3</sup> Каркасные участки VL, описанные в Таблице 6, определяются на основе границ системы нумерации по Кабат для CDR. Другими словами, CDR VL определяются с помощью Кабат, а каркасные участки представляют собой аминокислотные остатки, окружающие CDR в вариабельном участке в формате FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 и FR4.

[00151] В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанный в данном документе, связывается с В7-Н4 человека и содержит четыре каркасных участка VH и четыре каркасных участка VL антитела, перечисленных в Таблицах 5 и 6 (то есть четыре каркасных участка VH антитела, указанного в Таблице 5, и четырех каркасных участка VL того же антитела, указанного в Таблице 6.)

[00152] В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанный в данном документе, связывается с В7-Н4 человека и содержит последовательность тяжелой цепи антитела, указанного в Таблице 7.

Таблица 7: Полноразмерные аминокислотные последовательности тяжелой цепи

Антитело	Полноразмерная аминокислотная последовательность
	тяжелой цепи (SEQ ID NO)
	QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSSSYYWGWIRQPP
	GKGLEWIGNIYYSGSTYYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSS
	VTAADTAVYYCAREGSYPNWFDPWGQGTLVTVSSASTKGPS
	VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG
	VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT
15461	KVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLM
	ISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE
	EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK
	TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDI
	AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ
	QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:13)
	QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSIKSGSHYWGWIRQPP
	GKGLEWIGNIYYSGSTYYNPSLRSRVTISVDTSKNQFSLKLSS
20500	VTAADTAVYYCAREGSYPNWFDPWGQGTLVTVSSASTKGPS
20300	VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG
	VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT
	KVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLM

	IODTDES/TOSMANDS/OLIEDDES/MENTAMONO OLIESTA LA MEMBRE
	ISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE
	EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK
	TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDI
	AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ
	QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:23)
	QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSIKSGSHYWGWIRQPP
	GKGLEWIGNIYYSGSTYYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSS
	VTAADTAVYYCAREGSYPNWLDPWGQGTLVTVSSASTKGPS
	VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG
	VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT
20501	KVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLM
	ISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE
	EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK
	TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDI
	AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ
	QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:33)
	QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSIKSGSYYWGWIRQPP
	GKGLEWIGNIYYSGSTYYNPSLRSRVTISVDTSKNQFSLKLSS
	VTAADTAVYYCAREGSYPNQFDPWGQGTLVTVSSASTKGPS
	VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG
	VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT
20502	KVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLM
	ISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE
	EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK
	TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDI
	AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ
	QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:469)
	QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSIKSGSYYWGWIRQPP
	GKGLEWIGNIYYSGSTYYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSS
	VTAADTAVYYCAREGSYPNQFDPWGQGILVTVSSASTKGPSV
20502.1	FPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV
20502,1	HTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK
	VDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI
	SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE
	QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI

	SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV
	EWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG
	NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:43)
	QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSIKSGSHYWGWIRQPP
	GKGLEWIGNIYYSGSTYYNPSLKSRVTMSVDTSKNQFSLKLSS
	VTAADTAVYYCAREGSYPNWFDPWGQGTLVTVSSASTKGPS
	VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG
	VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT
22208	KVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLM
	ISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE
	EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK
	TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDI
	AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ
	QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:53)
	QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSSSYYWGWIRQPP
	GKGLEWIGNIYYSGSTYYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSS
	VTAADTAVYYCAREGSYTTVLNVWGQGTMVTVSSASTKGPS
	VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG
	VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT
15462	KVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLM
	ISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE
	EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK
	TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDI
	AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ
	QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:63)
	QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSIGRGSYYWGWIRQPP
	GKGLEWIGNIYYSGSTYYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSS
	VTAADTAVYYCAREGSYTTVLNVWGQGTMVTVSSASTKGPS
	VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG
22213	VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT
	KVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLM
	ISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE
	EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK
	TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDI
	AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ

	QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:73)
	QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGGSISSGGYYWSWIRQHP
	GKGLEWIGNIYYSGSTYYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSS
	VTAADTAVYYCARESSTISADFDLWGRGTLVTVSSASTKGPS
	VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG
	VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT
15465	KVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLM
	ISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE
	EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK
	TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDI
	AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ
	QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:83)
	QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTASGGSISHGGYYWSWIRQHP
	GKGLEWIGNIYYSGSTYYNPSLKSRVTMSVDTSKNQFSLKLSS
	VTAADTAVYYCARESSTISADFDLWGRGTLVTVSSASTKGPS
	VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG
	VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT
20506	KVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLM
	ISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE
	EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK
	TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDI
	AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ
	QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:93)
	QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGGSISSGGYYWSWIRQHP
	GKGLEWIGNIYYSGSTYYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSS
	VTAADTAVYYCARGLSTIDEAFDPWGQGTLVTVSSASTKGPS
	VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG
	VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT
15483	KVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLM
	ISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE
	EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK
	TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDI
	AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ
	QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:103)
20513	QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISDGSYYWSWIRQHP

	GKGLEWIGNIYYSGSTYYNPSLRSRVTMSVDTSKNQFSLKLSS
	VTAADTAVYYCARGLSTIDEAFDPWGQGTLVTVSSASTKGPS
	VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG
	VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT
	KVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLM
	ISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE
	EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK
	TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDI
	AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ
	QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:113)
	QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGGSISDGSYYWSWIRQHP
	GKGLEWIGNIYYSGSTYYNPSLRSRVTMSVDTSKNQFSLKLSS
	VTAADTAVYYCARGLSTIDEAFDPWGQGTLVTVSSASTKGPS
	VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG
	VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT
22216	KVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLM
	ISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE
	EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK
	TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDI
	AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ
	QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:123)
	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSYYWSWIRQPPGK
	GLEWIGYIYSSGSTNYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTA
	ADTAVYYCARGSGQYAAPDYGMDVWGQGTTVTVSSASTKG
	PSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS
	GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN
15489	TKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL
	MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR
	EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE
	KTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSD
	IAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ
	QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:133)
	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSIISYYWGWIRQPPGK
20516	GLEWIGYIYSSGSTSYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTA
	ADTAVYYCARGSGLYAAPDYGLDVWGQGTTVTVSSASTKG

	POLITICAL ADDRESS OF A LA CONTRACTOR OF A LA CONTRA
	PSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS
	GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN
	TKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL
	MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR
	EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE
	KTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSD
	IAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ
	QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:143)
	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPG
	KGLEWVSTISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMN
	SLRAEDTAVYYCARGAGHYDLVGRYWGQGTLVTVSSASTK
	GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT
	SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS
15472	NTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDT
	LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP
	REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI
	EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPS
	DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW
	QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:153)
	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPG
	KGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMN
	SLRAEDTAVYYCARVGFRALNYWGQGTTVTVSSASTKGPSV
	FPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV
	HTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK
15503	VDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI
	SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE
	QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI
	SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV
	EWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG
	NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:163)
	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAISWVRQAPG
	QGLEWMGGIIPIFGTASYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSS
15495	LRSEDTAVYYCARQQYDGRRYFGLWGRGTLVTVSSASTKGP
	SVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG
	VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT

	KVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLM
	ISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE
	EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK
	TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDI
	AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ
	QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:173)
	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAISWVRQAPG
	QGLEWMGGIIPIFGTANYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSS
	LRSEDTAVYYCARGGPWFDPWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPL
	-
	APSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF
15 470	PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK
15478	KVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTP
	EVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN
	STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA
	KGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW
	ESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF
	SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK(SEQ ID NO:183)
	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPG
	KGLEWVSAISGSGGSTSYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMN
	SLRAEDTAVYYCAKPSLATMLAFDIWGQGTMVTVSSASTKG
	PSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS
	GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN
15441	TKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL
	MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR
	EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE
	KTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSD
	IAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ
	QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:193)
	QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSSVYYWSWIRQPP
	GKGLEWIGSILVSGSTYYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSV
	TAADTAVYYCARAVSFLDVWGQGTMVIVSSASTKGPSVFPL
20496	APSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF
	PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK
	KVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTP
	EVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN
L	I

STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA
KGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW
ESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF
SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:203)

[00153] В определенных вариантах осуществления данного изобретения, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанный в данном документе, связывается с В7-Н4 человека и содержит последовательность легкой цепи антитела, приведенную в Таблице 8.

Таблица 8: Полноразмерный аминокислотные последовательности легкой цепи

Антитело	Полноразмерная аминокислотная последовательность
	легкой цепи (SEQ ID NO)
	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSNLAWYQQKPGQA
	PRLLIYGASTRATGIPARFSGSGSGTEFTLTISSLQSEDFAVYYC
15461	QQYHSFPFTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV
15461	VCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYS
	LSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
	(SEQ ID NO:14)
	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSNLAWYQQKPGQA
	PRLLIYGASTRATGIPARFSGSGSGTEFTLTISSLQSEDFAVYYC
20500	QQYHSFPFTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV
20300	VCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYS
	LSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
	(SEQ ID NO:24)
	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSNLAWYQQKPGQA
	PRLLIYGASTRATGIPARFSGSGSGTEFTLTISSLQSEDFAVYYC
20501	QQYHSFPFTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV
20301	VCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYS
	LSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
	(SEQ ID NO:34)
	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSNLAWYQQKPGQA
	PRLLIYGASTRATGIPARFSGSGSGTEFTLTISSLQSEDFAVYYC
20502 20502 1	QQYHSFPFTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV
20502 и 20502,1	VCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYS
	LSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
	(SEQ ID NO:44)
L	

	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSTNLAWYQQKPGQA
	PRLLIYDASARVTGIPARFSGSGSGTEFTLTISSLQSEDFAVYYC
22208	QQYHSFPFTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV
	VCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYS
	LSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
	(SEQ ID NO:54)
15462	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQA
	PRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYC
	QQAASYPLTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV
	VCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYS
	LSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
	(SEQ ID NO:64)
	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVASSHLAWYQQKPGQ
	APRLLIYDAVSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYY
22213	CQQAASYPLTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTAS
	VVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTY
	SLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
	(SEQ ID NO:74)
	DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISRWLAWYQQKPGKA
	PKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC
15465	QQAHTFPYTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV
13403	VCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYS
	LSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
	(SEQ ID NO:84)
	DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISRWLAWYQQKPGKA
20506	PKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC
	QQAHTFPYTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV
	VCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYS
	LSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
	(SEQ ID NO:94)
15483	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQSISSWLAWYQQKPGKA
	PKLLIYKASSLESGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFATYYC
	QQDNSYPYTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV
	VCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYS
	LSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

	(SEQ ID NO:104)
20513	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQSISSWLAWYQQKPGKA
	PKLLIYKASSLESGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFATYYC
	QQDNSYPYTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV
	VCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYS
	LSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
	(SEQ ID NO:114)
22216	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASKSISSWLAWYQQKPGKA
	PKLLIYEASSLHSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFATYYC
	QQDNSYPYTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV
	VCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYS
	LSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
	(SEQ ID NO:124)
15489	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQSISSWLAWYQQKPGKA
	PKLLIYKASSLESGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFATYYC
	QQDNSFPFTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV
	VCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYS
	LSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
	(SEQ ID NO:134)
20516	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQSISSWLAWYQQKPGKA
	PKLLIYKASSLESGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFATYYC
	QQDNSFPFTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV
	VCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYS
	LSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
	(SEQ ID NO:144)
15472	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAP
	KLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQ
	QLYSLPPTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVV
	CLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSL
	SSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ
	ID NO:154)
15503	DIQLTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQDISSWLAWYQQKPGKA
	PKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC
	QQATSYPPWTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTAS
	VVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTY

ERATLSCRASQSVSSNLAWYQQKPGQA
ARFSGSGSGTEFTLTISSLQSEDFAVYYC
WKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYS
KVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
DRVTITCRASQSISSWLAWYQQKPGKA
SRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFATYYC
KVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTAS
QWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTY
IKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
DRVTITCRASQSISSWLAWYQQKPGKA
SRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFATYYC
VEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV
WKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYS
KVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
DRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAP
RFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQ
TEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVV
/KVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSL
VYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ

[00154] В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанный в данном документе, связывается с В7-Н4 человека и содержит последовательность тяжелой цепи и последовательность легкой цепи антитела, перечисленного в Таблицах 7 и 8 (то есть последовательность тяжелой цепи антитела перечислены в Таблице 7, а последовательность легкой цепи того же антитела приведена в Таблице 8).

[00155] В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанный в данном документе, связывается с В7-Н4

человека, содержит шесть CDR антитела, перечисленных в Таблицах 1 и 2 (то есть три CDR VH антитела, перечисленных в Таблице 1, и три CDR VL одного и того же антитела, перечисленные в Таблице 2), и содержит VH, содержащую последовательность по меньшей мере на 80 % идентичную последовательности VH того же антитела в Таблице 3, и VL, содержащую последовательность ПО меньшей мере на 80 % идентичную последовательности VL последовательность того же антитела в Таблице 4.В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанный в данном документе, связывается с В7-Н4 человека, содержит шесть CDR антитела, перечисленных в Таблицах 1 и 2 (то есть три CDR VH антитела, перечисленных в Таблице 1, и три CDR VL одного и того же антитела, перечисленные в Таблице 2), и содержит VH, содержащую последовательность по меньшей мере на 85 % идентичную последовательности VH того же антитела в Таблице 3, и VL, содержащую последовательность по меньшей мере на 85 % идентичную последовательности VL последовательность того же антитела в Таблице 4.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанный в данном документе, связывается с В7-Н4 человека, содержит шесть CDR антитела, перечисленных в Таблицах 1 и 2 (то есть три CDR VH антитела, перечисленных в Таблице 1, и три CDR VL одного и того же антитела, перечисленные в Таблице 2), и содержит VH, содержащую последовательность по меньшей мере на 90 % идентичную последовательности VH того же антитела в Таблице 3, и VL, последовательность меньшей 90 идентичную содержащую по мере на последовательности VL последовательность того же антитела в Таблице 4.В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанный в данном документе, связывается с В7-Н4 человека, содержит шесть CDR антитела, перечисленных в Таблицах 1 и 2 (то есть три CDR VH антитела, перечисленных в Таблице 1, и три CDR VL одного и того же антитела, перечисленные в Таблице 2), и содержит VH, содержащую последовательность по меньшей мере на 95 % идентичную последовательности VH того же антитела в Таблице 3, и VL, содержащую последовательность по меньшей мере на 95 % идентичную последовательности VL последовательность того же антитела в Таблице 4.

[00157] В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанный в данном документе, связывается с B7-H4 человека, содержит шесть CDR антитела, перечисленных в Таблицах 1 и 2 (то есть три CDR VH антитела, перечисленных в Таблице 1, и три CDR VL одного и того же антитела, перечисленные в Таблице 2), и содержит VH, содержащую последовательность по меньшей

мере на 96 % идентичную последовательности VH того же антитела в Таблице 3, и VL, последовательность ПО меньшей мере на 96 последовательности VL последовательность того же антитела в Таблице 4.В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанный в данном документе, связывается с В7-Н4 человека, содержит шесть CDR антитела, перечисленных в Таблицах 1 и 2 (то есть три CDR VH антитела, перечисленных в Таблице 1, и три CDR VL одного и того же антитела, перечисленные в Таблице 2), и содержит VH, содержащую последовательность по меньшей мере на 97 % идентичную последовательности VH того же антитела в Таблице 3, и VL, содержащую последовательность по меньшей мере на 97 % идентичную последовательности VL последовательность того же антитела в Таблице 4.В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанный в данном документе, связывается с B7-H4 человека, содержит шесть CDR антитела, перечисленных в Таблицах 1 и 2 (то есть три CDR VH антитела, перечисленных в Таблице 1, и три CDR VL одного и того же антитела, перечисленные в Таблице 2), и содержит VH, меньшей содержащую последовательность ПО мере на 98 идентичную последовательности VH того же антитела в Таблице 3, и VL, содержащую последовательность по меньшей мере на 98 % идентичную последовательности VL последовательность того же антитела в Таблице 4.В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанный в данном документе, связывается с B7-H4 человека, содержит шесть CDR антитела, перечисленных в Таблицах 1 и 2 (то есть три CDR VH антитела, перечисленных в Таблице 1, и три CDR VL одного и того же антитела, перечисленные в Таблице 2), и содержит VH, содержащую последовательность по меньшей мере на % идентичную последовательности VH того же антитела в Таблице 3, и VL, содержащую последовательность по меньшей мере на 99 % идентичную последовательности VL последовательность того же антитела в Таблице 4.

[00158] В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанный в данном документе, связывается с В7-Н4 человека, содержит шесть CDR антитела, перечисленных в Таблицах 1 и 2 (то есть три CDR VH антитела, перечисленных в Таблице 1, и три CDR VL одного и того же антитела, перечисленные в Таблице 2), содержит VH, содержащую последовательность по меньшей мере на 80 % идентичную последовательности VH того же антитела в Таблице 3, и VL, содержащую последовательность по меньшей мере на 80 % идентичную последовательность того же антитела в Таблице 4 и связывается с

В7-Н4 человека, яванского макака, крысы и/или мыши.В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанный в данном документе, связывается с В7-Н4 человека, содержит шесть CDR антитела, перечисленных в Таблицах 1 и 2 (то есть три CDR VH антитела, перечисленных в Таблице 1, и три CDR VL одного и того же антитела, перечисленные в Таблице 2), содержит VH, содержащую последовательность по меньшей мере на 85 % идентичную последовательности VH того же антитела в Таблице 3, и VL, содержащую последовательность по меньшей мере на 85 % идентичную последовательности VL последовательность того же антитела в Таблице 4 и связывается с В7-Н4 человека, яванского макака, крысы и/или мыши.

[00159] В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанный в данном документе, связывается с В7-Н4 человека, содержит шесть CDR антитела, перечисленных в Таблицах 1 и 2 (то есть три CDR VH антитела, перечисленных в Таблице 1, и три CDR VL одного и того же антитела, перечисленные в Таблице 2), содержит VH, содержащую последовательность по меньшей мере на 90 % идентичную последовательности VH того же антитела в Таблице 3, и VL, содержащую последовательность ПО меньшей мере на 90 % идентичную последовательности VL последовательность того же антитела в Таблице 4 и связывается с В7-Н4 человека, яванского макака, крысы и/или мыши. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанный в данном документе, связывается с B7-H4 человека, содержит шесть CDR антитела, перечисленных в Таблицах 1 и 2 (то есть три CDR VH антитела, перечисленных в Таблице 1, и три CDR VL одного и того же антитела, перечисленные в Таблице 2), содержит VH, содержащую последовательность по меньшей мере на 95 % идентичную последовательности VH того же антитела в Таблице 3, и VL, содержащую последовательность по меньшей мере на 95 % идентичную последовательности VL последовательность того же антитела в Таблице 4 и связывается с В7-Н4 человека, яванского макака, крысы и/или мыши.

[00160] В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанный в данном документе, связывается с В7-Н4 человека, содержит шесть CDR антитела, перечисленных в Таблицах 1 и 2 (то есть три CDR VH антитела, перечисленных в Таблице 1, и три CDR VL одного и того же антитела, перечисленные в Таблице 2), содержит VH, содержащую последовательность по меньшей мере на 96 % идентичную последовательность по меньшей мере на 96 % идентичную

последовательности VL последовательность того же антитела в Таблице 4 и связывается с В7-Н4 человека, яванского макака, крысы и/или мыши. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанный в данном документе, связывается с B7-H4 человека, содержит шесть CDR антитела, перечисленных в Таблицах 1 и 2 (то есть три CDR VH антитела, перечисленных в Таблице 1, и три CDR VL одного и того же антитела, перечисленные в Таблице 2), содержит VH, содержащую последовательность по меньшей мере на 97 % идентичную последовательности VH того же антитела в Таблице 3, и VL, содержащую последовательность по меньшей мере на 97 % идентичную последовательности VL последовательность того же антитела в Таблице 4 и связывается с В7-Н4 человека, яванского макака, крысы и/или мыши. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанный в данном документе, связывается с B7-H4 человека, содержит шесть CDR антитела, перечисленных в Таблицах 1 и 2 (то есть три CDR VH антитела, перечисленных в Таблице 1, и три CDR VL одного и того же антитела, перечисленные в Таблице 2), содержит VH, содержащую последовательность по меньшей мере на 98 % идентичную последовательности VH того же антитела в Таблице 3, и VL, содержащую последовательность по меньшей мере на 98 % идентичную последовательности VL последовательность того же антитела в Таблице 4 и связывается с В7-Н4 человека, яванского макака, крысы и/или мыши. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанный в данном документе, связывается с В7-Н4 человека, содержит шесть CDR антитела, перечисленных в Таблицах 1 и 2 (то есть три CDR VH антитела, перечисленных в Таблице 1, и три CDR VL одного и того же антитела, перечисленные в Таблице 2), содержит VH, содержащую последовательность по меньшей мере на 99 % идентичную последовательности VH того же антитела в Таблице 3, и VL, содержащую последовательность по меньшей мере на 99 % идентичную последовательности VL последовательность того же антитела в Таблице 4 и связывается с В7-Н4 человека, яванского макака, крысы и/или мыши.

[00161] В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанный в данном документе, связывается с В7-Н4 человека, содержит шесть CDR антитела, перечисленных в Таблицах 1 и 2 (то есть три CDR VH антитела, перечисленных в Таблице 1, и три CDR VL одного и того же антитела, перечисленные в Таблице 2), содержит VH, содержащую последовательность по меньшей мере на 80 % идентичную последовательность по меньшей мере на 80 % идентичную

последовательности VL последовательность того же антитела в Таблице 4, увеличивает пролиферацию Т-клеток, увеличивает продукцию ИФНү и опосредует активность АЗКЦ против В7-Н4-экспрессирующих клеток. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанный в данном документе, связывается с В7-Н4 человека, содержит шесть CDR антитела, перечисленных в Таблицах 1 и 2 (то есть три CDR VH антитела, перечисленных в Таблице 1, и три CDR VL одного и того же антитела, перечисленные в Таблице 2), содержит VH, содержащую последовательность по меньшей мере на 85 % идентичную последовательности VH того же антитела в Таблице 3, и VL, содержащую последовательность по меньшей мере на 85 % идентичную последовательности VL последовательность того же антитела в Таблице 4, увеличивает пролиферацию Т-клеток, увеличивает продукцию ИФНү и опосредует активность АЗКЦ против В7-Н4-экспрессирующих клеток.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, антитело или его [00162] антигенсвязывающий фрагмент, описанный в данном документе, связывается с В7-Н4 человека, содержит шесть CDR антитела, перечисленных в Таблицах 1 и 2 (то есть три CDR VH антитела, перечисленных в Таблице 1, и три CDR VL одного и того же антитела, перечисленные в Таблице 2), содержит VH, содержащую последовательность по меньшей мере на 90 % идентичную последовательности VH того же антитела в Таблице 3, и VL, последовательность 90 % идентичную содержащую ПО меньшей мере на последовательности VL последовательность того же антитела в Таблице 4, увеличивает пролиферацию Т-клеток, увеличивает продукцию ИФНу и/или опосредует активность АЗКЦ против В7-Н4-экспрессирующих клеток. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанный в данном документе, связывается с B7-H4 человека, содержит шесть CDR антитела, перечисленных в Таблицах 1 и 2 (то есть три CDR VH антитела, перечисленных в Таблице 1, и три CDR VL одного и того же антитела, перечисленные в Таблице 2), содержит VH, % 95 содержащую последовательность по меньшей мере на идентичную последовательности VH того же антитела в Таблице 3, и VL, последовательность по меньшей мере на 95 % идентичную последовательности VL последовательность того же антитела в Таблице 4, увеличивает пролиферацию Т-клеток, увеличивает продукцию ИФНу и опосредует активность АЗКЦ против В7-Н4экспрессирующих клеток.

[00163] В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанный в данном документе, связывается с B7-H4 человека, содержит шесть CDR антитела, перечисленных в Таблицах 1 и 2 (то есть три CDR

VH антитела, перечисленных в Таблице 1, и три CDR VL одного и того же антитела, перечисленные в Таблице 2), содержит VH, содержащую последовательность по меньшей мере на 96 % идентичную последовательности VH того же антитела в Таблице 3, и VL, последовательность ПО мере % содержащую меньшей на 96 последовательности VL последовательность того же антитела в Таблице 4, увеличивает пролиферацию Т-клеток, увеличивает продукцию ИФНу и опосредует активность АЗКЦ против В7-Н4-экспрессирующих клеток. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанный в данном документе, связывается с B7-H4 человека, содержит шесть CDR антитела, перечисленных в Таблицах 1 и 2 (то есть три CDR VH антитела, перечисленных в Таблице 1, и три CDR VL одного и того же антитела, перечисленные в Таблице 2), содержит VH, содержащую последовательность по меньшей мере на 97 % идентичную последовательности VH того же антитела в Таблице 3, и VL, содержащую последовательность по меньшей мере на 97 % идентичную последовательности VL последовательность того же антитела в Таблице 4, увеличивает пролиферацию Т-клеток, увеличивает продукцию ИФНү и опосредует активность АЗКЦ против В7-Н4-экспрессирующих клеток. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанный в данном документе, связывается с B7-H4 человека, содержит шесть CDR антитела, перечисленных в Таблицах 1 и 2 (то есть три CDR VH антитела, перечисленных в Таблице 1, и три CDR VL одного и того же антитела, перечисленные в Таблице 2), содержит VH, содержащую последовательность по меньшей мере на 98 % идентичную последовательности VH того же антитела в Таблице 3, и VL, содержащую последовательность по меньшей мере на 98 % идентичную последовательности VL последовательность того же антитела в Таблице 4, увеличивает пролиферацию Т-клеток, увеличивает продукцию ИФНү и опосредует активность АЗКЦ против В7-Н4экспрессирующих клеток. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанный в данном документе, связывается с B7-H4 человека, содержит шесть CDR антитела, перечисленных в Таблицах 1 и 2 (то есть три CDR VH антитела, перечисленных в Таблице 1, и три CDR VL одного и того же антитела, перечисленные в Таблице 2), содержит VH, содержащую последовательность по меньшей мере на 99 % идентичную последовательности VH того же антитела в Таблице 3, и VL, содержащую последовательность по меньшей мере на 99 % идентичную последовательности VL последовательность того же антитела в Таблице 4, увеличивает пролиферацию Т-клеток, увеличивает продукцию ИФНү и опосредует активность АЗКЦ против В7-Н4-экспрессирующих клеток.

В определенных аспектах антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, [00164] описанные в данном документе, могут быть описаны только его VL-доменом или только его VH-доменом или только его 3 CDR VL или только его 3 CDR VH. См., например, Rader C et al., (1998) PNAS 95:8910-8915, который включен в данное описание в качестве ссылки во всей своей полноте и описывает гуманизацию мышиного анти-ανβ3-антитела путем идентификации комплементарной легкой цепи или тяжелой цепи, соответственно, из библиотеки легкой или тяжелой цепи человека, что приводит к гуманизированным вариантам антитела, имеющим аффинность как высокую или более высокую, чем аффинность исходного антитела. См. также Clackson T et al., (1991) Nature 352:624-628, который включен в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте, описывающей способы получения антител, которые связывают специфический антиген, с использованием конкретного домена VL (или домена VH) и скрининга библиотеки для комплементарных вариабельных доменов. Скрининг произвел 14 новых партнеров для конкретного домена VH и 13 новых партнеров для конкретного домена VL, которые были сильными связующими, как определено методом ИФА. См. также Kim SJ & Hong HJ, (2007) J Microbiol 45:572-577, который полностью включен в данное описание посредством ссылки, описывающий способы получения антител, которые связывают специфический антиген, с использованием конкретного домена VH и скрининга библиотеки (например, библиотеки VL человека) на наличие комплементарных доменов VL; выбранные домены VL, в свою очередь, могут использоваться для направления выбора дополнительных комплементарных (например, человеческих) доменов VH.

[00165] В определенных аспектах CDR антитела или его антигенсвязывающего фрагмента можно определять по схеме нумерации Хотиа, которая относится к расположению структурных петель иммуноглобулина (см., например, Chothia C & Lesk AM, (1987), J. Mol Biol 196:901-917; Al-Lazikani B et al., (1997) J Mol Biol 273:927-948; Chothia C et al., (1992) J Mol Biol 227:799-817; Tramontano A et al., (1990) J Mol Biol 215(1):175-82; и пат. США№ 7709226). Как правило, при использовании соглашения о нумерации по Кабат петля CDR-H1 по Хотиа присутствует в аминокислотах тяжелой цепи 26-32, 33 или 34, петля CDR-H2 по Хотиа присутствует в аминокислотах тяжелой цепи с 95 по 102, в то время как петля CDR-L1 по Хотиа присутствует в аминокислотах легкой цепи с 95 по 102, в то СDR-L2 по Хотиа присутствует в аминокислотах легкой цепи от 50 до 56 и петля CDR-L3 по Хотиа присутствует в аминокислотах легкой цепи от 50 до 56 и петля CDR-L3 по Хотиа присутствует в аминокислотах легкой цепи от 50 до 56 и петля CDR-L3 по Хотиа присутствует в аминокислотах легкой цепи от 50 до 56 и петля CDR-L3 по Хотиа присутствует в аминокислотах легкой цепи от 50 до 56 и петля CDR-L3 по Хотиа присутствует в аминокислотах легкой цепи от 50 до 56 и петля СDR-L3 по Хотиа присутствует в аминокислотах легкой цепи от 50 до 56 и петля СDR-L3 по Хотиа присутствует в аминокислотах легкой цепи от 50 до 56 и петля СDR-L3 по Хотиа присутствует в аминокислотах легкой цепи от 50 до 56 и петля СDR-L3 по Хотиа присутствует в аминокислотах легкой цепи от 50 до 56 и петля СDR-L3 по Хотиа присутствует в аминокислотах легкой цепи от 50 до 56 и петля СDR-L3 по Хотиа присутствует в аминокислотах легкой цепи от 50 до 56 и петля СDR-L3 по Хотиа присутствует в аминокислотах легкой цепи от 50 до 56 и петля СDR-L3 по Хотиа присутствует в аминокислотах легкой цепи от 50 до 56 и петля СDR-L3 по Хотиа присутствует в аминокислотах легкой цепи от 50 до 56 и петля СDR-L3 по Хотиа присутствует в аминокислотах легкой цепи от 50 до 56 и петля СDR-L3 по Хотиа присутствует в аминокислотах легкой

размещает вставки в H35A и H35B; если ни 35A, ни 35B не присутствуют, петля заканчивается на 32; если присутствует только 35A, петля заканчивается на 33; если присутствует обе 35A и 35B, петля заканчивается на 34).

В определенных аспектах в данном документе представлены антитела и их [00166] антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связываются с В7-Н4 (например, В7-Н4 человека) и содержат CDR VH и VL антитела по Хотиа, перечисленного в Таблицах 3 и 4.В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связываются с В7-Н4 (например, B7-H4 человека), содержат одну или более CDR, в которых CDR по Хотиа и Кабат имеют одинаковую аминокислотную последовательность. В определенных вариантах осуществления в данном документе представлены антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связываются с В7-Н4 (например, В7-Н4 человека) и содержат комбинации CDR по Кабат и CDR по Хотиа.

[00167] В определенных аспектах CDR антитела или его антигенсвязывающего фрагмента могут быть определены в соответствии с системой нумерации IMGT, как описано в Lefranc MP, (1999) Immunologist 7:132-136 and Lefranc M-P et al., (1999) Nucleic Acids Res 27:209-212. Согласно схеме нумерации IMGT, VH-CDR1 находится в положениях с 26 по 35, VH-CDR2 находится в положениях с 51 по 57, VH-CDR3 находится в положениях с 93 по 102, VL-CDR1 находится в положениях с 27 по 32, VL-CDR2 находится в положениях с 50 по 52, и VL-CDR3 находится в положениях с 89 по 97. В конкретном варианте осуществления данного изобретения, в данном документе представлены антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связываются с В7-Н4 (например, В7-Н4 человека) и включают в себя CDR VH и VL антитела по IMGT, перечисленного, например, в Таблицах 3 и 4, например, как описано в Lefranc MP (1999) выше и Lefranc MP et al. (1999) выше).

[00168] В определенных аспектах CDR антитела или его антигенсвязывающего фрагмента могут быть определены в соответствии с MacCallum RM et al., (1996) J Mol Biol 262:732-745. См. также, например, Martin A."Protein Sequence and Structure Analysis of Antibody Variable Domains," в Antibody Engineering, Kontermann and Dübel, eds., Chapter 31, pp. 422-439, Springer-Verlag, Берлин (2001). В конкретном варианте осуществления данного изобретения, в данном документе представлены антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связываются с В7-Н4 (например, В7-Н4 человека) и содержат CDR VH и VL антитела, перечисленного в Таблицах 3 и 4, как определено способом по MacCallum RM et al.

[00169] В определенных аспектах CDR антитела или его антигенсвязывающего

фрагмента можно определять согласно схеме нумерации AbM, которая относится к гипервариабельным участкам AbM, которые представляют собой компромисс между CDR по Кабат и структурными петлями по Хотиа, и используются программным обеспечением для моделирования антител AbM Oxford Molecular (Oxford Molecular Group, Inc.). В конкретном варианте осуществления данного изобретения, в данном документе представлены антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связываются с B7-H4 (например, B7-H4 человека) и содержат CDR VH и VL антитела, перечисленного в Таблицах 3 и 4, как определено схемой нумерации AbM.

[00170] В конкретных аспектах в данном документе представлены антитела, которые содержат тяжелую цепь и легкую цепь. Что касается тяжелой цепи, в конкретном варианте осуществления данного изобретения, тяжелая цепь антитела, описанного в данном документе, может представлять собой тяжелую цепь альфа ( $\alpha$ ), дельта ( $\delta$ ), эпсилон ( $\epsilon$ ), гамма (γ) или мю (μ). В другом конкретном варианте осуществления данного изобретения, тяжелая цепь описанного антитела может содержать тяжелую цепь альфа  $(\alpha)$ , дельта  $(\delta)$ , эпсилон ( $\epsilon$ ), гамма ( $\gamma$ ) или мю ( $\mu$ ) человека. В конкретном варианте осуществления данного изобретения, антитело, описанное в данном документе, которое иммуноспецифично связывается с В7-Н4 (например, В7-Н4 человека), содержит тяжелую цепь, при этом аминокислотная последовательность домена VHсодержит аминокислотную последовательность, представленную в Таблице 3, и при этом константный участок тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность константного участка тяжелой цепи гамма (у) человека. В конкретном варианте осуществления данного изобретения, антитело, описанное в данном документе, которое специфически связывается с В7-Н4 (например, В7-Н4 человека), содержит тяжелую цепь, при этом аминокислотная последовательность домена VH содержит последовательность, представленную в Таблице 3, и при этом константный участок тяжелой цепи содержит аминокислоту тяжелой цепи человека, описанную в данном документе или известную в данной области техники. Неограничивающие примеры последовательностей константного участка человека были описаны в данной области техники, например, см. пат. США№ 5693780 и Kabat EA et al. (1991) выше.

[00171] Что касается легкой цепи, в конкретном варианте осуществления данного изобретения, легкая цепь антитела, описанного в данном документе, представляет собой легкую цепь каппа. Константный участок легкой цепи каппа человека может содержать следующую аминокислотную последовательность:

[00172] RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS QESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:405).

[00173] Константный участок легкой цепи каппа человека может кодироваться следующей нуклеотидной последовательностью:

CGGACCGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAG [00174] TTGAAATCTGGAACTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAG GCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAG TGTCACAGAGCAGCAGCAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCTGACGC TGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAG GGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT (SEQ ID NO:406). В другом конкретном варианте осуществления данного изобретения, легкая цепь [00175] антитела, описанного в данном документе, представляет собой легкую цепь лямбда. В еще одном конкретном варианте осуществления данного изобретения, легкая цепь антитела, описанного в данном документе, представляет собой легкую цепь каппа человека или легкую цепь лямбда человека. В конкретном варианте осуществления данного изобретения, антитело, описанное в данном документе, которое иммуноспецифично связывается с полипентидом В7-Н4 (например, В7-Н4 человека), содержит легкую цепь, в которой аминокислотная последовательность домена VLсодержит последовательность, приведенную в Таблице 4, и при этом константный участок легкой цепи содержит аминокислотную последовательность константного участка легкой цепи каппа человека. В другом конкретном варианте осуществления данного изобретения, антитело, описанное в данном документе, которое иммуноспецифично связывается с В7-Н4 (например, В7-Н4 человека), содержит легкую цепь, в которой аминокислотная последовательность домена VL содержит последовательность, приведенную в Таблице 4, и в которой константный участок легкой цепи содержит аминокислотную последовательность константного участка легкой цепи лямбда человека. В конкретном варианте осуществления данного изобретения, антитело, описанное в данном документе, которое иммуноспецифично связывается с В7-Н4 (например, В7-Н4 человека), содержит легкую цепь, в которой аминокислотная последовательность домена VL содержит последовательность, приведенную в Таблице 4, и которой константный участок легкой цепи содержит аминокислотную последовательность константного участка легкой цепи каппа или лямбда человека. Неограничивающие примеры последовательностей константного участка человека были описаны в данной области техники, например, см. пат. США№ 5693780 и Kabat EA et al. (1991) выше.

[00176] В конкретном варианте осуществления данного изобретения, антитело, описанное в данном документе, которое иммуноспецифично связывается с В7-Н4

(например, B7-H4 человека), содержит домен VH и домен VL, содержащий любую аминокислотную последовательность, описанную в данном документе, и при этом константные участки содержат аминокислоту последовательности константных участков молекулы иммуноглобулина IgG, IgE, IgM, IgD, IgA или IgY или молекулы иммуноглобулина IgG, IgE, IgM, IgD, IgA или IgY человека. В другом конкретном варианте осуществления данного изобретения, антитело, описанное в данном документе, которое иммуноспецифично связывается с B7-H4 (например, B7-H4 человека), содержит домен VH и домен VL, содержащий любую аминокислотную последовательность, описанную в данном документе, и при этом константные участки содержат аминокислотные последовательности константных участков молекулы иммуноглобулина IgG, IgE, IgM, IgD, IgA или IgY любого класса (например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и IgA2) или молекулы иммуноглобулина любого подкласса (например, IgG2a и IgG2b). В конкретном варианте осуществления данного изобретения, константные участки содержат аминокислотные последовательности константных участков молекулы иммуноглобулина IgG, IgE, IgM, IgD, IgA или IgY человека любого класса (например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, и IgA2) или молекулы иммуноглобулина любого подкласса (например, IgG2a и IgG2b).

[00177] Константный участок тяжелой цепи IgG1 человека может содержать следующую аминокислотную последовательность:

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 407).

[00178] Константный участок тяжелой цепи IgG 1 человека может кодироваться следующей нуклеотидной последовательностью:

GCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCTCCTCCAAGAGCACCTCT
GGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGAC
GGTGTCGTGGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCT
ACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTT
GGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGG
ACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACTCACACATGCCCACCGTGCCCA
GCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGAC
ACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGACGTGAGCCAC
GAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGTGGAGGTGCATAATGC

CAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGGGTGGTCAGCGTC
CTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTC
CAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGC
CCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAAC
CAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAG
TGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGA
CTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCA
GCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACAC
GCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCCGGGTAAA.(SEQ ID NO: 408)

[00179] Неограничивающие примеры константных участков человека описаны в данной области техники, например, см. Kabat EA et al., (1991) выше.

[00180] В определенных вариантах осуществления данного изобретения, одну, две или более мутаций (например, аминокислотные замены) вводят в Fc участка антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, описанного в данном документе (например, домен CH2 (остатки 231-340 IgG 1 человека) и/или домен CH3 (остатки 341-447 человеческого IgG<sub>1</sub>) и/или шарнирный участок с нумерацией в соответствии с системой нумерации по Кабат (например, индекс EC в Кабат)) для изменения одного или более функциональных свойств антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, такого как период полужизни в сыворотке, фиксации комплемента, связывания с Fc рецептора и/или антиген-зависимой клеточной цитотоксичности.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, одну, две или более [00181] мутаций (например, аминокислотных замен) вводят в шарнирный участок Fc участка (домен СН1) так, что количество остатков цистеина в шарнирном участке изменяется (например, увеличивается или увеличивается) как описано, например, в пат. США № 5677425. Количество остатков цистеина в шарнирном участке домена СН1 может быть изменено, например, для облегчения сборки легкой и тяжелой цепей или для изменения уменьшения) стабильности антитела (например, увеличения или или его антигенсвязывающего фрагмента.

[00182] В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, одну, две или более мутаций (например, аминокислотные замены) вводят в Fc участка антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, описанного в данном документе (например, домен CH2 (остатки 231-340 IgG1 человека), и/или домен CH3 (остатки 341-447 IgG1 человека) и/или шарнирный участок с нумерацией в соответствии с системой нумерации по Кабат (например, индекс EC по Кабат)) для увеличения или уменьшения аффинности антитела или его антиген-связывающего фрагмента для Fc-рецептора (например, активированного

Fc-рецептора) на поверхности эффекторной клетки. Мутации в Fc участке, которые уменьшают или увеличивают аффинность к Fc-рецептору, и способы введения таких мутаций в Fc-рецептор или его фрагмент известны специалисту в данной области техники. Примеры мутаций в Fc-рецепторе, которые могут быть сделаны для изменения аффинности антитела или его антигенсвязывающего фрагмента к Fc-рецептору, описаны, например, в Smith P et al., (2012) PNAS 109:6181-6186, пат. США№ 6737056 и международные публикации № WO 02/060919; WO 98/23289; и WO 97/34631, которые включены в данный документ посредством ссылки.

[00183] В конкретном варианте осуществления данного изобретения одну, две или более аминокислотных мутаций (т.е. замен, вставок или делеций) вводят в константный домен IgG или его FcRn-связывающий фрагмент (предпочтительно фрагмент домена Fc или шарнирный-Fc) для изменения (например, уменьшить или увеличить) периода полужизни антитела или его антигенсвязывающего фрагмента *in vivo*. См., например, международные публикации № WO 02/060919; WO 98/23289; и WO 97/34631; и пат. США № 5869046, 6121022, 6277375 и 6165745 приведены примеры мутаций, которые изменяют (например, уменьшают или увеличивают) период полужизни антитела или его антигенсвязывающего фрагмента *in vivo*. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, одну, две или более аминокислотных мутаций (то есть замен, вставок или делеций) вводят в константный домен IgG или его FcRn-связывающий фрагмент (предпочтительно фрагмент домена Fc или шарнирный-Fc) для уменьшения периода полужизни антитела или его антигенсвязывающего фрагмента in vivo. В других вариантах осуществления данного изобретения, одну, две или более аминокислотных мутаций (то есть замен, вставок или делеций) вводят в константный домен IgG или его FcRn-связывающий фрагмент (предпочтительно фрагмент домена Fc или шарнирный-Fc) для увеличения периода полужизни антитела или его антигенсвязывающего фрагмента in vivo. В конкретном варианте осуществления данного изобретения, антитела или их антигенсвязывающие фрагменты могут иметь одну или более аминокислотных мутаций (например, замен) во втором константном (CH2) домене (остатки 231-340 IgG1 человека) и/или в третьем константном (CH3) домене (остатки 341-447 IgG1 человека) с нумерацией в соответствии с индексом EC по Кабат (Kabat EA et al., (1991) выше). В конкретном варианте осуществления данного изобретения, константный участок IgG1 содержит замену метионина (M) на тирозин (Y) в положении 252, замену серина (S) на треонин (T) в положении 254, и замену треонина (Т) на глутаминовую кислоту (Е) в положении 256, пронумерованные в соответствии с индексом ЕС по Кабат. См., например, пат. № 7658921, который включен в данный документ посредством ссылки. Было показано, что этот тип мутантного IgG,

называемого «YTE мутантом», демонстрирует четырехкратное увеличение периода полужизни по сравнению с версиями дикого типа того же антитела (см. Dall'Acqua WF et al., (2006) J Biol Chem. 281:23514-24).В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат константный домен IgG, содержащий одну, две, три или более аминокислотных замен аминокислотных остатков в положениях 251-257, 285-290, 308-314, 385-389, и 428-436, пронумерованных в соответствии с индексом ЕС по Кабат.

В дополнительном варианте осуществления данного изобретения, одну, две или [00184] более аминокислотных замен вводят в Fc участок константного домена IgG, чтобы изменить эффекторную функцию(и) антитела или его антигенсвязывающего фрагмента. Например, одна или более аминокислот, выбранных из аминокислотных остатков 234, 235, 236, 237, 297, 318, 320 и 322, пронумерованных в соответствии с индексом ЕС по Кабат, могут быть заменены другим аминокислотным остатком, так что антитело или его антигенсвязывающий фрагмент имеют измененную аффинность к эффекторному лиганду, но сохраняют антигенсвязывающую способность исходного антитела. Эффекторный лиганд, к которому изменяется аффинность, может представлять собой, например, Fc рецептор или С1 компонент комплемента. Этот подход более подробно описан в пат. США№ 5624821 и 5648260. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, делеция или инактивация (посредством точечных мутаций или других средств) домена константного участка может снижать связывание Fc-рецептора циркулирующего антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, тем самым увеличивая локализацию опухоли. См., например, пат. № 5585097 и 8591886 для описания мутаций, которые удаляют или инактивируют константный домен и тем самым увеличивают локализацию опухоли. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, одна или более аминокислотных замен могут быть введены в Fc участок для удаления потенциальных сайтов гликозилирования в Fc участке, которые могут снижать связывание с Fc рецептором (см., например, Shields RL et al., (2001) J Biol Chem 276:6591-604).

[00185] В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, одна или более аминокислот, выбранных из аминокислотных остатков 329, 331 и 322 в константном участке, пронумерованных в соответствии с индексом ЕС по Кабат, могут быть заменены другим аминокислотным остатком, так что антитело или его антиген-связывающий фрагмент имеют измененное связывание С1q и/или пониженную или аннулированную цитотоксичность, зависящую от комплемента (СDС). Этот подход более подробно описан в пат. США № 6194551 (Idusogie et al). В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, один или более аминокислотных остатков в аминокислотных положениях с

231 по 238 в N-концевом участке домена СН2 изменены, чтобы тем самым изменить способность антитела фиксировать комплемент. Этот подход описан далее в международной публикации № WO 94/29351. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, Fc участок модифицируют для увеличения способности антитела или его антигенсвязывающего фрагмента опосредовать антителозависимую клеточную цитотоксичность (АЗКЦ) и/или для увеличения сродства антитела ИЛИ антигенсвязывающего фрагмента к Гсу рецептору путем мутации одной или более аминокислот (например, путем введения аминокислотных замен) в следующих положениях: 238, 239, 248, 249, 252, 254, 255, 256, 258, 265, 267, 268, 269, 270, 272, 276, 278, 280, 283, 285, 286, 289, 290, 292, 293, 294, 295, 296, 298, 301, 303, 305, 307, 309, 312, 315, 320, 322, 324, 326, 327, 328, 329, 330, 331, 333, 334, 335, 337, 338, 340, 360, 373, 376, 378, 382, 388, 389, 398, 414, 416, 419, 430, 434, 435, 437, 438 или 439, пронумерованные в соответствии с индексом ЕС по Кабат. Этот подход описан далее в международной публикации № WO 00/42072.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, антитело или его [00186] антигенсвязывающий фрагмент, описанные в данном документе, содержат константный домен IgG1 с мутацией (например, замещением) в положении 267, 328 или их комбинацией, пронумерованной в соответствии с индексом ЕС по Кабат. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанный в данном документе, содержат константный домен IgG1 с мутацией (например, замещением), выбранной из группы, состоящей из S267E, L328F и их комбинации. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, антитело антигенсвязывающий фрагмент, описанный в данном документе, содержат константный домен IgG1 с мутацией S267E/L328F (например, замещением). В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанный в данном документе, содержащие константный домен IgG1 с мутацией S267E/L328F (например, замещение), обладают повышенной аффинностью связывания с FcyRIIA, FcyRIIB или FcyRIIA и FcyRIIB.

[00187] Сообщалось, что антитела с пониженным содержанием фукозы обладают повышенной аффинностью к Fc рецепторам, таким как, например, FcγRIIIA. Соответственно, в определенных вариантах осуществления данного изобретения, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в данном документе, имеет пониженное содержание фукозы или лишено фукозы (то есть является «афукозилированным»). Такие антитела или их антигенсвязывающие фрагменты могут быть получены с использованием методик, известных специалисту в данной области техники. Например, они могут быть

экспрессированы в клетках с дефицитом или отсутствием способности к фукозилированию. В конкретном примере клеточные линии с нокаутом обоих аллелей фукозилтрансферазы онжом для получения антител или использовать ИΧ антигенсвязывающих фрагментов содержанием с пониженным фукозы. Potelligent® (Lonza) является примером такой системы, которую можно использовать для получения антител и их антигенсвязывающих фрагментов с пониженным содержанием фукозы. Альтернативно, антитела или их антигенсвязывающие фрагменты с пониженным содержанием фукозы или без содержания фукозы могут быть получены, например, путем:(i) культивирования клеток в условиях, которые предотвращают или уменьшают фукозилирование; (ii) посттрансляционного удаления фукозы (например, с помощью фермента фукозидазы); (ііі) посттрансляционного добавления желаемого углевода, например, после рекомбинантной экспрессии негликозилированного гликопротеина; или (iv) очистки гликопротеина с целью отбора антител или их антигенсвязывающих фрагментов, которые не являются фукозилированными. См., например, Longmore GD & Schachter H (1982) Carbohydr Res 100:365-92 and Imai-Nishiya H et al., (2007) BMC Biotechnol.7:84 для способов получения их антител без содержания фукозы или с пониженным содержанием фукозы. См. также пример 8 в данном документе, описывающий получение афукозилированных антител В7-Н4.

[00188] В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, антитело В7-Н4 или его антигенсвязывающий фрагмент имеют повышенную активность АЗКЦ in vitro по сравнению с фукозилированными антителами В7-Н4 или их антигенсвязывающими фрагментами, имеющими одинаковую аминокислотную последовательность. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, афукозилированные антитела В7-Н4 или их антигенсвязывающие фрагменты вызывают специфический лизис, который составляет по меньшей мере 10, по меньшей мере 15, по меньшей мере 20, по меньшей мере 25, по меньшей мере 30, по меньшей мере 35, по меньшей мере 40, по меньшей мере 45, по меньшей мере 50, по меньшей мере 60, по меньшей мере 65, по меньшей мере 70 или по меньшей мере на 75 процентных пунктов больше, чем специфический лизис с фукозилированными антителами В7-Н4.

[00189] В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, антитело В7-Н4 или его антигенсвязывающий фрагмент имеют повышенную аффинность к Fc-гамма RIIIA по сравнению с фукозилированными антителами В7-Н4 или их антигенсвязывающими фрагментами, имеющими одинаковую аминокислотную последовательность. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, афукозилированные антитела В7-Н4 или их антигенсвязывающие фрагменты связываются с Fc-гамма RIIIA по меньшей мере в 2

раза, по меньшей мере в 3 раза, по меньшей мере в 4 раза, по меньшей мере в 5 раз, по меньшей мере в 7 раз, по меньшей мере в 10 раз, по меньшей мере в 12 раз, по меньшей мере в 15 раз, по меньшей мере в 20 раз большей аффинностью, чем у фукозилированных антител В7-Н4 или их антигенсвязывающих фрагментов. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, аффинность к Fc-гамма RIIIA определяют с использованием поверхностного плазмонного резонанса .В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, Fc-гамма RIIIA выбран из Fc-гамма RIIIA (V158) и Fc-гамма RIIIA (F158).В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, Fc-гамма RIIIA представляет собой Fc-гамма RIIIA (V158).

[00190] В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, присутствие фукозы может быть определено способом, включающим высокоэффективную жидкостную хроматографию (ВЭЖХ), капиллярный электрофорез или масс-спектрометрию MALDITOF.

[00191] В конкретных вариантах осуществления данного изобретения, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (i) содержит последовательности CDR 20502 (например, аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 458-463), последовательности VH и VL 20502 (аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 464 и 42 соответственно) или последовательности тяжелой и легкой цепей 20502 (аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 469 и 44 соответственно) и (ii) являются афукозилированными.

[00192] В конкретных вариантах осуществления данного изобретения, композиция содержит антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые (i) содержат последовательности CDR 20502 (например, аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 458-463), последовательности VH и VL 20502 (аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 464 и 42 соответственно) или последовательности тяжелой и легкой цепей 20502 (аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 469 и 44 соответственно) и (ii) являются афукозилированными, например, при этом по меньшей мере 95 % антител в композиции являются афукозилированными или в которых фукозилирование не обнаружено в композиции.

[00193] В конкретных вариантах осуществления данного изобретения, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (i) содержит последовательности CDR 20502.1 (например, аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 35-40), последовательности VH и VL 20502.1 (аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 41 и 42 соответственно) или последовательности тяжелой и легкой цепей 20502.1 (аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 43 и 44 соответственно) и (ii) являются афукозилированными.

[00194] В конкретных вариантах осуществления данного изобретения, композиция

содержит антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые (i) содержат последовательности CDR 20502.1 (например, аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 35-40), последовательности VH и VL 20502.1 (аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 41 и 42 соответственно) или последовательности тяжелой и легкой цепей 20502.1 (аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 43 и 44 соответственно) и (ii) являются афукозилированными, например, при этом по меньшей мере 95 % антител в композиции являются афукозилированными или в которых фукозилирование не обнаружено в композиции.

[00195] В конкретных вариантах осуществления данного изобретения, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (i) содержит последовательности CDR 22213 (например, аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 65-70), последовательности VH и VL 22213 (аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 71 и 72 соответственно) или последовательности тяжелой и легкой цепей 22213 (аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 73 и 74 соответственно) и (ii) являются афукозилированными.

[00196] В конкретных вариантах осуществления данного изобретения, композиция содержит антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые (i) содержат последовательности CDR 22213 (например, аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 65-70), последовательности VH и VL 22213 (аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 71 и 72 соответственно) или последовательности тяжелой и легкой цепей 22213 (аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 73 и 74 соответственно) и (ii) являются афукозилированными, например, при этом по меньшей мере 95 % антител в композиции являются афукозилированными или в которых фукозилирование не обнаружено в композиции.

[00197] Инженерные гликоформы могут быть полезны для различных целей, включая, но не ограничиваясь ими, усиление или уменьшение эффекторной функции. Способы получения сконструированных гликоформ в антителе или его антигенсвязывающем фрагменте, описанные в данном документе, включают, но не ограничиваются описанными, например, в Umaña P et al., (1999) Nat Biotechnol 17:176-180; Davies J et al., (2001) Biotechnol Bioeng 74:288-294; Shields RL et al., (2002) J Biol Chem 277:26733-26740; Shinkawa T et al., (2003) J Biol Chem 278:3466-3473; Niwa R et al., (2004) Clin Cancer Res 1:6248-6255; Presta LG et al., (2002) Biochem Soc Trans 30:487-490; Kanda Y et al., (2007) Glycobiology 17:104-118, пат. США№ 6602684; 6946292; и 7214775; патентные публикации США № 2007/0248600; 2007/0178551; 2008/0060092; и 2006/0253928; Международная публикация № WO 00/61739; WO 01/292246; WO 02/311140; и WO 02/30954; Технология Potillegent™ (Віоwа, Іпс., Принстон, Нью-Джерси); и технология гликозилирования GlycoMAb® (Glycart

biotechnology AG, Цюрих, Швейцария).См. также, например, Ferrara C et al., (2006) Biotechnol Bioeng 93:851-861; Международная публикация № WO 07/039818; WO 12/130831; WO 99/054342; WO 03/011878; и WO 04/065540.

[00198] В определенных вариантах осуществления данного изобретения, любая из мутаций или модификаций константного участка, описанные в данном документе, может быть введены в один или обе константных участков тяжелой цепи антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, описанных в данном документе, имеющих два константных участка тяжелой цепи.

[00199] В другом конкретном варианте осуществления данного изобретения, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в данном документе, которые иммуноспецифично связываются с В7-Н4 (например, В7-Н4 человека), содержат тяжелую цепь и легкую цепь, при этом (i) тяжелая цепь содержит домен VH, содержащий аминокислотные последовательности CDR1 VH, CDR2 VL и CDR3 VL антитела, перечисленного в Таблице 1 (например, SEQ ID NO: 458-460, 35-37 или 65-67); (ii) легкая цепь содержит домен VL, содержащий аминокислотные последовательности CDR1 VL, CDR2 VH и CDR3 VH того же антитела, перечисленного в Таблице 2 (например, SEQ ID NO: 461-463, 38-40 или 68-70); (iii); и тяжелая цепь дополнительно содержит константный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность константного домена тяжелой цепи IgG1 человека (iv); легкая цепь дополнительно содержит домен константной легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность константного домена легкой цепи каппа человека.

[00200] В другом конкретном варианте осуществления данного изобретения, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в данном документе, которые иммуноспецифично связываются с В7-Н4 (например, человеческим В7-Н4), содержат тяжелую цепь и легкую цепь, при этом (i) тяжелая цепь содержит домен VH, содержащий аминокислотную последовательность антитела, указанного в Таблице 3 (например, SEQ ID NO: 464, 41 или 71); (ii) легкая цепь содержит домен VL, содержащий аминокислотную последовательность того же антитела, указанного в Таблице 4 (например, SEQ ID NO: 42 или 73); (iii); и тяжелая цепь дополнительно содержит константный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность константного домена тяжелой цепи человеческого IgG1 (iv); легкая цепь дополнительно содержит домен константной легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность константного домена легкой цепи каппа человека.

[00201] В конкретных вариантах осуществления данного изобретения, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в данном документе, которые

иммуноспецифично связываются с В7-Н4 (например, В7-Н4 человека), проявляет активность блокады Т-клеточной контрольной точки. Иллюстративные способы измерения активности блокады Т-клеточной контрольной точки представлены в примерах 7 и 11. В конкретных вариантах осуществления данного изобретения, антитело антигенсвязывающий фрагмент, описанные данном документе, которые иммуноспецифично связываются с В7-Н4 (например, В7-Н4 человека), увеличивает продукцию гамма-интерферона (ИФНү) в Т-клетках. Иллюстративные способы измерения продукции ИФНу представлены в данном документе в примерах 7 и 11. В конкретных вариантах осуществления данного изобретения, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в данном документе, которые иммуноспецифично связываются с В7-Н4 (например, В7-Н4 человека), увеличивает пролиферацию Т-клеток. Иллюстративные способы измерения пролиферации Т-клеток представлены в данном документе в Примере 7. В конкретных вариантах осуществления данного изобретения, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные В данном документе, которые иммуноспецифично связываются с В7-Н4 (например, В7-Н4 человека), увеличивает пролиферацию CD4+ Т-клеток. Иллюстративные способы измерения пролиферации CD4+ Т-клеток представлены в данном документе в Примере 7. В конкретных вариантах осуществления данного изобретения, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в данном документе, которые иммуноспецифично связываются с В7-Н4 (например, В7-Н4 человека), увеличивает пролиферацию CD8+ Т-клеток. Иллюстративные способы измерения пролиферации CD8+ Т-клеток представлены в данном документе в Примере 7.

[00202] В конкретных вариантах осуществления данного изобретения, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные данном документе, которые иммуноспецифично связываются с В7-Н4 (например, В7-Н4 человека), проявляет активность антителозависимой клеточной цитотоксичности (АЗКЦ). В конкретных вариантах осуществления данного изобретения, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в данном документе, которые иммуноспецифично связываются с В7-Н4 (например, В7-Н4 человека), проявляет активность антителозависимой клеточной цитотоксичности (АЗКЦ) в клеточных линиях с по меньшей мере 300000 молекул В7-Н4 клеточной поверхности (например, SK-BR-3 клеток). В конкретных осуществления данного изобретения, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в данном документе, которые иммуноспецифично связываются с В7-Н4 (например, В7-Н4 человека), проявляют активность антителозависимой клеточной цитотоксичности (АЗКЦ) в клеточных линиях с по меньшей мере 100000 молекул В7-Н4

клеточной поверхности (например, НСС 1569 клеток). В конкретных вариантах осуществления данного изобретения, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в данном документе, которые иммуноспецифично связываются с В7-Н4 (например, В7-Н4 человека), проявляют активность антителозависимой клеточной цитотоксичности (АЗКЦ) в клеточных линиях с по меньшей мере 50000 молекул В7-Н4 (например, ZR-75-1 клеточной поверхности клеток).В конкретных вариантах осуществления данного изобретения, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в данном документе, которые иммуноспецифично связываются с В7-Н4 (например, В7-Н4 человека), проявляют активность антителозависимой клеточной цитотоксичности (АЗКЦ) в клеточных линиях с по меньшей мере 30000 молекул В7-Н4 клеточной поверхности (например, MDA-MB-468 клеток). В конкретных вариантах осуществления данного изобретения, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в данном документе, которые иммуноспецифично связываются с В7-Н4 (например, В7-Н4 человека), проявляют активность антителозависимой клеточной цитотоксичности (АЗКЦ) в клеточных линиях с по меньшей мере 15000 молекул В7-Н4 клеточной поверхности (например, НСС1964 клеток). Иллюстративные способы измерения активности АЗКЦ представлены в данном документе в Примере 13.

[00203] В конкретных вариантах осуществления данного изобретения, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные В данном документе, которые иммуноспецифично связываются с В7-Н4 (например, В7-Н4 человека), содержат каркасные участки (например, каркасные участки домена VH и/или домена VL), которые являются каркасными участками человека или получены из каркасных участков человека. Неограничивающие примеры каркасных участков человека описаны в данной области техники, например, см. Kabat EA et al., (1991) выше. В определенном варианте осуществления данного изобретения, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в данном документе, содержат каркасные участки (например, каркасные участки домена VH и/или домена VL), которые являются каркасными участками приматов (например, приматов отличных от человека) или получены от каркасных участков приматов (например, приматов отличных от человека).

[00204] В определенных вариантах осуществления данного изобретения, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в данном документе, которые специфически связываются с В7-Н4 (например, В7-Н4 человека), содержат один, два или более каркасных участков VH (FR), имеющих аминокислотные последовательности, описанные в данном документе, для антитела, представленного в Таблице 5 выше (например, SEQ ID NO: 465, 466, 467 и/или 469; SEQ ID NO: 235, 236, 237 и/или 238; или

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

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, антитело или его [00205] антигенсвязывающий фрагмент, описанные в данном документе, которые специфически связываются с В7-Н4 (например, В7-Н4 человека), содержат каркасные участки VH (FR), имеющие по меньшей мере 70 %, по меньшей мере 75 %, по меньшей мере 80 %, по меньшей мере, 85 %, по меньшей мере 90 %, по меньшей мере 95 % или, по меньшей мере 98 % идентичности последовательностей с каркасными участками VH, описанными в данном документе в Таблице 5 выше. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в данном документе, которые специфически связываются с В7-Н4 (например, В7-Н4 человека), содержат каркасные участки VL (FR), имеющие по меньшей мере 70 %, по меньшей мере 75 %, по меньшей мере 80 %, по меньшей мере, 85 %, по меньшей мере 90 %, по меньшей мере 95 % или, по меньшей мере 98 % идентичности последовательностей с каркасными участками VL, описанными в данном документе в Таблице 6 выше. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в данном документе, которые специфически связываются с В7-Н4 (например, В7-Н4 человека), содержит каркасные участки VH (FR), имеющие по меньшей мере 70 %, по меньшей мере 75 %, по меньшей мере 80 %, по меньшей мере 85 %, по меньшей мере 90 %, по меньшей мере 95 % или по меньшей мере 98 % идентичности последовательности с каркасными участками VH, описанными в данном документе Таблице 5, выше, и

каркасные участки VL (FR), имеющие по меньшей мере 70 %, по меньшей мере 75 %, по меньшей мере 80 %, по меньшей мере 85 %, по меньшей мере 90 %, по меньшей мере 95 % или по меньшей мере 98 % идентичности последовательности с каркасными участками VL, описанными в данном документе Таблице 6, выше.

[00206] В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанный данном документе, которое иммуноспецифично связывается с B7-H4 (например, B7-H4 человека), содержит домен VH, имеющий по меньшей мере 70 %, по меньшей мере 75 %, по меньшей мере 80 % по меньшей мере 85 %, по меньшей мере 90 %, по меньшей мере 95 % или по меньшей мере 98 % идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью домена VH 20502 или 22213 (например, SEQ ID NO: 464 или 71), при этом антитело содержит CDR VH, которые идентичны CDR VH 20502 или 22213 (например, SEQ ID NO: 458-460 или 65-67). В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, антитело или его [00207] антигенсвязывающий фрагмент, описанный В данном документе, иммуноспецифично связывается с B7-H4 (например, B7-H4 человека), содержит домен VL, имеющий по меньшей мере 70 %, по меньшей мере 75 %, по меньшей мере 80 % по меньшей мере 85 %, по меньшей мере 90 %, по меньшей мере 95 % или по меньшей мере 98 % идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью домена VL 20502 или 22213 (например, SEQ ID NO: 42 или 72), при этом антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит CDR VL, которые идентичны CDR VL 20502 или 22213 (например, SEQ ID NO: 461-463 или 68-70).

В определенных вариантах осуществления данного изобретения, антитело или [00208] антигенсвязывающий фрагмент, описанные в данном документе, иммуноспецифично связываются с В7-Н4 (например, В7-Н4 человека), содержат: (і) домен VH, имеющий по меньшей мере 70 %, по меньшей мере 75 %, по меньшей мере 80 %, по меньшей мере 85 %, по меньшей мере 90 %, по меньшей мере 95 % или по меньшей мере 98 % идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью домен VH 20502 или 22213 (например, SEQ ID NO: 464 или 71); и (ii) домен VL, имеющий по меньшей мере 70 %, по меньшей мере 75 %, по меньшей мере 80 %, по меньшей мере 85 %, по меньшей мере 90 %, по меньшей мере 95 % или по меньшей мере 98 % идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью домена VL 20502 или 22213 (например, SEQ ID NO: 42 или 72), при этом антитело содержит CDR VH и CDR VL, которые идентичны CDR VH и CDR VL 20502 или 22213 (например, SEQ ID NO: 458-463 или SEQ ID NO: 65-70).

[00209] В другом аспекте в данном документе представлены антитела или их

антигенсвязывающие фрагменты, которые связывают тот же эпитоп В7-Н4 (например, эпитоп В7-Н4 человека), что и антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанный в данном документе (например, 20502 или 22213).

[00210] В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанный в данном документе, которое иммуноспецифично связывается с В7-Н4 (например, В7-Н4 человека), содержит домен VH, имеющий по меньшей мере 70 %, по меньшей мере 75 %, по меньшей мере 80 % по меньшей мере 85 %, по меньшей мере 90 %, по меньшей мере 95 % или по меньшей мере 98 % идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью домена VH 20502.1 или 22213 (например, SEQ ID NO: 41 или 71), при этом антитело содержит CDR VH, которые идентичны CDR VH 20502.1 или 22213 (например, SEQ ID NO:35-37 или 65-67).

[00211] В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанный в данном документе, которое иммуноспецифично связывается с В7-Н4 (например, В7-Н4 человека), содержит домен VL, имеющий по меньшей мере 70 %, по меньшей мере 75 %, по меньшей мере 80 % по меньшей мере 85 %, по меньшей мере 90 %, по меньшей мере 95 % или по меньшей мере 98 % идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью домена VL 20502.1 или 22213 (например, SEQ ID NO: 42 или 72), при этом антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит CDR VL, которые идентичны CDR VL 20502.1 или 22213 (например, SEQ ID NO: 38-40 или 68-70).

[00212] В определенных вариантах осуществления данного изобретения, антитело или антигенсвязывающий фрагмент, описанные в данном документе, иммуноспецифично связываются с В7-Н4 (например, В7-Н4 человека), содержат: (і) домен VH, имеющий по меньшей мере 70 %, по меньшей мере 75 %, по меньшей мере 80 %, по меньшей мере 85 %, по меньшей мере 90 %, по меньшей мере 95 % или по меньшей мере 98 % идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью домен VH 20502.1 или 22213 (например, SEQ ID NO: 41 или 71); и (ii) домен VL, имеющий по меньшей мере 70 %, по меньшей мере 75 %, по меньшей мере 80 %, по меньшей мере 85 %, по меньшей мере 90 %, по меньшей мере 95 % или по меньшей мере 98 % идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью домена VL 20502.1 или 22213 (например, SEQ ID NO: 42 или 72), при этом антитело содержит CDR VH и CDR VL, которые идентичны CDR VH и CDR VL 20502.1 или 22213 (например, SEQ ID NO: 35-40 или SEQ ID NO: 65-70).

[00213] В другом аспекте в данном документе представлены антитела или их

антигенсвязывающие фрагменты, которые связывают тот же эпитоп B7-H4 (например, эпитоп B7-H4 человека), что и антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанный в данном документе (например, 20502.1 или 22213).

Анализы конкурентного связывания можно использовать для определения того, связываются ли два антитела с перекрывающимися эпитопами. Конкурентное связывание может быть определено в анализе, в котором тестируемый иммуноглобулин ингибирует специфическое связывание эталонного антитела с общим антигеном, таким как В7-Н4. Известны многочисленные типы анализов конкурентного связывания, например: твердофазный прямой или непрямой радиоиммуноанализ (РИА), твердофазный прямой или непрямой иммуноферментный анализ (ИФА), анализ сэндвич-конкуренции (см. Stahli C et al., (1983) Methods Enzymol 9:242-253); твердофазный прямой биотин-авидин ИФА (см. Kirkland TN et al., (1986) J Immunol 137:3614-9); твердофазный прямой меченый анализ, твердофазный прямой меченый сэндвич-анализ (см. Harlow E & Lane D, (1988). Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press); твердофазный РИА с прямой меткой с использованием метки I-125 (см. Morel GA et al., (1988) Mol Immunol 25 (1):7-15); твердофазный прямой биотин-авидин ИФА (Cheung RC et al., (1990) Virology 176:546-52); и РИА с прямой меткой.(Moldenhauer G et al., (1990) Scand J Immunol 32:77-82). Как правило, такой анализ включает использование очищенного антигена (например, В7-Н4, такого как В7-Н4 человека), связанного с твердой поверхностью, или клеток, несущих любой немеченый тестовый иммуноглобулин и меченый эталонный иммуноглобулин. Конкурентное ингибирование может быть измерено путем определения количества метки, связанной с твердой поверхностью или клетками в присутствии тестируемого иммуноглобулина. Обычно тестируемый иммуноглобулин присутствует в избытке. Обычно, когда конкурирующее антитело присутствует в избытке, оно будет ингибировать специфическое связывание эталонного антитела с общим антигеном по меньшей мере на 50-55 %, 55-60 %, 60-65 %, 65-70 %, 70-75 % или больше. Анализ конкурентного связывания может быть сконфигурирован в большом количестве различных форматов с использованием либо меченого антигена, либо меченого антитела. В обычной версии этого анализа антиген иммобилизован на 96-луночном планшете. Способность немеченых антител блокировать связывание меченых антител с антигеном затем измеряют с использованием радиоактивных или ферментных меток. Для получения дополнительной информации см., например, Wagener C et al., (1983) J Immunol 130:2308-2315; Wagener C et al., (1984) J Immunol Methods 68:269-274; Kuroki M et al., (1990) Cancer Res 50:4872-4879; Kuroki M et al., (1992) Immunol Invest 21:523-538; Kuroki M et al., (1992) Hybridoma 11:391-407 и Antibodies: A Laboratory Manual, Ed Harlow E & Lane D editors supra, pp. 386-389.

[00215] В одном варианте осуществления данного изобретения, конкурентный анализ проводят с использованием поверхностного плазмонного резонанса (BIAcore®), например, с использованием «тандемного подхода», такого как описанный в Abdiche YN et al., (2009) Analytical Biochem 386:172-180, в результате чего антиген B7-H4 иммобилизуется на поверхности чипа, например, сенсорный чип CM5 и анти-B7-H4 антитело затем прогоняют через чип. Чтобы определить, конкурирует ли антитело или его антигенсвязывающий фрагмент с анти-B7-H4 антителом, описанным в данном документе, анти-B7-H4 антитело сначала наносят на поверхность чипа для достижения насыщения, а затем добавляют потенциальное конкурирующее антитело. Связывание конкурирующего антитела или его антигенсвязывающего фрагмента может быть затем определено и количественно определено относительно неконкурентного контроля.

[00216] В одном варианте осуществления данного изобретения, конкурентное связывание Fortebio Octet (например, как описано в Примере 2 ниже) используется для определения того, что антитело B7-H4 или его антигенсвязывающий фрагмент конкурентно ингибируют связывание другого антитела B7-H4 или его антигенсвязывающего фрагмента с B7-H4.

[00217] В другом аспекте в данном документе представлены антитела, которые конкурентно ингибируют (например, в зависимости от дозы) антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в данном документе (например, 20502, 20502.1 или 22213), от связывания с В7-Н4 (например, В7-Н4 человека), как определено с использованием анализов, известных специалисту в данной области техники или описанных в данном документе (например, конкурентные анализы ИФА или анализ массива суспензий или поверхностного плазмонного резонанса).

[00218] В конкретных аспектах в данном документе представлено антитело или антигенсвязывающий фрагмент, который конкурентно ингибирует (например, в зависимости от дозы) связывание с В7-Н4 (например, В7-Н4 человека) антитела, содержащего домен VH, имеющий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 464, и домен VL, имеющий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 42.

[00219] В конкретных аспектах в данном документе представлено антитело или антигенсвязывающий фрагмент, который конкурентно ингибирует (например, в зависимости от дозы) связывание с В7-Н4 (например, В7-Н4 человека) антитела, содержащего домен VH, имеющий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 41, и домен VL, имеющий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 42.

[00220] В конкретных аспектах в данном документе представлено антитело или антигенсвязывающий фрагмент, который конкурентно ингибирует (например, в зависимости от дозы) связывание с В7-Н4 (например, В7-Н4 человека) антитела, содержащего домен VH, имеющий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 71, и домен VL, имеющий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 72.

[00221] В конкретных аспектах в данном документе представлено антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который конкурентно ингибирует (например, в зависимости от дозы) связывание с B7-H4 (например, B7-H4 человека), причем антитело содержит (i) домен VH, содержащий CDR1 VH, CDR2 VH и CDR3 VH, имеющие аминокислотные последовательности CDR VH, перечисленные в Таблице 1; и (ii) домен VL, содержащий CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL, имеющие аминокислотные последовательности CDR, перечисленные в Таблице 2.

[00222] В конкретных аспектах в данном документе представлено антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который иммуноспецифично связывается с тем же эпитопом В7-Н4 (например, В7-Н4 человека), что и эпитоп 20502, 20502.1 или 22213.

[00223] В другом конкретном варианте осуществления данного изобретения, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанный в данном документе, иммуноспецифично связывается с тем же эпитопом B7-H4 (например, B7-H4 человека), что и антитело, содержащее (i) домен VH, содержащий CDR1 VH, CDR2 VH и CDR3 VH, имеющие аминокислотные последовательности CDR, перечисленных в Таблице 1, и (ii) домен VL, содержащий CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL, имеющий аминокислотные последовательности CDR, перечисленные в Таблице 2.

[00224] В конкретном аспекте описанный в данном документе антигенсвязывающий фрагмент, который иммуноспецифически связывается с В7-Н4 (например, В7-Н4 человека), выбран из группы, состоящей из Fab, Fab', F(ab')2, и scFv, где Fab, Fab', F(ab')2 или scFv содержат последовательность вариабельного участка тяжелой цепи и последовательность вариабельного участка легкой цепи анти-В7-Н4 антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, как описано в данном документе. Fab, Fab', F(ab')2 или scFv могут быть получены любым способом, известным специалистам в данной области техники, включая, но не ограничиваясь этим, рассмотренный в разделе 5.3 ниже. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, Fab, Fab', F(ab')2 или scFv дополнительно содержат фрагмент, который продлевает период полужизни антитела *in vivo*. Фрагмент также называют «фрагмент, продлевающий период полужизни». Может быть использован любой фрагмент, известный специалистам в данной области техники, для продления периода

полужизни Fab, Fab', F(ab')2 или scFv in vivo. Например, фрагмент, продлевающий период полужизни, может включать Fc-участок, полимер, альбумин или белок, связывающий альбумин, или соединение. Полимер может содержать природный или синтетический, необязательно замещенный прямой или разветвленный полиалкилен, полиалкенилен, полиоксилалкилен, полисахарид, полиэтиленгликоль, полипропиленгликоль, поливиниловый спирт, метоксиполиэтиленгликоль, лактозу, амилозу, декстран, гликоген или их производное. Заместители могут включать одну или более гидрокси, метил или метоксигрупп. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, Fab, Fab', F(ab')2 или scFv могут быть модифицированы путем добавления одной или более Саминокислот для присоединения фрагмента, увеличивающего период концевых полужизни. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, фрагмент, увеличивающий период полужизни представляет собой полиэтиленгликоль человеческий сывороточный альбумин. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, Fab, Fab', F(ab')2 или scFv сливаются с Fc участком.

[00225] Анти-В7-Н4 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент могут быть слиты или конъюгированы (например, ковалентно или нековалентно связаны) с детектируемой меткой или веществом. Примеры обнаруживаемых меток или веществ включают ферментные метки, такие как глюкозооксидаза; радиоизотопы, такие как йод (125І, 121І), углерод (14С), сера (35Ѕ), тритий (3Н), индий (121Іп) и технеций (99Тс); люминесцентные метки, такие как люминол; и флуоресцентные метки, такие как флуоресцеин и родамин, и биотин. Такие меченые антитела или их антигенсвязывающие фрагменты можно использовать для обнаружения белка В7-Н4 (например, В7-Н4 человека). См., например, раздел 5.5.2, ниже.

[00226] Производство антител

[00227] Антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые иммуноспецифически связываются с В7-Н4 (например, В7-Н4 человека), могут быть получены любым способом, известным в данной области техники, для синтеза антител и их антигенсвязывающих фрагментов, например, химическим синтезом или методами рекомбинантной экспрессии. Способы, описанные в данном документе, используют, если не указано иное, общепринятые способы в области молекулярной биологии, микробиологии, генетического анализа, рекомбинантной ДНК, органической химии, биохимии, ПЦР, синтеза и модификации олигонуклеотидов, гибридизации нуклеиновых кислот и смежных областей техники. Эти методики описаны, например, в ссылках, цитируемых в данном документе, и полностью объяснены в литературе. См., например, Sambrook J et al., (2001) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY;

Ausubel FM et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons (1987 and annual updates); Current Protocols in Immunology, John Wiley & Sons (1987 and annual updates) Gait (ed.)(1984) Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach, IRL Press; Eckstein (ed.)(1991) Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach, IRL Press; Birren B et al., (eds.)(1999) Genome Analysis: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press.

В определенном аспекте в данном документе предлагается способ получения [00228] который иммуноспецифически антитела антигенсвязывающего фрагмента, связывается с В7-Н4 (например, В7-Н4 человека), включающий культивирование клетки или клетки-хозяина, описанных в данном документе. В определенном аспекте в данном документе предлагается способ получения антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, который иммуноспецифически связывается с В7-Н4 (например, В7-Н4 человека), включающий экспрессию (например, рекомбинантную экспрессию) антитела или антигенсвязывающего фрагмента с использованием клетки или клетки-хозяина, описанных в данном документе (например, клетки или клетки-хозяина, содержащих полинуклеотиды, кодирующие антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в данном документе). В конкретном варианте осуществления данного документа, клетка представляет собой выделенную клетку. В конкретном варианте осуществления данного документа, экзогенные полинуклеотиды были введены в клетку. В конкретном варианте осуществления данного документа, способ дополнительно включает стадию очистки антитела или антигенсвязывающего фрагмента, полученного из клетки или клетки-хозяина.

[00229] Способы получения поликлональных антител известны в данной области техники (см., например, главу 11 в: Short Protocols in Molecular Biology, (2002) 5th Ed., Ausubel FM et al., eds., John Wiley and Sons, Нью Йорк).

[00230] Моноклональные антитела или их антигенсвязывающие фрагменты могут быть получены с использованием широкого спектра методов, известных в данной области техники, включая использование гибридомных, рекомбинантных и фаговых технологий отображения, технологий презентации на основе дрожжей или их комбинации. Например, моноклональные антитела или их антигенсвязывающие фрагменты могут быть получены с использованием гибридомных методов, включая те, которые известны в данной области техники и описаны, например, в Harlow E & Lane D, Antibodies: A Laboratory Manual, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. 1988); Hammerling GJ et al., in: Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas 563 681 (Elsevier, N.Y., 1981), или как описано в Kohler G & Milstein C (1975) Nature 256:495. Примеры способов презентации на основе дрожжей, которые можно использовать для отбора и генерирования антител, описанных в данном документе,

включают способы, описанные, например, в WO 2009/036379A2; WO2010/105256; и WO2012/009568, каждый из которых включен в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

В конкретных вариантах осуществления данного изобретения, моноклональное [00231] антитело или антигенсвязывающий фрагмент представляет собой антитело или антигенсвязывающий фрагмент, продуцируемый клональной клеткой (например, гибридомой или клеткой-хозяином, продуцирующим рекомбинантное антитело или антигенсвязывающий фрагмент), при этом антитело или антигенсвязывающий фрагмент иммуноспецифически связываются с В7-Н4 (например, В7-Н4 человека), как определено, например, с помощью ИФА или других антигенсвязывающих анализов, известных в данной области техники или в примерах, представленных в данном документе. В конкретных вариантах осуществления данного изобретения, моноклональное антитело или его собой антигенсвязывающий фрагмент может представлять химерное или гуманизированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент может быть фрагментом Fab или фрагментом F(ab')2. Моноклональные антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, описанные в данном документе, могут, например, быть получены гибридомным способом, как описано в Kohler G & Milstein C (1975) Nature 256:495 или могут быть, например, выделены из фаговых библиотек, например, с использованием описанных в данном документе методик. Другие способы получения линий экспрессируемых клональных клеточных И моноклональных антител и их антигенсвязывающих фрагментов хорошо известны в данной области техники (см., например, главу 11 в: Short Protocols in Molecular Biology, (2002) 5th Ed., Ausubel FM et al., выше).

[00232] Описанные в данном документе антигенсвязывающие фрагменты антител могут быть получены любым способом, известным специалистам в данной области техники. Например, описанные в данном документе фрагменты Fab и F(ab')2 могут быть получены путем протеолитического расщепления молекул иммуноглобулина с использованием ферментов, таких как папаин (для получения фрагментов Fab) или пепсин (для получения фрагментов F(ab')2). Фрагмент Fab соответствует одному из двух идентичных плеч молекулы тетрамерного антитела и содержит полную легкую цепь в паре с доменами VH и СН1 тяжелой цепи. Фрагмент F(ab')2 содержит два антигенсвязывающих плеча молекулы тетрамерного антитела, связанных дисульфидными связями в шарнирном участке.

[00233] Кроме того, антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, описанные в данном документе, также могут быть получены с использованием различных методов

фагового дисплея и/или дрожжевого представления, известных в данной области. В способах фагового дисплея белки отображаются на поверхности частиц фага, которые кодирующие их полинуклеотидные последовательности. последовательности ДНК, кодирующие домены VH и VL, амплифицируются из библиотек кДНК животных (например, пораженных тканей библиотек кДНК человека или мыши). ДНК, кодирующая домены VH и VL, рекомбинируется вместе с линкером scFv с помощью ПЦР и клонируется в фагмидный вектор. Вектор электропорируется в E. coli, и E. coli инфицируется хэлперным фагом. Фаг, используемый в этих способах, обычно представляет собой нитевидный фаг, включая fd и M13, и домены VH и VL обычно рекомбинантно сливаются с геном III или геном VIII фага. Фаг, экспрессирующий антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с конкретным антигеном, может быть выбран или идентифицирован с антигеном, например, с использованием меченого антигена или антигена, связанного или захваченного на твердой поверхности или грануле. Примеры способов фагового дисплея, которые можно использовать для получения антител или фрагментов, описанных в данном документе, включают способы, описанные в Brinkman U et al., (1995) J. Immunol Methods 182:41-50; Ames RS et al., (1995) J Immunol Methods 184:177-186; Kettleborough CA et al., (1994) Eur J Immunol 24:952-958; Persic L et al., (1997) Gene 187:9-18; Burton DR & Barbas CF (1994) Advan Immunol 57:191-280; заявка PCT № PCT/GB91/001134; Международные публикации № WO 90/02809, WO 91/10737, WO 92/01047, WO 92/18619, WO 93/1 1236, WO 95/15982, WO 95/20401 и WO 97/13844; и пат. США№ 5698426, 5223409, 5403484, 5580717, 5427908, 5750753, 5821047, 5571698, 5427908, 5516637, 5780225, 5658727, 5733743 и 5969108.

[00234] Гуманизированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент могут быть выбраны из любого класса иммуноглобулинов, включая IgM, IgG, IgD, IgA и IgE, и любого изотипа, включая IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4.

## 1.2.1 Полинуклеотиды

[00235] В определенных аспектах в данном документе представлены полинуклеотиды, содержащие нуклеотидную последовательность, кодирующую антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанный в данном документе, или его домен (например, вариабельный участок легкой цепи и/или вариабельный участок тяжелой цепи), который иммуноспецифично связывается с В7-Н4 антигеном (например, В7-Н4 человека), и векторы, например, векторы, содержащие такие полинуклеотиды для рекомбинантной экспрессии в клетках-хозяевах (например, в клетках *E.coli* и млекопитающих).

[00236] В конкретных аспектах в данном документе представлены полинуклеотиды,

содержащие нуклеотидные последовательности, кодирующие антитела ИЛИ ИХ антигенсвязывающие фрагменты, которые иммуноспецифично связываются полипептидом В7-Н4 (например, В7-Н4 человека) и содержат аминокислотную как описано в данном документе, а также антитела или последовательность, антигенсвязывающие фрагменты, которые конкурируют с такими антителами или антигенсвязывающими фрагментами за связывание с полипептидом В7-Н4 (например, в зависимости от дозы), или которые связываются с тем же эпитопом, что и эпитоп такого антитела или антигенсвязующих фрагментов.

[00237] В данном документе также представлен полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид, содержащий последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 11, 12, 21, 22, 31, 32, 41, 464, 42, 51, 52, 61, 62, 71, 72, 81, 82, 91, 92, 101, 102, 111, 112, 121, 122, 131, 132, 141, 142, 151, 152, 161, 162, 171, 172, 181, 182, 191, 192, 201 и 202.В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащий полипептид, иммуноспецифично связываются с В7-Н4.

[00238] В данном документе также представлен полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид, содержащий последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 13, 14, 23, 24, 33, 34, 43, 469, 44, 53, 54, 63, 64, 73, 74, 83, 84, 93, 94, 103, 104, 113, 114, 123, 124, 133, 134, 143, 144, 153, 154, 163, 164, 173, 174, 183, 184, 193, 194, 203 и 204.В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащий полипептид, иммуноспецифично связываются с В7-Н4.

[00239] В данном документе также представлены полинуклеотиды, содержащие нуклеотидную последовательность, кодирующую вариабельную тяжелую цепь, показанную в Таблице 9, например, при этом антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие кодированную вариабельную тяжелую цепь, связываются с В7-Н4.

 Таблица
 9: Полинуклеотидные последовательности, кодирующие вариабельную тяжелую цепь

Антитело	Полинуклеотидные	последовательности,	кодирующие
	вариабельную тяжелуі	ю цепь (SEQ ID NO)	
15461	CAGCTGCAGCTGCAGGAG	TCGGGCCCAGGACTGGT	GAAGCCTTCG
	GAGACCCTGTCCCTCACCT	TGCACTGTCTCTGGTGGC	TCCATCAGCA
	GTAGTAGTTACTACTGGGG	GCTGGATCCGCCAGCCC	CCAGGGAAGG
	GGCTGGAGTGGATTGGGA	ACATCTATTATAGTGGG	AGCACCTACT

	ACAACCCGTCCCTCAAGAGTCGAGTCACCATATCCGTAGACACGT
	CCAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGTTCTGTGACCGCCGCAG
	ACACGGCGGTGTACTACTGCGCCAGAGAAGGATCTTACCCCAATT
	GGTTTGATCCATGGGGACAGGGTACATTGGTCACCGTCTCCTCA
	(SEQ ID NO:213)
20500	CAGCTGCAGCAGGAGTCGGGCCCAGGACTGGTGAAGCCTTCG
	GAGACCCTGTCCCTCACCTGCACTGTCTCTGGTGGCTCCATCAAGA
	GTGGTAGTCACTACTGGGGCTGGATCCGCCAGCCCCCAGGGAAGG
	GGCTGGAGTGGAATTGGGAACATCTATTATAGTGGGAGCACCTACT
	ACAACCCGTCCCTCAGGAGTCGAGTCACCATATCCGTAGACACGT
	CCAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGTTCTGTGACCGCCGCAG
	ACACGGCGGTGTACTACTGCGCCAGGGAAGGATCTTACCCCAATT
	GGTTTGATCCATGGGGACAGGGTACATTGGTCACCGTCTCCTCA
	(SEQ ID NO:223)
20501	CAGCTGCAGCAGGAGTCGGGCCCAGGACTGGTGAAGCCTTCG
	GAGACCCTGTCCCTCACCTGCACTGTCTCTGGTGGCTCCATCAAGA
	GTGGTAGTCACTACTGGGGCTGGATCCGCCAGCCCCCAGGGAAGG
	GGCTGGAGTGGAATTGGGAACATCTATTATAGTGGGAGCACCTACT
	ACAACCCGTCCCTCAAGAGTCGAGTCACCATATCCGTAGACACGT
	CCAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGTTCTGTGACCGCCGCAG
	ACACGGCGGTGTACTACTGCGCCAGAGAAGGATCTTACCCCAATT
	GGTTGGATCCATGGGGACAGGGTACATTGGTCACCGTCTCCTCA
	(SEQ ID NO:233)
20502	CAGCTGCAGCAGGAGTCGGGCCCAGGACTGGTGAAGCCTTCG
	GAGACCCTGTCCCTCACCTGCACTGTCTCTGGTGGCTCCATCAAAA
	GTGGTAGTTACTACTGGGGCTGGATCCGCCAGCCCCCAGGGAAGG
	GGCTGGAGTGGAATTGGGAACATCTATTATAGTGGGAGCACCTACT
	ACAACCCGTCCCTCAGAAGTCGAGTCACCATATCCGTAGACACGT
	CCAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGTTCTGTGACCGCCGCAG
	ACACGGCGGTGTACTACTGCGCCAGAGAAGGATCTTACCCCAATC
	AGTTTGATCCATGGGGACAGGGTACATTGGTCACCGTCTCCTCA
	(SEQ ID NO:470)
20502,1	CAGCTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCCAGGACTGGTGAAGCCTTCG
	GAGACCCTGTCCCTCACCTGCACTGTCTCTGGTGGCTCCATCAAGA
	GTGGTAGTTACTACTGGGGCTGGATCCGCCAGCCCCCAGGGAAGG
	I

	GGCTGGAGTGGATTGGGAACATCTATTATAGTGGGAGCACCTACT
	ACAACCCGTCCCTCAAGAGTCGAGTCACCATATCCGTAGACACGT
	CCAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGTTCTGTGACCGCCGCAG
	ACACGGCGGTGTACTACTGCGCCAGAGAAGGATCTTACCCCAATC
	AGTTTGATCCATGGGGACAGGGTATATTGGTCACCGTCTCCTCA
	(SEQ ID NO:243)
22208	CAGCTGCAGCAGGAGTCGGGCCCAGGACTGGTGAAGCCTTCG
	GAGACCCTGTCCCTCACCTGCACTGTCTCTGGTGGCTCCATCAAGA
	GTGGTAGTCACTACTGGGGCTGGATCCGCCAGCCCCCAGGGAAGG
	GGCTGGAGTGGATTGGGAACATCTATTATAGTGGGAGCACCTACT
	ACAACCCGTCCCTCAAGAGTCGAGTCACCATGTCCGTAGACACGT
	CCAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGTTCTGTGACCGCCGCAG
	ACACGGCGGTGTACTACTGCGCCAGAGAAGGATCTTACCCCAATT
	GGTTTGATCCATGGGGACAGGGTACATTGGTCACCGTCTCCTCA
	(SEQ ID NO:253)
15462	CAGCTGCAGCAGGAGTCGGGCCCAGGACTGGTGAAGCCTTCG
	GAGACCCTGTCCCTCACCTGCACTGTCTCTGGTGGCTCCATCAGCA
	GTAGTAGTTACTACTGGGGCTGGATCCGCCAGCCCCCAGGGAAGG
	GGCTGGAGTGGATTGGGAACATCTATTATAGTGGGAGCACCTACT
	ACAACCCGTCCCTCAAGAGTCGAGTCACCATATCCGTAGACACGT
	CCAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGTTCTGTGACCGCCGCAG
	ACACGGCGGTGTACTACTGCGCCAGAGAAGGATCTTACACAACCG
	TGTTAAACGTATGGGGTCAGGGTACAATGGTCACCGTCTCCTCA
	(SEQ ID NO:263)
22213	CAGCTGCAGCAGGAGTCGGGCCCAGGACTGGTGAAGCCTTCG
	GAGACCCTGTCCCTCACCTGCACTGTCTCTGGTGGCTCCATCGGGA
	GGGGGAGTTACTACTGGGGCTGGATCCGCCAGCCCCCAGGGAAG
	GGGCTGGAGTGGAATTGGGAACATCTATTATAGTGGGAGCACCTAC
	TACAACCCGTCCCTCAAGAGTCGAGTCACCATATCCGTAGACACG
	TCCAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGTTCTGTGACCGCCGCA
	GACACGGCGGTGTACTACTGCGCCAGAGAAGGATCTTACACAACC
	GTGTTAAACGTATGGGGTCAGGGTACAATGGTCACCGTCTCCTCA
	(SEQ ID NO:273)
15465	CAGGTGCAGCAGGAGTCGGGCCCAGGACTGGTGAAGCCTTCA
	CAGACCCTGTCCCTCACCTGTACTGTCTCTGGTGGCTCCATCAGCA

	GTGGTGGTTACTACTGGAGCTGGATCCGCCAGCACCCAGGGAAGG
	GCCTGGAGTGGAACATCTATTACAGTGGGAGCACCTACT
	ACAACCCGTCCCTCAAGAGTCGAGTTACCATATCAGTAGACACGT
	CTAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGTTCTGTGACCGCCGCAG
	ACACGGCGGTGTACTACTGCGCCAGAGAATCTAGCACCATATCTG
	CCGACTTCGACCTATGGGGGAGAGGTACCTTGGTCACCGTCTCCT
	CA (SEQ ID NO:283)
20506	CAGCTGCAGCAGGAGTCGGGCCCAGGACTGGTGAAGCCTTCG
	GAGACCCTGTCCCTCACCTGTACTGCCTCTGGTGGCTCCATCAGCC
	ATGGTGGGTACTACTGGAGCTGGATCCGCCAGCACCCAGGGAAG
	GGCCTGGAGTGGAATTGGGAACATCTATTACAGTGGGAGCACCTAC
	TACAATCCGTCCCTCAAGAGTCGAGTTACCATGTCAGTAGACACG
	TCTAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGTTCTGTGACCGCCGCA
	GACACGGCGGTGTACTACTGCGCCAGAGAATCTAGCACCATATCT
	GCCGACTTCGACCTATGGGGGAGAGGTACCTTGGTCACCGTCTCC
	TCA (SEQ ID NO:293)
15483	CAGGTGCAGCAGGAGTCGGGCCCAGGACTGGTGAAGCCTTCA
	CAGACCCTGTCCCTCACCTGTACTGTCTCTGGTGGCTCCATCAGCA
	GTGGTGGTTACTACTGGAGCTGGATCCGCCAGCACCCAGGGAAGG
	GCCTGGAGTGGAATTGGGAACATCTATTACAGTGGGAGCACCTACT
	ACAACCCGTCCCTCAAGAGTCGAGTTACCATATCAGTAGACACGT
	CTAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGTTCTGTGACCGCCGCAG
	ACACGGCGGTGTACTACTGCGCCAGAGGGTTGAGCACCATAGACG
	AGGCATTCGACCCATGGGGACAGGGTACATTGGTCACCGTCTCCT
	CA (SEQ ID NO:303)
20513	CAGCTGCAGCAGGAGTCGGGCCCAGGACTGGTGAAGCCTTCG
	GAGACCCTGTCCCTCACCTGCACTGTCTCTGGTGGCTCCATCAGCG
	ATGGTAGTTACTACTGGAGCTGGATCCGCCAGCACCCAGGGAAGG
	GCCTGGAGTGGATTGGGAACATCTATTACAGTGGGAGCACCTACT
	ACAACCCGTCCCTCAGGAGTCGAGTTACCATGTCAGTAGACACGT
	CTAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGTTCTGTGACCGCCGCAG
	ACACGGCGGTGTACTACTGCGCCAGAGGGTTGAGCACCATAGACG
	AGGCATTCGACCCATGGGGACAGGGTACATTGGTCACCGTCTCCT
	CA (SEQ ID NO:313)
22216	CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCCAGGACTGGTGAAGCCTTCA

	CAGACCCTGTCCCTCACCTGTACTGTCTCTGGTGGCTCCATCAGCG
	ATGGTAGTTACTACTGGAGCTGGATCCGCCAGCACCCAGGGAAGG
	GCCTGGAGTGGAATTGGGAACATCTATTACAGTGGGAGCACCTACT
	ACAACCCGTCCCTCAGGAGTCGAGTTACCATGTCAGTAGACACGT
	CTAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGTTCTGTGACCGCCGCAG
	ACACGGCGGTGTACTACTGCGCCAGAGGGTTGAGCACCATAGACG
	AGGCATTCGACCCATGGGGACAGGGTACATTGGTCACCGTCTCCT
	CA (SEQ ID NO:323)
15489	CAGGTGCAGCAGGAGTCGGGGCCCAGGACTGGTGAAGCCTTCG
	GAGACCCTGTCCCTCACCTGCACTGTCTCTGGTGGCTCCATCAGTA
	GTTACTACTGGAGCTGGATCCGGCAGCCCCCAGGGAAGGGACTGG
	AGTGGATTGGGTATATCTATAGTAGTGGGAGCACCAACTACAACC
	CCTCCCTCAAGAGTCGAGTCACCATATCAGTAGACACGTCCAAGA
	ACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGTTCTGTGACCGCCGCAGACACGG
	CGGTGTACTACTGCGCCAGAGGCTCTGGACAGTATGCAGCTCCTG
	ATTATGGAATGGACGTATGGGGCCAGGGAACAACTGTCACCGTCT
	CCTCA (SEQ ID NO:333)
20516	CAGGTGCAGCAGGAGTCGGGCCCAGGACTGGTGAAGCCTTCG
	GAGACCCTGTCCCTCACCTGCACTGTCTCTGGTGGCTCCATCATTA
	GTTACTACTGGGGGTGGATCCGGCAGCCCCCAGGGAAGGGACTG
	GAGTGGATTGGGTATATCTATTCTAGTGGGAGCACCTCGTACAAC
	CCCTCCCTCAAGAGTCGAGTCACCATATCAGTAGACACGTCCAAG
	AACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGTTCTGTGACCGCCGCAGACACG
	GCGGTGTACTACTGCGCCAGAGGCTCTGGACTGTATGCAGCTCCT
	GATTATGGACTTGACGTATGGGGTCAGGGAACAACTGTCACCGTC
	TCCTCA (SEQ ID NO:343)
15472	GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGG
	GGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACCTTTAGCA
	GCTATGCCATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGG
	AGTGGGTCTCAACCATTAGTGGTAGTGGTGGTAGCACATACTACG
	CAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCAGAGACAATTCCA
	AGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGAC
	ACGGCGGTGTACTACTGCGCCAGAGGTGCCGGACACTACGACCTC
	GTCGGACGATACTGGGGACAGGGTACATTGGTCACCGTCTCCTCA
	(SEQ ID NO:353)
L	l .

15503	GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGG
	GGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACCTTTAGCA
	GCTATGCCATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGG
	AGTGGGTCTCAGCTATTAGTGGTAGTGGTGGTAGCACATACTACG
	CAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCAGAGACAATTCCA
	AGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGAC
	ACGGCGGTGTACTACTGCGCCAGAGTGGGATTCAGAGCATTAAAC
	TACTGGGGACAGGGTACAACTGTCACCGTCTCCTCA (SEQ ID
	NO:363)
15495	CAGGTGCAGCTGGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGG
	GTCCTCGGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGAGGCACCTTCAG
	CAGCTATGCTATCAGCTGGGTGCGACAGGCCCCTGGACAAGGGCT
	TGAGTGGATGGGAGGATCATCCCTATCTTTGGTACAGCAAGCTA
	CGCACAGAAGTTCCAGGGCAGAGTCACGATTACCGCGGACGAAT
	CCACGAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAG
	GACACGGCGGTGTACTACTGCGCAAGACAGCAATACGACGGTAG
	ACGATACTTCGGCCTATGGGGGAGAGGTACCTTGGTCACCGTCTC
	CTCA (SEQ ID NO:373)
15478	CAGGTGCAGCTGGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGG
	GTCCTCGGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGAGGCACCTTCAG
	CAGCTATGCTATCAGCTGGGTGCGACAGGCCCCTGGACAAGGGCT
	TGAGTGGATGGGAGGGATCATCCCTATCTTTGGTACAGCAAACTA
	CGCACAGAAGTTCCAGGGCAGAGTCACGATTACCGCGGACGAAT
	CCACGAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAG
	GACACGGCGGTGTACTACTGCGCCAGAGGTGGGCCTTGGTTTGAT
	CCATGGGGACAGGGTACATTGGTCACCGTCTCCTCA (SEQ ID
	NO:383)
15441	GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGG
	GGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACCTTTAGCA
	GCTATGCCATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGG
	AGTGGGTCTCAGCTATTAGTGGTAGTGGTGGTAGCACATCCTACG
	CAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCAGAGACAATTCCA
	AGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGAC
	ACGGCGGTGTACTACTGCGCCAAGCCTTCTTTGGCAACAATGTTA
	GCCTTCGATATCTGGGGTCAGGGTACAATGGTCACCGTCTCCTCA

	(SEQ ID NO:393)
20496	CAGCTGCAGCAGGAGTCGGGCCCAGGACTGGTGAAGCCTTCG
	GAGACCCTGTCCCTCACCTGCACTGTCTCTGGTGGCTCCATCAGCA
	GTAGTGTTTACTACTGGAGTTGGATCCGCCAGCCCCCAGGGAAGG
	GGTTGGAGTGGAGTTGGGAGTATCCTGGTGAGTGGGAGCACCTACT
	ACAACCCGTCCCTCAAGAGTCGAGTCACCATATCCGTAGACACGT
	CCAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGTTCTGTGACCGCCGCAG
	ACACGGCGGTGTACTACTGCGCCAGAGCTGTATCCTTCTTAGACG
	TATGGGGTCAGGGTACAATGGTCATCGTCTCCTCA (SEQ ID
	NO:403)

[00240] В данном документе также представлены полинуклеотиды, содержащие нуклеотидную последовательность, кодирующую вариабельную легкую цепь, показанную в Таблице 10, например, при этом антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие кодированную вариабельную легкую цепь, связываются с В7-Н4.

 Таблица 10: Полинуклеотидные последовательности, кодирующие вариабельную легкую цепь

Антитело	Полинуклеотидные последовательности, кодирующие
	вариабельную легкую цепь (SEQ ID NO)
15461	GAAATAGTGATGACGCAGTCTCCAGCCACCCTGTCTGTGTCTCCA
	GGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAG
	CAGCAACTTAGCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCA
	GGCTCCTCATCTATGGTGCATCCACCAGGGCCACTGGTATCCCAG
	CCAGGTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGAGTTCACTCTCACC
	ATCAGCAGCCTGCAGTCTGAAGATTTTGCAGTTTATTACTGTCAG
	CAGTACCACTCCTTCCCTTTCACTTTTGGCGGAGGGACCAAGGTT
	GAGATCAAA (SEQ ID NO:214)
20500	GAAATAGTGATGACGCAGTCTCCAGCCACCCTGTCTGTGTCTCCA
	GGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAG
	CAGCAACTTAGCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCA
	GGCTCCTCATCTATGGTGCATCCACCAGGGCCACTGGTATCCCAG
	CCAGGTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGAGTTCACTCTCACC
	ATCAGCAGCCTGCAGTCTGAAGATTTTGCAGTTTATTACTGTCAG
	CAGTACCACTCCTTCCCTTTCACTTTTGGCGGAGGGACCAAGGTT
	GAGATCAAA (SEQ ID NO:224)

20501	GAAATAGTGATGACGCAGTCTCCAGCCACCCTGTCTGTGTCTCCA
	GGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAG
	CAGCAACTTAGCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCA
	GGCTCCTCATCTATGGTGCATCCACCAGGGCCACTGGTATCCCAG
	CCAGGTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGAGTTCACTCTCACC
	ATCAGCAGCCTGCAGTCTGAAGATTTTGCAGTTTATTACTGTCAG
	CAGTACCACTCCTTCCCTTTCACTTTTGGCGGAGGGACCAAGGTT
	GAGATCAAA (SEQ ID NO:234)
20502 и	GAAATAGTGATGACGCAGTCTCCAGCCACCCTGTCTGTGTCTCCA
20502,1	GGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAG
	CAGCAACTTAGCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCA
	GGCTCCTCATCTATGGTGCATCCACCAGGGCCACTGGTATCCCAG
	CCAGGTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGAGTTCACTCTCACC
	ATCAGCAGCCTGCAGTCTGAAGATTTTGCAGTTTATTACTGTCAG
	CAGTACCACTCCTTCCCTTTCACTTTTGGCGGAGGGACCAAGGTT
	GAGATCAAA (SEQ ID NO:244)
22208	GAAATAGTGATGACGCAGTCTCCAGCCACCCTGTCTGTGTCTCCA
	GGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGTCCGTTAG
	CACCAACTTAGCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCA
	GGCTCCTCATCTATGACGCATCCGCCAGGGTCACTGGTATCCCAG
	CCAGGTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGAGTTCACTCTCACC
	ATCAGCAGCCTGCAGTCTGAAGATTTTGCAGTTTATTACTGTCAG
	CAGTACCACTCCTTCCCTTTCACTTTTGGCGGAGGGACCAAGGTT
	GAGATCAAA (SEQ ID NO:254)
15462	GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTGTCTCCA
	GGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAG
	CAGCAGCTACTTAGCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTC
	CCAGGCTCCTCATCTATGGTGCATCCAGCAGGGCCACTGGCATCC
	CAGACAGGTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTC
	ACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTTGCAGTGTATTACTGT
	CAGCAGGCCGCCAGTTACCCTCTCACTTTTGGCGGAGGGACCAA
	GGTTGAGATCAAA (SEQ ID NO:264)
22213	GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTGTCTCCA
	GGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTGC
	CAGCAGCCACTTAGCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTC
	1

	CCAGGCTCCTCATCTATGACGCAGTCAGCAGGGCCACTGGCATCC
	CAGACAGGTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTC
	ACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTTGCAGTGTATTACTGT
	CAGCAGGCCGCCAGTTACCCTCTCACTTTTGGCGGAGGGACCAA
	GGTTGAGATCAAA (SEQ ID NO:274)
15465	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCTTCCGTGTCTGCATCTGTA
	GGAGACAGAGTCACCATCACTTGTCGGGCGAGTCAGGGTATTAG
	CAGGTGGTTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTA
	AGCTCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTTGCAAAGTGGGGTCCCAT
	CAAGGTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACC
	ATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGCAACTTATTACTGTCAG
	CAGGCACACCTTCCCTTACACTTTTGGCGGAGGGACCAAGGTT
	GAGATCAAA (SEQ ID NO:284)
20506	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCTTCCGTGTCTGCATCTGTA
	GGAGACAGAGTCACCATCACTTGTCGGGCGAGTCAGGGTATTAG
	CAGGTGGTTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTA
	AGCTCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTTGCAAAGTGGGGTCCCAT
	CAAGGTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACC
	ATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGCAACTTATTACTGTCAG
	CAGGCACACCTTCCCTTACACTTTTGGCGGAGGGACCAAGGTT
	GAGATCAAA (SEQ ID NO:294)
15483	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCTTCCACCCTGTCTGCATCTGTA
	GGAGACAGAGTCACCATCACTTGCCGGGCCAGTCAGAGTATTAG
	TAGCTGGTTGGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTA
	AGCTCCTGATCTATAAAGCCTCCAGTTTGGAAAGTGGGGTCCCAT
	CAAGGTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGAATTCACTCTCACC
	ATCAGCAGCCTGCAGCCTGATGATTTTGCAACTTATTACTGCCAG
	CAGGACAACAGTTACCCTTACACTTTTGGCGGAGGGACCAAGGT
	TGAGATCAAA (SEQ ID NO:304)
20513	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCTTCCACCCTGTCTGCATCTGTA
	GGAGACAGAGTCACCATCACTTGCCGGGCCAGTCAGAGTATTAG
	TAGCTGGTTGGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTA
	AGCTCCTGATCTATAAAGCCTCCAGTTTGGAAAGTGGGGTCCCAT
	CAAGGTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGAATTCACTCTCACC
	ATCAGCAGCCTGCAGCCTGATGATTTTGCAACTTATTACTGCCAG

	CAGGACAACAGTTACCCTTACACTTTTGGCGGAGGGACCAAGGT
	TGAGATCAAA (SEQ ID NO:314)
22216	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCTTCCACCCTGTCTGCATCTGTA
	GGAGACAGAGTCACCATCACTTGCCGGGCCAGTAAAAGTATTAG
	TTCCTGGTTGGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGAAAAGCCCCTA
	AGCTCCTGATCTATGAAGCCTCCTCCTTGCACAGTGGGGTCCCAT
	CAAGGTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGAATTCACTCTCACC
	ATCAGCAGCCTGCAGCCTGATGATTTTGCAACTTATTACTGCCAG
	CAGGACAACAGTTACCCTTACACTTTTGGCGGAGGGACCAAGGT
	TGAGATCAAA (SEQ ID NO:324)
15489	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCTTCCACCCTGTCTGCATCTGTA
	GGAGACAGAGTCACCATCACTTGCCGGGCCAGTCAGAGTATTAG
	TAGCTGGTTGGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTA
	AGCTCCTGATCTATAAAGCCTCCAGTTTGGAAAGTGGGGTCCCAT
	CAAGGTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGAATTCACTCTCACC
	ATCAGCAGCCTGCAGCCTGATGATTTTGCAACTTATTACTGCCAG
	CAGGACAATAGCTTCCCTTTCACTTTTGGCGGAGGGACCAAGGTT
	GAGATCAAA (SEQ ID NO:334)
20516	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCTTCCACCCTGTCTGCATCTGTA
	GGAGACAGAGTCACCATCACTTGCCGGGCCAGTCAGAGTATTAG
	TAGCTGGTTGGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTA
	AGCTCCTGATCTATAAAGCCTCCAGTTTGGAAAGTGGGGTCCCAT
	CAAGGTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGAATTCACTCTCACC
	ATCAGCAGCCTGCAGCCTGATGATTTTGCAACTTATTACTGCCAG
	CAGGACAATAGCTTCCCTTTCACTTTTGGCGGAGGGACCAAGGTT
	GAGATCAAA (SEQ ID NO:344)
15472	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTA
	GGAGACAGAGTCACCATCACTTGCCGGGCAAGTCAGAGCATTAG
	CAGCTATTTAAATTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTA
	AGCTCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTTGCAAAGTGGGGTCCCAT
	CAAGGTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCA
	TCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTGCAACTTACTACTGTCAGC
	AACTATACAGTCTCCCTCCTACTTTTGGCGGAGGGACCAAGGTTG
	AGATCAAA (SEQ ID NO:354)
15503	GACATCCAGTTGACCCAGTCTCCATCTTCCGTGTCTGCATCTGTA
	1

	GGAGACAGAGTCACCATCACTTGTCGGGCGAGTCAGGATATTAG
	CAGCTGGTTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTA
	AGCTCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTTGCAAAGTGGGGTCCCAT
	CAAGGTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACC
	ATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGCAACTTATTACTGTCAG
	CAGGCAACCAGTTACCCTCCTTGGACTTTTGGCGGAGGGACCAA
	GGTTGAGATCAAA (SEQ ID NO:364)
15495	GAAATAGTGATGACGCAGTCTCCAGCCACCCTGTCTGTGTCTCCA
	GGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAG
	CAGCAACTTAGCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCA
	GGCTCCTCATCTATAGCGCATCCACCAGGGCCACTGGTATCCCAG
	CCAGGTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGAGTTCACTCTCACC
	ATCAGCAGCCTGCAGTCTGAAGATTTTGCAGTTTATTACTGTCAG
	CAGGTCAACGTCTGGCCTCCTACTTTTGGCGGAGGGACCAAGGTT
	GAGATCAAA (SEQ ID NO:374)
15478	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCTTCCACCCTGTCTGCATCTGTA
	GGAGACAGAGTCACCATCACTTGCCGGGCCAGTCAGAGTATTAG
	TAGCTGGTTGGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTA
	AGCTCCTGATCTATAAAGCCTCCAGTTTGGAAAGTGGGGTCCCAT
	CAAGGTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGAATTCACTCTCACC
	ATCAGCAGCCTGCAGCCTGATGATTTTGCAACTTATTACTGCCAG
	CAGTACAATAGCTACCCTCCTTTCACTTTTGGCGGAGGGACCAAG
	GTTGAGATCAAA (SEQ ID NO:384)
15441	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCTTCCACCCTGTCTGCATCTGTA
	GGAGACAGAGTCACCATCACTTGCCGGGCCAGTCAGAGTATTAG
	TAGCTGGTTGGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTA
	AGCTCCTGATCTATGATGCCTCCAGTTTGGAAAGTGGGGTCCCAT
	CAAGGTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGAATTCACTCTCACC
	ATCAGCAGCCTGCAGCCTGATGATTTTGCAACTTATTACTGCCAG
	CAGTCCAAAAGTTACCCTAGGACTTTTGGCGGAGGGACCAAGGT
	TGAGATCAAA (SEQ ID NO:394)
20496	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTA
	GGAGACAGAGTCACCATCACTTGCCGGGCAAGTCAGAGCATTAG
	CAGCTATTTAAATTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTA
	AGCTCCTGATCTATGGTGCATCCAGTTTGCAAAGTGGGGTCCCAT

CAAGGTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCA TCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTGCAACTTACTACTGTCAGC AAAGCTACGACCCCCCTTGGACTTTTGGCGGAGGGACCAAGGTT GAGATCAAA (SEQ ID NO:404)

[00241] В данном документе также представлены полинуклеотиды, содержащие нуклеотидную последовательность из SEQ ID NO: 213, 214, 223, 224, 233, 234, 243, 470, 244, 253, 254, 263, 264, 273, 274, 283, 284, 293, 294, 303, 304, 313, 314, 323, 324, 333, 334, 343, 344, 353, 354, 363, 364, 373, 374, 383, 384, 393, 394, 403 или 404. В данном документе также представлены полинуклеотиды, содержащие (і) нуклеотидную последовательность из SEQ ID NO: 213, 214, 223, 224, 233, 234, 243, 470, 244, 253, 254, 263, 264, 273, 274, 283, 284, 293, 294, 303, 304, 313, 314, 323, 324, 333, 334, 343, 344, 353, 354, 363, 364, 373, 374, 383, 384, 393, 394, 403 или 404 и (ii) нуклеотидную последовательность из SEQ ID NO: 408 или 406. В данном документе также представлены полинуклеотиды, содержащие нуклеотидную последовательность, которая кодирует SEQ ID NO: 11, 12, 21, 22, 31, 32, 41, 464, 42, 51, 52, 61, 62, 71, 72, 81, 82, 91, 92, 101, 102, 111, 112, 121, 122, 131, 132, 141, 142, 151, 152, 161, 162, 171, 172, 181, 182, 191, 192, 201 или 202, и на по меньшей мере около 80 %, 85% или 90 % идентичные SEQ ID NO: 213, 214, 223, 224, 233, 234, 243, 470, 244, 253, 254, 263, 264, 273, 274, 283, 284, 293, 294, 303, 304, 313, 314, 323, 324, 333, 334, 343, 344, 353, 354, 363, 364, 373, 374, 383, 384, 393, 394, 403 или 404, соответственно.

[00243] В данном документе также представлены полинуклеотиды, содержащие нуклеотидную последовательность, которая кодирует SEQ ID NO: 11, 12, 21, 22, 31, 32, 41, 464, 42, 51, 52, 61, 62, 71, 72, 81, 82, 91, 92, 101, 102, 111, 112, 121, 122, 131, 132, 141, 142, 151, 152, 161, 162, 171, 172, 181, 182, 191, 192, 201 или 202, и на по меньшей мере около 95 % идентичные SEQ ID NO: 213, 214, 223, 224, 233, 234, 243, 470, 244, 253, 254, 263, 264, 273, 274, 283, 284, 293, 294, 303, 304, 313, 314, 323, 324, 333, 334, 343, 344, 353, 354, 363, 364, 373, 374, 383, 384, 393, 394, 403 или 404, соответственно.

[00244] В данном документе также представлены полинуклеотиды, содержащие нуклеотидную последовательность, которая кодирует SEQ ID NO: 11, 12, 21, 22, 31, 32, 41, 464, 42, 51, 52, 61, 62, 71, 72, 81, 82, 91, 92, 101, 102, 111, 112, 121, 122, 131, 132, 141, 142, 151, 152, 161, 162, 171, 172, 181, 182, 191, 192, 201 или 202, и на по меньшей мере около 96 % идентичные SEQ ID NO: 213, 214, 223, 224, 233, 234, 243, 470, 244, 253, 254, 263, 264, 273, 274, 283, 284, 293, 294, 303, 304, 313, 314, 323, 324, 333, 334, 343, 344, 353, 354, 363, 364, 373, 374, 383, 384, 393, 394, 403 или 404, соответственно.

[00245] В данном документе также представлены полинуклеотиды, содержащие

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

[00246] В данном документе также представлены полинуклеотиды, содержащие нуклеотидную последовательность, которая кодирует SEQ ID NO: 11, 12, 21, 22, 31, 32, 41, 464, 42, 51, 52, 61, 62, 71, 72, 81, 82, 91, 92, 101, 102, 111, 112, 121, 122, 131, 132, 141, 142, 151, 152, 161, 162, 171, 172, 181, 182, 191, 192, 201 или 202, и на по меньшей мере около 98 % идентичные SEQ ID NO: 213, 214, 223, 224, 233, 234, 243, 470, 244, 253, 254, 263, 264, 273, 274, 283, 284, 293, 294, 303, 304, 313, 314, 323, 324, 333, 334, 343, 344, 353, 354, 363, 364, 373, 374, 383, 384, 393, 394, 403 или 404, соответственно.

[00247] В данном документе также представлены полинуклеотиды, содержащие нуклеотидную последовательность, которая кодирует SEQ ID NO: 11, 12, 21, 22, 31, 32, 41, 464, 42, 51, 52, 61, 62, 71, 72, 81, 82, 91, 92, 101, 102, 111, 112, 121, 122, 131, 132, 141, 142, 151, 152, 161, 162, 171, 172, 181, 182, 191, 192, 201 или 202, и на по меньшей мере около 99 % идентичные SEQ ID NO: 213, 214, 223, 224, 233, 234, 243, 470, 244, 253, 254, 263, 264, 273, 274, 283, 284, 293, 294, 303, 304, 313, 314, 323, 324, 333, 334, 343, 344, 353, 354, 363, 364, 373, 374, 383, 384, 393, 394, 403 или 404, соответственно.

[00248] В определенных аспектах в данном документе представлены полинуклеотиды, содержащие нуклеотидную последовательность, кодирующую легкую или тяжелую цепь антитела или антигенсвязывающий фрагмент, описанный в данном документе. Полинуклеотиды могут содержать нуклеотидные последовательности, кодирующие тяжелую цепь, содержащую FR и CDR VH антител, описанных в данном (см., например, Таблицы 1 и 5). Полинуклеотиды могут содержать нуклеотидные последовательности, кодирующие легкую цепь, содержащую FR и CDR VL антител, описанных в данном (см., например, Таблицы 2 и 6).

[00249] В конкретных вариантах осуществления данного изобретения, полинуклеотид, описанный в данном документе, кодирует домен VH, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 464. В конкретных вариантах осуществления данного изобретения, полинуклеотид, описанный в данном документе, кодирует домен VL, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 42.

[00250] В конкретных вариантах осуществления данного изобретения, полинуклеотид,

описанный в данном документе, кодирует домен VH, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 41. В конкретных вариантах осуществления данного изобретения, полинуклеотид, описанный в данном документе, кодирует домен VL, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 42.

[00251] В конкретных вариантах осуществления данного изобретения, полинуклеотид, описанный в данном документе, кодирует домен VH, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 71.В конкретных вариантах осуществления данного изобретения, полинуклеотид, описанный в данном документе, кодирует домен VL, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 72.

В конкретных вариантах осуществления данного изобретения, в данном [00252] полинуклеотиды, документе представлены содержащие нуклеотидную последовательность, кодирующую анти-В7-Н4 антитело, содержащее три CDR VH-цепи, например, содержащие CDR1 VH, CDR2 VH, CDR3 VH VL любого из антител, описанных в данном документе (например, см. Таблицу 1). В конкретных вариантах осуществления данного изобретения, в данном документе представлены полинуклеотиды, содержащие три CDR VL-цепи, например, содержащие CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL любого из антител, описанных в данном документе (например, см. Таблицу 2). В конкретных вариантах осуществления данного изобретения, в данном документе представлены полинуклеотиды, содержащие нуклеотидную последовательность, кодирующую анти-В7-Н4 антитело, содержащее три CDR VH-цепи, например, содержащие CDR1 VH, CDR2 VH и CDR3 VH любого из антител, описанных в данном документе (например, см. Таблицу 1) и три CDR VL-цепи, например, содержащие CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL любого из антител, описанных в данном документе (например, см. Таблицу 2).

[00253] В конкретных вариантах осуществления данного изобретения, в данном документе представлены полинуклеотиды, содержащие нуклеотидную последовательность, кодирующую анти-В7-Н4 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, или его фрагмент, содержащий домен VH, например, содержащий FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4, содержащий аминокислотную последовательность, описанную в данном документе (например, см. Таблицы 1 и 5, например, CDR VH и FR VH конкретного антитела, идентифицированные по названию в Таблицах). В конкретных вариантах осуществления данного изобретения, в данном документе представлены полинуклеотиды, содержащие нуклеотидную последовательность, кодирующую анти-В7-Н4 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, или его фрагмент, содержащий домен VL, например,

содержащий FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4, содержащий аминокислотную последовательность, описанную в данном документе (например, см. Таблицы 2 и 6, например, CDR VL и FR VL конкретного антитела, идентифицированного по названию в Таблицах).

[00254] В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, полинуклеотид, описанный в данном документе, содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую вариабельный участок тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, описанную в данном документе (например, SEQ ID NO: 464, 41 или 71), содержащее вариабельный при ЭТОМ антитело, участок тяжелой иммуноспецифично связывается с В7-Н4 (например, В7-Н4 человека). В определенном варианте осуществления данного изобретения, полинуклеотид, описанный в данном документе, содержит последовательность, кодирующую вариабельный участок тяжелой цепи, представленный в данном документе (например, часть, кодирующую вариабельный участок SEQ ID NO: 470, 243 или 273), при этом антитело, содержащее вариабельный участок тяжелой цепи, иммуноспецифично связывается с В7-Н4 (например, с В7-Н4 человека).

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, полинуклеотид, [00255] описанный данном документе, содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую вариабельный участок легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, описанную в данном документе (например, SEQ ID NO: 42 или 72), при этом антитело, содержащее вариабельный участок легкой цепи, иммуноспецифично связывается с В7-Н4 (например, В7-Н4 человека). В определенном варианте осуществления данного изобретения, полинуклеотид, описанный в данном документе, содержит последовательность, кодирующую вариабельный участок легкой цепи, представленный в данном документе (например, часть, кодирующую вариабельный участок SEQ ID NO: 244 или 274), при этом антитело, содержащее вариабельный участок тяжелой цепи, иммуноспецифично связывается с В7-Н4 (например, с В7-Н4 человека).

В конкретном варианте осуществления данного изобретения, полинуклеотид или [00256] представленных в данном комбинация полинуклеотидов, документе, содержит нуклеотидную последовательность или комбинацию нуклеотидных последовательностей, кодирующих антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, иммуноспецифически связываются с В7-Н4 (например, В7-Н4 человека), при этом антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат тяжелую цепь, при этом тяжелая цепь вариабельный содержит домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в Таблице 3 (например, SEQ ID NO: 464, 41 или 71),

и константный участок, содержащий аминокислотную последовательность константного участка тяжелой цепи гамма ( $\gamma$ ) человека.

В конкретном варианте осуществления данного изобретения, полинуклеотид или комбинация полинуклеотидов, представленных в данном документе, нуклеотидную последовательность или комбинацию нуклеотидных последовательностей, кодирующих антигенсвязывающий антитело или его фрагмент, которые иммуноспецифически связываются с В7-Н4 (например, В7-Н4 человека), при этом антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат легкую цепь, при этом легкая цепь вариабельный содержит домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в Таблице 4 (например, SEQ ID NO: 42 или 72), и константный участок, содержащий аминокислотную последовательность константного участка легкой цепи лямбда человека.

В конкретном варианте осуществления данного изобретения, полинуклеотид или [00258] полинуклеотидов, представленных в данном документе, комбинация нуклеотидную последовательность или комбинацию нуклеотидных последовательностей, кодирующих антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые иммуноспецифически связываются с В7-Н4 (например, В7-Н4 человека), при этом антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат (і) тяжелую цепь, при этом тяжелая цепь вариабельный содержит домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в Таблице 3 (например, SEQ ID NO: 464, 41 или 71), и константный участок, содержащий аминокислотную последовательность константного участка тяжелой цепи гамма (γ) человека и (ii) легкую цепь, при этом легкая цепь содержит вариабельный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в Таблице 4 (например, SEQ ID NO: 42 или 72), и константный участок, содержащий аминокислотную последовательность константного участка легкой цепи лямбда человека.

[00259] В одном варианте осуществления данного изобретения, комбинация полинуклеотидов, представленная в данном документе, содержит полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность из SEQ ID NO: 470, и полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность из SEQ ID NO: 244.

[00260] В одном варианте осуществления данного изобретения, комбинация полинуклеотидов, представленная в данном документе, содержит полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность из SEQ ID NO: 243, и полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность из SEQ ID NO: 244.

[00261] В одном варианте осуществления данного изобретения, комбинация

полинуклеотидов, представленная в данном документе, содержит полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность из SEQ ID NO: 273, и полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность из SEQ ID NO: 274.

В конкретном варианте осуществления данного изобретения, в данном [00262] документе представлены полинуклеотиды, содержащие нуклеотидную последовательность, кодирующую анти-В7-Н4 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, или его домен, обозначенные в данном документе, см., например, Таблицы 1-8. [00263] В данном документе также представлены полинуклеотиды, кодирующие анти-В7-Н4 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в данном документе, или его домен, которые оптимизируются, например, путем оптимизации кодона/РНК, замены гетерологичными сигнальными последовательностями и удаления элементов нестабильности мРНК. Способы получения оптимизированных нуклеиновых кислот, кодирующих анти-В7-Н4 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент или его домен (например, тяжелую цепь, легкую цепь, домен VH или домен VL) для рекомбинантной экспрессии путем введения изменений кодонов (например, изменение кодона, которое кодирует ту же аминокислоту из-за вырожденности генетического кода) и/или устранения ингибирующих участков в мРНК, могут быть выполнены путем адаптации способов оптимизации, описанных, например, в пат. США № 5965726; 6174666; 6291664; 6414132; и 6794498 соответственно.

[00264] Полинуклеотид, кодирующий антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в данном документе, или его домен, могут быть получены из нуклеиновой кислоты из подходящего источника (например, гибридомы) с использованием способов, хорошо известных в данной области техники (например, ПЦР и другие способы молекулярного клонирования). Например, амплификация ПЦР с использованием гибридизующихся с 3' 5' праймеров, И концами известной синтетических последовательности, может быть выполнена с использованием геномной ДНК, полученной из клеток гибридомы, продуцирующих антитело, представляющее интерес. Такие способы ПЦР-амплификации можно использовать для получения нуклеиновых кислот, содержащих последовательность, кодирующую легкую цепь и/или тяжелую цепь антитела или его антигенсвязывающего фрагмента. Такие способы амплификации ПЦР можно использовать для получения нуклеиновых кислот, содержащих последовательность, кодирующую вариабельный участок легкой цепи и/или вариабельный участок тяжелой цепи антитела или его антигенсвязывающего фрагмента. Амплифицированные нуклеиновые кислоты могут быть клонированы в векторы для экспрессии в клетках-хозяевах и для дальнейшего клонирования, например, для генерирования химерных и гуманизированных антител или их антигенсвязывающих фрагментов.

Полинуклеотиды, представленные в данном документе, могут быть, например, в форме РНК или в форме ДНК. ДНК включает кДНК, геномную ДНК и синтетическую ДНК, и ДНК может быть двухцепочечной или одноцепочечной. Если одноцепочечная, ДНК может быть кодирующей или некодирующей (антисмысловой) цепью. В определенных вариантах осуществления данного изобретения, полинуклеотид представляет собой кДНК или ДНК, лишенные еще одного эндогенного интрона. В определенных вариантах изобретения, осуществления данного полинуклеотид представляет собой встречающийся в природе полинуклеотид. В определенных вариантах осуществления данного изобретения, полинуклеотид продуцируется рекомбинантно. В определенных вариантах осуществления данного изобретения, полинуклеотиды являются выделенными. В определенных вариантах осуществления данного изобретения, полинуклеотиды являются по существу чистыми. В определенных вариантах осуществления данного изобретения, полинуклеотид очищают от природных компонентов.

## 1.2.2 Клетки и векторы

[00266] В определенных аспектах в данном документе представлены векторы (например, содержащие полинуклеотиды, содержащие векторы экспрессии), нуклеотидные последовательности, кодирующие анти-В7-Н4 антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, или их домен для рекомбинантной экспрессии в клетках-хозяевах, предпочтительно в клетках млекопитающих. В данном документе также представлены клетки, например, клетки-хозяева, содержащие такие векторы для рекомбинантной экспрессии анти-В7-Н4 антител или их антигенсвязывающих фрагментов, описанных в данном документе (например, человеческие или гуманизированные антитела или их антигенсвязывающие фрагменты). В конкретном аспекте в данном документе представлены способы получения антитела или его антигенсвязывающих фрагментов, описанных в данном документе, включающие экспрессию такого антитела или его антигенсвязывающего фрагмента в клетке-хозяине.

[00267] В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, рекомбинантная экспрессия антитела или его антигенсвязывающего фрагмента или его домена, описанные в данном документе (например, тяжелой или легкой цепи, описанной в данном документе), которые специфически связываются с В7-Н4 (например, В7-Н4 человека), включает конструирование вектора экспрессии, содержащего полинуклеотид, который кодирует антитело или его антигенсвязывающий фрагмент или его домен. Как только

полинуклеотид, кодирующий антитело или его антигенсвязывающий фрагмент или его домен (например, вариабельный домен тяжелой или легкой цепи), описанные в данном документе, получены, вектор для получения антитела или его антигенсвязывающего фрагмента могут быть получены рекомбинантной ДНК технологией с использованием методов, хорошо известных в данной области техники. Таким образом, способы получения белка экспрессии полинуклеотида, содержащего антитело путем ИЛИ его антигенсвязывающий фрагмент или его домен (например, легкую цепь или тяжелую цепь), кодирующий нуклеотидную последовательность, описаны в данном документе. Способы, которые хорошо известны специалистам в данной области техники, могут быть использованы для конструирования векторов экспрессии, содержащих антитела или их антигенсвязывающий фрагмент или их кодирующие последовательности (например, легкую цепь или тяжелую цепь) и соответствующие сигналы контроля транскрипции и трансляции. Эти способы включают, например, методы рекомбинантной ДНК in vitro, методы синтеза и генетическую рекомбинацию in vivo. Также предоставлены реплицируемые векторы, содержащие нуклеотидную последовательность, кодирующую антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в данном документе, тяжелую или легкую цепь, вариабельный домен тяжелой или легкой цепи или CDR тяжелой или легкой цепи, функционально связанные с промотором. Такие векторы могут, например, включать нуклеотидную последовательность, кодирующую константный участок антитела или его антигенсвязывающий фрагмент (см., например, международные публикации № WO 86/05807 и WO 89/01036; и пат. США№ 5122464) и вариабельные домены антитела или его антигенсвязывающего фрагмента могут быть клонированы в такой вектор для экспрессии всей тяжелой цепи, всей легкой цепи или как всей тяжелой, так и легкой цепи.

[00268] Вектор экспрессии может быть перенесен в клетку (например, клетку-хозяина) обычными методами, и полученные клетки могут быть затем культивированы традиционными методами для получения антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, описанного в данном документе (например, антитела антигенсвязывающего фрагмента, содержащего шесть CDR, VH, VL, VH и VL, тяжелую цепь, легкую цепь или тяжелую и легкую цепь 20502, 20502.1 или 22213) или их домен (например, VH, VL, VH и VL, тяжелая цепь или легкая цепь 20502, 20502.1 или 22213). Таким образом, в данном документе представлены клетки-хозяева, содержащие полинуклеотид, кодирующий антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в данном документе (например, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие шесть CDR, VH, VL, VH и VL, тяжелая цепь, легкая цепь или тяжелая и легкая цепь 20502, 20502.1 или 22213) или их домен (например, VH, VL, VH и VL, тяжелая цепь

или легкая цепь 20502, 20502.1 или 22213), функционально связанные с промотором для экспрессии таких последовательностей в клетке-хозяине. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, для экспрессии антител с двойной цепью или их антигенсвязывающих фрагментов векторы, кодирующие как тяжелую, так и легкую цепи, по отдельности, можно совместно экспрессировать в клетке-хозяине для экспрессии всего иммуноглобулина, как подробно описано ниже. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, клетка-хозяин содержит вектор, содержащий полинуклеотид, кодирующий как тяжелую цепь, так и легкую цепь антитела, описанного в данном документе (например, тяжелую и легкую цепь 20502, 20502.1 или 22213), или его домен (например, VH и VL 20502, 20502.1 или 22213).В конкретных вариантах осуществления данного изобретения, клетка-хозяин содержит два разных вектора, первый вектор, содержащий полинуклеотид, кодирующий тяжелую цепь или вариабельный участок тяжелой цепи антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, описанные в данном документе, и второй вектор, содержащий полинуклеотид, кодирующий легкую цепь или вариабельный участок легкой цепи антитела описанного в данном документе (например, антитело, содержащее шесть CDR 20502, 20502.1 или 22213) или его домен. В других вариантах осуществления данного изобретения, первая клетка-хозяин содержит первый вектор, содержащий полинуклеотид, кодирующий тяжелую цепь или вариабельный участок тяжелой цепи антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, описанных в данном документе, и вторая клетка-хозяин содержит второй вектор, содержащий полинуклеотид, кодирующий легкую цепь или вариабельный участок легкой цепи антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, описанного в данном документе (например, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие шесть CDR 20502, 20502.1 или 22213).В конкретных вариантах осуществления данного изобретения, тяжелая цепь/вариабельный участок тяжелой цепи экспрессируется первой клеткой, ассоциированной с легкой цепью/вариабельным участком легкой цепи второй клетки, с образованием анти-В7-Н4 антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, описанных в данном документе (например, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие шесть CDR 20502, 20502.1 или 22213). В определенных вариантах осуществления данного изобретения, в данном документе представлена популяция клетокхозяев, включающая такую первую клетку-хозяин и такую вторую клетку-хозяин.

[00269] В конкретном варианте осуществления данного изобретения, в данном документе представлена популяция векторов, содержащая первый вектор, содержащий полинуклеотид, кодирующий легкую цепь/вариабельный участок легкой цепи анти-В7-Н4 антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, описанных в данном документе, и

второй вектор, содержащий полинуклеотид, кодирующий тяжелую цепь/вариабельный участок тяжелой цепи анти-В7-Н4 антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, описанных в данном документе (например, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие CDR 20502, 20502.1 или 22213). Альтернативно, можно использовать один вектор, который кодирует и способен экспрессировать полипептиды как тяжелой, так и легкой цепи.

[00270] Для экспрессии антител и их антигенсвязывающих фрагментов, описанных в данном документе, можно использовать множество систем векторов экспрессии хозяина (например, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащий CDR 20502, 20502.1 или 22213) (см., например, пат. США№ 5807715). Такие системы экспрессии хозяина представляют собой носители, с помощью которых представляющие интерес кодирующие последовательности могут быть получены и впоследствии очищены, но также собой представляют клетки, которые при трансформации или трансфекции соответствующими нуклеотидными кодирующими последовательностями экспрессировать антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанный в данном документе in situ. Они включают, но не ограничиваются ими, микроорганизмы, такие как бактерии (например, E.coli и B. subtilis), трансформированные рекомбинантными векторами бактериофаговой ДНК, плазмидной ДНК или космидной ДНК, содержащими кодирующие последовательности антител; дрожжи (например, Saccharomyces Pichia), трансформированные рекомбинантными дрожжевыми экспрессирующими векторами, содержащими последовательности, кодирующие антитела; системы клеток насекомых, инфицированные векторами экспрессии рекомбинантного вируса (например, бакуловируса), содержащие кодирующие последовательности антител; системы растительных клеток (например, зеленые водоросли, такие как Chlamydomonas reinhardtii), инфицированные векторами экспрессии рекомбинантного вируса (например, вирусом мозаики цветной капусты, CaMV; вирусом мозаики табака, TMV) или трансформированные векторами экспрессии рекомбинантной плазмиды (например, плазмиды Ti), содержащие последовательности, кодирующие антитела; или клеточные системы млекопитающих (например, COS (например, COS1 или COS), CHO, BHK, MDCK, HEK 293, NS0, PER.C6, VERO, CRL7O3O, HsS78Bst, HeLa и NIH 3T3, HEK-293T, HepG2, SP210 Клетки R1.1, BW, LM, BSC1, BSC40, YB/20 и BMT10), несущие рекомбинантные экспрессирующие конструкции, содержащие промоторы, полученные из генома клеток млекопитающих (например, промотор металлотионеина) или вирусы млекопитающих (например, поздний промотор аденовируса; промотор вируса коровьей оспы 7.5К). В конкретном варианте данного изобретения, осуществления клетки для экспрессии антител и ИХ

антигенсвязывающих фрагментов, описанных в данном документе (например, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащий CDR 20502, 20502.1 или 22213), представляют собой клетки CHO, например, клетки CHO из CHO GS System<sup>TM</sup> (Lonza). В конкретном варианте осуществления данного изобретения, клетки для экспрессии антител, описанные в данном документе, представляют собой клетки человека, например, линии клеток человека. В конкретном варианте осуществления данного изобретения, вектор экспрессии млекопитающего представляет собой pOptiVEC<sup>TM</sup> или pcDNA3.3. В конкретном варианте осуществления данного изобретения, бактериальные клетки, такие как *Escherichia* coli, или эукариотические клетки (например, клетки млекопитающих), особенно для экспрессии молекулы всего рекомбинантного антитела, используют для экспрессии молекулы рекомбинантного антитела. Например, клетки млекопитающих, такие как клетки яичника китайского хомячка (СНО) в сочетании с вектором, таким как основной промежуточный ранний промоторный элемент гена из цитомегаловируса человека, являются эффективной системой экспрессии для антител (Foecking MK & Hofstetter H (1986) Gene 45:101-105; and Cockett MI et al., (1990) Biotechnology 8:662-667). B определенных вариантах осуществления данного изобретения, антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, описанные в данном документе, продуцируются клетками СНО или клетками NS0.

Кроме того, может быть выбран штамм клетки-хозяина, который модулирует [00271] экспрессию вставленных последовательностей, или модифицирует и процессирует генный определенным желаемым образом. Такие модификации продукт (например, гликозилирование) и процессинг (например, расщепление) белковых продуктов могут вносить вклад в функцию белка. С этой целью можно использовать эукариотические клетки-хозяева, которые обладают клеточным механизмом для правильной обработки первичного транскрипта, гликозилирования и фосфорилирования генного продукта. Такие клетки-хозяева млекопитающих включают, но не ограничиваются ими, CHO, VERO, BHK, Hela, MDCK, HEK 293, NIH 3T3, W138, BT483, Hs578T, HTB2, BT2O и T47D, NS0 (клеточная линия мышиной миеломы, которая не эндогенно продуцирует любые цепи иммуноглобулина), CRL7O3O, COS (например, COS1 или COS), PER.C6, VERO, HsS78Bst, HEK-293T, HepG2, SP210, R1.1, B-W, L-M, BSC1, BSC40, YB/20, BMT10 и HsS78Bst клетки. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, анти-В7-Н4 антитела, описанные в данном документе (например, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие CDR 20502, 20502.1 или 22213), продуцируются в клетках млекопитающих, таких как клетки СНО.

[00272] В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, анти-В7-Н4

антитела, описанные в данном документе (например, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие CDR 20502, 20502.1 или 22213), продуцируются в клетках Potelligent® CHOK1SV.

[00273] В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, предоставлены клетки-хозяева, которые содержат нуклеиновую кислоту, кодирующую антитело В7-Н4 или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в данном документе, при этом клетка-хозяин лишена функционального гена альфа-1,6-фукозилтрансферазы (FUT8). В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, клетка-хозяин представляет собой клетку СНО.

[00274] Как только антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в данном документе, получены рекомбинантной экспрессией, их можно очистить любым способом, известным в данной области техники, для очистки молекулы иммуноглобулина, например, хроматографией (например, ионный обмен, аффинность, особенно по аффинности к специфическому антигену после белка А и калибровочной хроматографии), центрифугированию, дифференциальной растворимости или по любой другой стандартной методике очистки белков. Кроме того, антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, описанные в данном документе, могут быть слиты с гетерологичными полипептидными последовательностями, описанными в данном документе, или иным образом известными в данной области техники для облегчения очистки.

[00275] В конкретных вариантах осуществления данного изобретения, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в данном документе, выделяют или очищают. Обычно выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляет собой такое, которое по существу не содержит других антител или их антигенсвязывающих фрагментов с антигенной специфичностью, отличной от выделенного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента. Например, в конкретном варианте осуществления данного изобретения, препарат антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, описанные в данном документе, по существу не содержат клеточного материала и/или химических предшественников.

# 1.3 Фармацевтические композиции

[00276] В данном документе представлены композиции, содержащие антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в данном документе, имеющие желаемую степень чистоты в физиологически приемлемом носителе, наполнителе или стабилизаторе (Remington's Pharmaceutical Sciences (1990) Mack Publishing Co., Истон, Пенсильвания). Приемлемые носители, наполнители или стабилизаторы являются нетоксичными для

реципиентов в используемых дозировках и концентрациях.

[00277] В различных вариантах осуществления данного изобретения, композиции, содержащие анти-В7-Н4 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, предоставляются в композициях с фармацевтически приемлемым носителем (см., например, Gennaro, Remington:The Science and Practice of Pharmacy with Facts and Comparisons:Drugfacts Plus, 20th ed. (2003); Ansel et al., Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, 7th ed., Lippencott Williams and Wilkins (2004); Kibbe et al., Handbook of Pharmaceutical Excipients, 3rd ed., Pharmaceutical Press (2000)).

Описанные в данном документе фармацевтические композиции могут быть [00278] полезны для блокирования ингибирующей активности В7-Н4 против Т-клеток и/или для АЗКЦ-зависимого деплетирование В7-Н4 экспрессирующих клеток. Фармацевтические композиции, описанные в данном документе, могут быть полезны при лечении состояния, такого как рак. Примеры рака, который можно лечить в соответствии со способами, описанными в данном документе, включают, но не ограничиваются ими, рак молочной железы (например, тройной негативный рак молочной железы, рак протоков), рак эндометрия, рак яичников и немелкоклеточный рак легких (например, плоскоклеточный рак), рак поджелудочной железы, рак щитовидной железы, рак почки (например, почечноклеточный рак) и рак мочевого пузыря (например, рак уротелиальной клетки). Немелкоклеточный рак легкого может быть, например, аденокарциномой. Дополнительные примеры рака, которые можно лечить в соответствии со способами, описанными в данном документе, включают, но не ограничиваются ими, рак головы и шеи, мелкоклеточный рак легкого, рак желудка, меланому и холангиокарциному. В одном варианте осуществления данного изобретения, рак яичника представляет собой серозную аденокарциному. В одном варианте осуществления данного изобретения, рак молочной железы представляет собой аденокарциному протоков.

[00279] Фармацевтические композиции, описанные в данном документе, находятся в одном варианте осуществления данного изобретения, для применения в качестве лекарственного средства. Фармацевтические композиции, описанные в данном документе, в одном варианте осуществления данного изобретения, предназначены для использования в качестве диагностики, например, для обнаружения присутствия В7-Н4 в образце, полученном от пациента (например, пациента-человека).

[00280] Композиции, используемые для введения *in vivo*, могут быть стерильными. Это легко достигается путем фильтрации через, например, стерильные фильтрующие мембраны.

[00281] В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, предлагаются

фармацевтические композиции, в которых фармацевтическая композиция содержит анти-В7-Н4 антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, описанные в данном документе, и фармацевтически приемлемый носитель. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, предлагаются фармацевтические композиции, в которых фармацевтическая композиция содержит афукозилированные анти-В7-Н4 антитела или антигенсвязывающие фрагменты, описанные в данном документе, и фармацевтически приемлемый носитель. В конкретных вариантах осуществления данного изобретения, такая фармацевтическая композиция содержит афукозилированные анти-В7-Н4 антитела или антигенсвязывающие фрагменты, например, при этом по меньшей мере 80 % антител в композиции являются афукозилированными. В конкретных вариантах осуществления данного изобретения, такая фармацевтическая композиция содержит афукозилированные анти-В7-Н4 антитела или антигенсвязывающие фрагменты, например, при этом по меньшей мере 85 % антител в композиции являются афукозилированными. В конкретных вариантах осуществления данного изобретения, такая фармацевтическая композиция содержит афукозилированные анти-В7-Н4 антитела или антигенсвязывающие фрагменты, например, при этом по меньшей мере 90 % антител в композиции являются афукозилированными. В конкретных вариантах осуществления данного изобретения, такая фармацевтическая композиция содержит афукозилированные анти-В7-Н4 антитела или антигенсвязывающие фрагменты, например, при этом по меньшей мере 95 % антител в композиции являются афукозилированными. В конкретных вариантах осуществления данного изобретения, такая фармацевтическая композиция содержит афукозилированные анти-В7-Н4 антитела или антигенсвязывающие фрагменты, например, при этом по меньшей мере 96 % антител в композиции являются афукозилированными. В конкретных вариантах осуществления данного изобретения, такая фармацевтическая композиция содержит афукозилированные анти-В7-Н4 антитела или антигенсвязывающие фрагменты, например, при этом по меньшей мере 97 % антител в композиции являются афукозилированными. В конкретных вариантах осуществления данного изобретения, такая фармацевтическая композиция содержит афукозилированные анти-В7-Н4 антитела или антигенсвязывающие фрагменты, например, при этом по меньшей мере 98 % антител в композиции являются афукозилированными. В конкретных вариантах осуществления данного изобретения, такая фармацевтическая композиция содержит афукозилированные анти-В7-Н4 антитела или антигенсвязывающие фрагменты, например, при этом по меньшей мере 99 % антител в композиции являются афукозилированными. В конкретных вариантах осуществления данного изобретения, такая фармацевтическая композиция содержит афукозилированные анти-В7-Н4 антитела или антигенсвязывающие фрагменты,

в которых фукоза не обнаруживается в композиции.

[00282] В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, фармацевтическая композиция содержит (i) выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который специфически связывается с B7-H4 человека, содержащим (a) определяющий комплементарность участок (CDR) 1 вариабельного участка тяжелой цепи (VH), CDR2 VH, CDR3 VH и последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 вариабельного участка легкой цепи (VL) SEQ ID NO: 458-463, соответственно, (b) вариабельный участок тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 464, и вариабельный участок легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 42, или (c) тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 469, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 44 и (ii) фармацевтически приемлемый наполнитель.

В данном документе также предложена фармацевтическая композиция, [00283] содержащая (і) антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связываются с В7-Н4 человека и содержат последовательности определяющего комплементарность участка (CDR) 1 вариабельного участка тяжелой цепи (VH), CDR2 VH, CDR3 VH и CDR1, CDR2 и CDR3 вариабельного участка легкой цепи (VL) из SEQ ID NO: 458-463 соответственно и (ii) фармацевтически приемлемый наполнитель, при этом по меньшей мере 80 %, по меньшей мере 85 %, по меньшей мере 90 %, при по меньшей мере 95 %, по меньшей мере 96 %, по меньшей мере 97 %, по меньшей мере 98 % или по меньшей мере 99 % антител или их антигенсвязывающих фрагментов в композиции являются афукозилированными. В одном варианте осуществления изобретения (і) антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельный участок тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 464, и вариабельный участок легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 42, (ii) антитело тяжелую цепь, содержащую или содержит аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 469, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 44.

[00284] В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, фармацевтическая композиция содержит (i) выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который специфически связывается с B7-H4 человека, содержащим (a) определяющий комплементарность участок (CDR) 1 вариабельного участка тяжелой цепи (VH), CDR2 VH, CDR3 VH и последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 вариабельного участка легкой цепи (VL) SEQ ID NO: 35-40, соответственно, (b) вариабельный участок тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 41, и вариабельный

участок легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 42, или (c) тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 43, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 44 и (ii) фармацевтически приемлемый наполнитель.

[00285] В данном документе также предложена фармацевтическая композиция, содержащая (і) антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связываются с В7-Н4 человека и содержат последовательности определяющего комплементарность участка (CDR) 1 вариабельного участка тяжелой цепи (VH), CDR2 VH, CDR3 VH и CDR1, CDR2 и CDR3 вариабельного участка легкой цепи (VL) из SEQ ID NO: 35-40 соответственно и (ii) фармацевтически приемлемый наполнитель, при этом по меньшей мере 80 %, по меньшей мере 85 %, по меньшей мере 90 %, при по меньшей мере 95 %, по меньшей мере 96 %, по меньшей мере 97 %, по меньшей мере 98 % или по меньшей мере 99 % антител или их антигенсвязывающих фрагментов в композиции являются афукозилированными. В одном варианте осуществления изобретения (i) антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат вариабельный участок тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 41, и вариабельный участок легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 42, или (ii) антитело содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 43, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 44.

[00286] В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, фармацевтическая композиция содержит (i) выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который специфически связывается с B7-H4 человека, содержащим (a) определяющий комплементарность участок (CDR) 1 вариабельного участка тяжелой цепи (VH), CDR2 VH, CDR3 VH и последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 вариабельного участка легкой цепи (VL) SEQ ID NO: 65-70, соответственно, (b) вариабельный участок тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 71, и вариабельный участок легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 72, или (c) тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 73, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 74 и (ii) фармацевтически приемлемый наполнитель.

[00287] В данном документе также предложена фармацевтическая композиция, содержащая (i) антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связываются с В7-Н4 человека и содержат последовательности определяющего комплементарность участка (CDR) 1 вариабельного участка тяжелой цепи (VH), CDR2 VH,

CDR3 VH и CDR1, CDR2 и CDR3 вариабельного участка легкой цепи (VL) из SEQ ID NO: 65-70 соответственно и (ii) фармацевтически приемлемый наполнитель, при этом по меньшей мере 80 %, по меньшей мере 85 %, по меньшей мере 90 %, при по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99 % антител или их антигенсвязывающих фрагментов в композиции являются афукозилированными. В одном варианте осуществления изобретения (і) антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат вариабельный участок тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 71, и вариабельный участок легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 72, антитело или (ii) содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 73, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 74.

# 1.4 Применения и способы

# 1.4.1 Терапевтические применения и способы

[00288] В одном аспекте в данном документе представлены способы модуляции одной или более иммунных функций у субъекта, включающие введение субъекту, нуждающемуся в этом, анти-В7-Н4 антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, описанных в данном документе, или его фармацевтической композиции, как описано выше и в данном документе.

[00289] В другом варианте осуществления данного изобретения, анти-В7-Н4 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент или фармацевтическую композицию вводят пациенту (например, пациенту-человеку) для увеличения пролиферации Т-клеток, CD4+ Т-клеток или CD8+ Т-клеток у пациента. В другом варианте осуществления данного изобретения, анти-В7-Н4 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент или фармацевтическую композицию вводят пациенту (например, пациенту-человеку) для увеличения продукции интерферона-гамма (ИФНү) у пациента. В другом варианте осуществления данного изобретения, анти-В7-Н4 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент или фармацевтическую композицию вводят пациенту (например, пациенту-человеку), чтобы блокировать ингибирующую активность В7-Н4 против Т-клеток у пациента. В другом варианте осуществления данного изобретения, анти-В7-Н4 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент или фармацевтическую композицию вводят пациенту (например, пациенту-человеку) для деплетирования экспрессирующих В7-Н4 раковых клеток у пациента. В другом варианте осуществления данного изобретения, анти-

В7-Н4 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент или фармацевтическую композицию вводят для достижения двух или более из указанных выше эффектов.

[00290] В определенном варианте осуществления данного изобретения, в данном документе предлагаются способы лечения рака, например, рака, экспрессирующего В7-Н4. Способ лечения рака может включать в себя введение анти-В7-Н4 антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, представленного В данном документе, или фармацевтической композиции, содержащей анти-В7-Н4 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, предоставленные в данном документе, пациенту (например, пациенту-человеку), нуждающемуся в этом.

[00291] В определенном варианте осуществления данного изобретения, в данном документе предлагаются способы лечения рака, выбранного из группы, состоящей из: рака молочной железы (например, тройного негативного рака молочной железы, рака протоков), эндометрия, рака яичников, немелкоклеточного рака легких (например, рака плоскоклеточного рака), рака поджелудочной железы, рака щитовидной железы, рака почки (например, почечно-клеточного рака) и рака мочевого пузыря (например, рака уротелиальной клетки).В определенном варианте осуществления данного изобретения, в данном документе предлагаются способы лечения немелкоклеточного рака легкого, который представляет собой аденокарциному. В определенном варианте осуществления данного изобретения, в данном документе предлагаются способы лечения рака, выбранного из группы, состоящей из: рака головы и шеи, мелкоклеточного рака легкого, рака желудка, меланомы и холангиокарциномы. В одном варианте осуществления данного изобретения, рак яичника представляет собой серозную аденокарциному. В одном варианте осуществления данного изобретения, рак молочной железы представляет собой протоковую аденокарциному. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, такие способы включают введение анти-В7-Н4 антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, представленного в данном документе, или фармацевтической композиции, анти-В7-Н4 содержащей антитело его антигенсвязывающий фрагмент, или предоставленные в данном документе, пациенту (например, пациенту-человеку), нуждающемуся в этом. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, рак представляет собой рак, экспрессирующий В7-Н4.

[00292] В определенном варианте осуществления данного изобретения, в данном документе представлен способ лечения рака, который является неадекватным респондером ингибитора PD-1/PD-L1. Рак, который является неадекватным респондером ингибитора PD-1/PD-L1, мог ранее реагировать на ингибитор PD-1/PD-L1, но мог стать менее чувствительным к ингибитору PD-1/PD-L1, или рак, возможно, никогда не отвечал на

ингибитор PD-1/PD-L1. Неадекватный ответ на ингибитор PD-1/PD-L1 означает, что аспекты рака, которые, как ожидается, должны улучшиться после стандартной дозы ингибитора PD-1/PD-L1, не улучшаются, и/или улучшение происходит только в том случае, при дозе выше чем стандартная доза. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, субъект больной раком, который является неадекватным респондером на ингибитор PD-1/PD-L1, испытывал или испытывает неадекватный ответ на ингибитор PD-1/PD-L1 после получения стандартной дозы в течение по меньшей мере двух недель, по меньшей мере трех недель, по меньшей мере четырех недель, по меньшей мере шести недель или по меньшей мере двенадцати недель. «Стандартная» доза определяется медицинским работником и может зависеть от возраста, веса, анамнеза, тяжести заболевания, частоты введения и т. д. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, у субъекта больного раком, который представляет собой неадекватный респондер на ингибитор PD-1/PD-L1 испытывал или испытывает неадекватный ответ на анти-PD-1 антитело и/или анти-PD-L1 антитело. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, субъект больной раком, который является неадекватным респондером на ингибитор PD-1/PD-L1, испытывал или испытывает неадекватный ответ на АМР-224. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, субъект больной раком, который является неадекватным респондером на ингибитор PD-1/PD-L1, испытывал или испытывает неадекватный ответ на ингибитор PD-1/PD-L1, выбранный из ниволумаба, пембролизумаба и атезолизумаба.

[00293] В определенном варианте осуществления данного изобретения, в данном документе предлагается способ лечения рака, который экспрессирует низкий уровень PD-L1. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, рак, который экспрессирует «низкий уровень PD-L1» или экспрессирует «PD-L1 на низком уровне», обозначает, что уровень PD-L1 находится ниже уровня экспрессии для рака, который указан для лечения антагонистом PD-1 или PD-L1, в котором пациенты отбираются для лечения на основании уровней экспрессии PD-L1.В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, «низкий уровень PD-L1» представляет собой уровень, при котором менее 1 % клеток в опухоли имеют окрашивание мембраны. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, «низкий уровень» в отношении PD-L1 составляет менее 1 % окрашивания, например, 0,9, 0,8, 0,7, 0,6, 0,5, 0,4, 0,3, 0,2, 0,1 % или 0 % клеток опухоли окрашены. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, уровни экспрессии PD-L1 могут быть измерены с помощью хромогенной ИГХ или иммунофлуоресцентной ИГХ (Aqua scoring). В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, окрашивание PD-L1 на 5 % или менее (включая опухоль и/или иммунные клетки) может

указывать на то, что образец экспрессирует «низкий уровень PD-L1». В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, окрашивание PD-L1 на 10 % или менее (включая опухоль и/или иммунные клетки) может указывать на то, что образец экспрессирует «низкий уровень PD-L1». Если здесь не указано иное, в данном документе используется 5 %-ный порог (т. е. 5 % или менее означает «низкий уровень PD-L1»).

В другом варианте осуществления данного изобретения, анти-В7-Н4 антитело [00294] или его антигенсвязывающий фрагмент или фармацевтическую композицию вводят пациенту (например, пациенту-человеку), у которого диагностирован рак, чтобы увеличить пролиферацию Т-клеток, CD4+ Т-клеток или CD8+ Т-клеток у пациента. В другом варианте осуществления данного изобретения, анти-В7-Н4 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент или фармацевтическую композицию вводят пациенту (например, пациентучеловеку), у которого диагностирован рак, для увеличения продукции интерферона-гамма (ИФНу) у пациента. В другом варианте осуществления данного изобретения, анти-В7-Н4 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент или фармацевтическую композицию вводят пациенту (например, пациенту-человеку), у которого диагностирован рак, чтобы блокировать ингибирующую активность В7-Н4 против Т-клеток у пациента. В другом варианте осуществления данного изобретения, анти-В7-Н4 антитело антигенсвязывающий фрагмент или фармацевтическую композицию вводят пациенту (например, пациенту-человеку), у которого диагностирован рак, чтобы деплетировать В7-Н4 экспрессирующие раковые клетки у пациента.

[00295] В других вариантах осуществления данного изобретения, анти-В7-Н4 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент или фармацевтическую композицию вводят пациенту, как указано выше, и дополнительно в комбинации с дополнительным терапевтическим агентом, например химиотерапевтическим агентом или иммуностимулирующим агентом, таким как ингибитор контрольной точки Т-клеток.

[00296] В иллюстративном варианте осуществления данного изобретения, дополнительный терапевтический агент представляет собой антагонист PD-1, такой как антагонистическое анти-PD-1 антитело. Подходящие анти-PD-1 антитела включают, например, OPDIVO (ниволумаб), KEYTRUDA (пембролизумаб) или MEDI-0680 (AMP-514; WO2012/145493). Подходящие анти-PD-1 антитела также включают, например, камрелизумаб (SHR-1210), тизелизумаб (BGB-A317) или спартализумаб (NPVPDR001, NVS240118, PDR001). Дополнительный терапевтический агент может также включать пидилизумаб (CT-011). Рекомбинантный белок, состоящий из внеклеточного домена PD-L2 (В7-DC), слитого с Fс-частью IgG1, называемый AMP-224, также может быть использован для антагонизма рецептора PD-1.

[00297] В другом иллюстративном варианте осуществления данного изобретения, дополнительный терапевтический агент представляет собой антагонист PD-L1, такой как антагонистическое антитело к PD-L1. Подходящие антитела к PD-L1 включают, например, TECENTRIQ (атезолизумаб), дурвалумаб (MEDI4736), BMS-936559 (WO2007/005874), MSB0010718C (WO2013/79174) или rHigM12B7.

В еще одном иллюстративном варианте осуществления данного изобретения, [00298] дополнительный терапевтический агент представляет собой агонист GITR, такой как агонистическое антитело GITR. Подходящие антитела к GITR включают, например, TRX-518 (WO06/105021, WO09/009116), MK-4166 (WO11/028683) или антитело GITR, описанное в WO2015/031667. В другом варианте осуществления данного изобретения, дополнительный терапевтический агент представляет собой антитело GITR, описанное в WO2017/015623. В конкретном варианте осуществления данного изобретения, антитело GITR выбрано из: a) антитела, содержащего домен, связывающий GITR (GITR-BD), содержащий CDR1, содержащий последовательность из SEQ ID NO: 411, CDR2, содержащий последовательность из SEQ ID NO: 412, и CDR3, содержащий последовательность из SEQ ID NO: 413; b) антитела, содержащего GITR-BD, содержащее последовательность из SEQ ID NO: 414; с) четырехвалентной молекулы, содержащей две копии полипептида, имеющего структуру (GITR-BD)-линкер-(GITR-BD)-линкер-шарнир-Fc, где (i) GITR-BD содержит CDR1, содержащий последовательность из SEQ ID NO: 411, CDR2, содержащий последовательность из SEQ ID NO: 412, и CDR3, содержащий последовательность из SEQ ID NO: 413, (ii) линкер представляет собой полипептид, (iii) шарнир представляет собой полипептид, полученный из шарнирного участка иммуноглобулина и (iv) Fc представляет собой полипептид Fc иммуноглобулина; d) четырехвалентной молекулы, содержащей две копии полипептида, имеющего структуру (GITR-BD)-линкер-(GITR-BD)-линкер-шарнир-Fc, (i) **GITR-BD** содержит где аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 414, (ii) линкер представляет собой полипептид, (ііі) шарнир представляет собой полипептид, полученный из шарнирного участка иммуноглобулина, и (iv) Fc представляет собой полипептид Fc иммуноглобулина; и е) четырехвалентной молекулы, содержащей две копии полипептида, содержащего последовательность из SEQ ID NO:415. В любом из приведенных выше вариантов осуществления четырехвалентной молекулы шарнир может содержать последовательность из SEQ ID NO: 416, 417 или 418. В любом из приведенных выше вариантов осуществления четырехвалентной молекулы линкер содержать аминокислотную может последовательность, выбранную из GG, GGG и SEQ ID NO: 419-425. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, шарнир содержит SEQ ID NO: 417, и

линкер содержит любую из SEQ ID NO: 419-423.

[00299] В еще одном иллюстративном варианте осуществления данного изобретения, дополнительный терапевтический агент представляет собой внеклеточный домен CD80 (ECD CD80), например, SEQ ID NO: 426; или слитую молекулу CD80 ECD, содержащую CD80 ECD и партнера по слиянию, как описано в WO2017/079117. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, слитая молекула CD80 ECD представляет собой слитый белок CD80 ECD-Fc. В конкретном варианте осуществления данного изобретения, слитый белок CD80 ECD-Fc содержит последовательность из SEQ ID NO: 427 или 428.

[00300] В еще одном примерном варианте осуществления данного изобретения, дополнительный терапевтический агент представляет собой анти-CSF1R антитело, описанное в США 8182813, США 8206715, США 8263079, США 8513199 или США 9221910. В конкретном варианте осуществления данного изобретения, анти-CSF1R антитело выбрано из: а) антитела, содержащего тяжелую цепь, содержащую последовательность из SEQ ID NO: 429, и легкую цепь, содержащую последовательность из SEQ ID NO: 430; b) антитела, содержащего тяжелую цепь, содержащую участок определяющий комплементарность 1 (CDR1) тяжелой цепи (HC), содержащий последовательность из SEQ ID NO: 431, CDR2 HC, содержащий последовательность из SEQ ID NO: 433, и легкую цепь, содержащую CDR1 легкой цепи (LC), содержащую последовательность из SEQ ID NO: 435, и CDR3 LC, содержащую последовательность из SEQ ID NO: 435, и CDR3 LC, содержащую последовательность из SEQ ID NO: 436; и с) антитела, содержащего тяжелую цепь, содержащую последовательность из SEQ ID NO: 437, и легкую цепь, содержащую последовательность из SEQ ID NO: 437, и легкую цепь, содержащую последовательность из SEQ ID NO: 438.

[00301] Обычно пациентом является человек, но отличное от человека млекопитающие, включая трансгенных млекопитающих, также может быть подвергнуто лечению.

некоторых вариантах осуществления данного изобретения, [00302] данное изобретение относится к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту или фармацевтической композиции, предоставленной в данном документе для применения в качестве лекарственного средства. В некоторых аспектах данное изобретение относится к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту или фармацевтической композиции, предоставленной в данном документе, для использования в способе лечения рака. В изобретение К антителу некоторых аспектах данном относится или антигенсвязывающему фрагменту или фармацевтической композиции, представленной в данном документе, для применения в способе лечения рака у субъекта, включающем введение субъекту эффективного количества антитела или его антигенсвязывающего

фрагмента или фармацевтической композиции, представленной в данном документе.

### 1.4.1.1 Пути введения и дозировка

[00303] Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент или композиция, описанные в данном документе, могут быть доставлены субъекту различными путями, такими как парентеральный, подкожный, внутривенный, внутрикожный, трансдермальный, интраназальный, внутриопухолевый и введение в дренирующий опухоль лимфатический узел. В одном варианте осуществления данного изобретения, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент или композицию вводят внутривенным путем.

[00304] Количество антитела или его антигенсвязывающего фрагмента или композиции, которые будут эффективны при лечении состояния, будет зависеть от природы заболевания. Точная доза для применения в композиции также будет зависеть от пути введения и серьезности заболевания.

# 1.4.2 Обнаружение и диагностические применения

[00305] Анти-В7-Н4 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в данном документе (см., например, раздел 5.2), можно использовать для анализа уровней белка В7-Н4 в биологическом образце с использованием классических способов, известных специалистам в данной области, включая иммуноанализы, такие как иммуноферментный анализ (ИФА), иммунопреципитация или вестерн-блоттинг. Подходящие метки для анализа антител известны в данной области и включают ферментные метки, такие как глюкозооксидаза; радиоизотопы, такие как йод (125І, 121І), углерод (14С), сера (35Ѕ), тритий (3H), индий (121In) и технеций (99Tc); люминесцентные метки, такие как люминол; и флуоресцентные метки, такие как флуоресцеин и родамин, и биотин. Такие метки могут быть использованы для метки антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, описанного данном документе. Альтернативно, второе антитело антигенсвязывающий фрагмент, который распознает анти-В7-Н4 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в данном документе, могут быть помечены и использованы в сочетании с анти-В7-Н4 антителом или его антигенсвязывающим фрагментом для определения уровней белка В7-Н4.

[00306] Предполагается, что анализ уровня экспрессии белка В7-Н4 включает качественное или количественное измерение или оценку уровня белка В7-Н4 в первом биологическом образце либо напрямую (например, путем определения или оценки абсолютного уровня белка), либо относительно (например, по сравнению с уровнем белка, связанным с заболеванием, во втором биологическом образце). Уровень экспрессии полипептида В7-Н4 в первом биологическом образце может быть измерен или оценен и

сравнен со стандартным уровнем белка B7-H4, причем стандарт берется из второго биологического образца, полученного от индивидуума, не имеющего расстройства, или определяется путем усреднения уровней от популяции индивидуумов, не имеющих расстройства. Как будет понятно в данной области техники, когда известен «стандартный» уровень полипептида B7-H4, его можно многократно использовать в качестве стандарта для сравнения.

[00307] Используемый в данном документе термин «биологический образец» относится к любому биологическому образцу, полученному от субъекта, клеточной линии, ткани или другого источника клеток, потенциально экспрессирующих В7-Н4. Способы получения биопсии тканей и биологических жидкостей животных (например, людей) хорошо известны в данной области. Биологические образцы включают периферические мононуклеарные клетки крови. Биологический образец также может представлять собой образец крови, в котором циркулирующие опухолевые клетки (или «СТС») могут экспрессировать В7-Н4 и обнаруживаться.

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

[00309] Анти-В7-Н4 антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, описанные в данном документе, могут нести обнаруживаемую или функциональную метку. Когда используются флуоресцентные метки, доступная в данное время микроскопия и флуоресцентно-активированный анализ сортировщика клеток (FACS) или комбинация обоих методов, известных в данной области техники, могут быть использованы для идентификации и количественного определения специфических связывающих элементов. Анти-В7-Н4 антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, описанные в данном

документе, могут нести флуоресцентную метку. Иллюстративные флуоресцентные метки включают, например, реактивные и конъюгированные зонды, например, аминокумарин, флуоресцеин и техасский красный, красители Alexa Fluor, красители Су и красители DyLight.Анти-В7-Н4 антитело может нести радиоактивную метку, такую как изотопы 3H, 14C, 32P, 35S, 36Cl, 51Cr, 57Co, 58Co, 59Fe, 67Cu, 90Y, 99Tc, 111In, 117Lu, 121I, 124I, 125I, 131І, 198Аu, 211Аt, 213Вi, 225Ас и 186Re. Когда используются радиоактивные метки, доступные в данное время процедуры подсчета, известные в данной области, могут использоваться для идентификации и количественного определения специфического связывания анти-В7-Н4 антитела или антигенсвязывающего фрагмента с В7-Н4 (например, В7-Н4 человека). В случае, когда метка представляет собой фермент, обнаружение может быть выполнено любым из используемых в данное время колориметрических, спектрофотометрических, флуороспектрофотометрических, амперометрических газометрических методов, известных в данной области техники. Это может быть достигнуто путем контакта образца или контрольного образца с анти-В7-Н4 антителом или его антигенсвязывающим фрагментом в условиях, которые позволяют образовать комплекс между антителом или его антигенсвязывающим фрагментом и В7-Н4. Любые комплексы, образованные между антителом или его антигенсвязывающим фрагментом и В7-Н4, выявляют и сравнивают в образце и контроле. В свете специфического связывания антител или их антигенсвязывающих фрагментов, описанных в данном документе, для В7-Н4, антитела или их антигенсвязывающие фрагменты можно использовать для специфического выявления экспрессии В7-Н4 на поверхности клеток. Описанные в данном документе антитела или их антигенсвязывающие фрагменты также можно использовать для очистки В7-Н4 с помощью иммуноаффинной очистки.

[00310] Также в данный документ включена система анализа, которая может быть приготовлена в форме набора для анализа для количественного анализа степени присутствия, например, В7-Н4. Система или набор для тестирования могут содержать меченый компонент, например, меченое антитело или антигенсвязывающий фрагмент, и один или более дополнительных иммунохимических реагентов. См., например, раздел 5.6 ниже для получения дополнительной информации о комплектах.

[00311] Также в данном документе представлен способ обнаружения В7-Н4 в образце, включающий приведение в контакт указанного образца с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, предоставленный в данном документе. В некоторых аспектах в данном документе предлагается использование антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, представленного в данном документе, для обнаружения in vitro В7-Н4 в образце. В одном аспекте в данном документе представлено антитело или

его антигенсвязывающий фрагмент или фармацевтическая композиция, предоставленная в данном документе, для использования при обнаружении В7-Н4 у субъекта или в образце, полученном от субъекта. В одном аспекте в данном документе представлено антитело или его антигенсвязывающий фрагмент или фармацевтическая композиция, предоставленная в данном документе для использования в качестве диагностики. В одном предпочтительном варианте осуществления данного изобретения, антитело содержит обнаруживаемую метку. В одном предпочтительном варианте осуществления данного изобретения, В7-Н4 представляет собой В7-Н4 человека. В одном предпочтительном варианте данного изобретения, субъектом является человеком.

# 1.5 Наборы

[00312] В данном документе предоставлены наборы, содержащие одно или более антител или их антигенсвязывающих фрагментов, описанных в данном документе, или их конъюгаты. В конкретном варианте осуществления данного изобретения, в данном документе предоставляется фармацевтическая упаковка или набор, содержащий один или более контейнеров, заполненных одним или более ингредиентами фармацевтических композиций, описанных в данном документе, такими как одно или более антител или их антигенсвязывающих фрагментов, представленных в данном документе. При желании с таким контейнером(ами) может быть связано уведомление в форме, предписанной правительственным агентством, регулирующим производство, использование или продажу фармацевтических препаратов или биологических продуктов, причем это уведомление отражает одобрение агентства по производству, использованию или продаже для введения человеку.

[00313] В данном документе также представлены наборы, которые можно использовать в диагностических способах. В одном варианте осуществления данного изобретения, набор содержит антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в данном документе, предпочтительно очищенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, в одном или более контейнерах. В конкретном варианте осуществления данного изобретения, описанные в данном документе наборы содержат по существу выделенный антиген В7-Н4 (например, В7-Н4 человека), который можно использовать в качестве контроля. В другом конкретном варианте осуществления данного изобретения, описанные в данном документе наборы дополнительно содержат контрольное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые не реагируют с антигеном В7-Н4. В другом конкретном варианте осуществления данного изобретения, описанные в данном документе

наборы содержат один или более элементов для обнаружения связывания антитела или его антигенсвязывающего фрагмента с антигеном В7-Н4 (например, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент могут быть конъюгированы с детектируемым субстратом флуоресцентное соединение, ферментативный субстрат, радиоактивное соединение люминесцентное соединение или второе антитело антигенсвязывающий фрагмент, которые распознают первое антитело ИЛИ его антигенсвязывающий фрагмент, могут быть конъюгированы с детектируемым субстратом). В конкретных вариантах осуществления данного изобретения, набор, представленный в данном документе, может содержать рекомбинантный или химически синтезированный антиген В7-Н4. Антиген В7-Н4, представленный в наборе, также может быть прикреплен к твердой подложке. В более конкретном варианте осуществления данного изобретения, средство обнаружения описанного выше набора включает твердую подложку, к которой присоединен антиген В7-Н4. Такой набор также может содержать неприкрепленное меченое репортером анти-человеческое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент или анти-мышиной/крысиное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент. В этом варианте осуществления данного изобретения, связывание антитела антигенсвязывающего фрагмента с антигеном В7-Н4 можно обнаружить путем связывания указанного репортерно-меченного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента.

[00314] Следующие примеры предлагаются в качестве иллюстрации, а не в качестве ограничения.

#### ПРИМЕРЫ

[00315] Примеры в этом разделе (то есть в разделе 6) предлагаются в качестве иллюстрации, а не в качестве ограничения.

# Пример 1: Оценка распространенности экспрессии B7-H4 при разных диагнозах

[00316] Мышиное моноклональное антитело B7-H4 A57.1 (каталог ATCC № PTA-5180) использовали для обнаружения присутствия B7-H4 в архивных образцах, смеси целых срезов и микрочипах опухоли. Образцы обрабатывали первичным антителом и детектировали с использованием системы обнаружения полимера, присоединенной к DAB (Ventana Medical Systems).

[00317] В7-Н4 легко обнаруживался в мембране, а цитозоль в опухолевых тканях собирался у различных больных раком, включая инвазивный протоковый рак, тройной негативный рак молочной железы, рак яичников, немелкоклеточный рак легких и рак эндометрия. (Фиг. 1). Кроме того, частота экспрессий также была высокой в показаниях,

перечисленных в Таблице 11.

Таблица 11: Обнаружение В7-Н4 в опухолях

Тип опухоли	Общее	Количество	Процент
	количеств	положительны	положительны
	o	X	x
Тройной	74	58	78 %
негативный рак			
молочной железы			
Инвазивная	51	38	74,50 %
протоковая			
карцинома			
Карцинома	77	54	70 %
эндометрия			
Рак яичников	141	85	60 %
Немелкоклеточны	47	19	40 %
й рак легких			
(плоскоклеточный			
)			

[00318] В7-Н4 экспрессируется при других формах рака, таких как рак почки (например, почечно-клеточный рак), рак мочевого пузыря (например, рак уротелиальной клетки), рак поджелудочной железы и рак щитовидной железы. См., например, Zhu, J., et al., Asian Pacific J. Cancer Prev.14:3011-3015 (2011), Krambeck A, et al., PNAS 103:10391-10396 (2006), Fan, M. et al., Int. J. Clin.Exp. Pathol.7:6768-6775 (2014), Xu, H., et al., Oncology Letters 11:1841-1846 (2016), and Liu, W., et al., Oncology Letters 8:2527-2534 (2014).

[00319] В последующем эксперименте распространенность В7-Н4 в различных типах опухолей оценивали с помощью иммуногистохимии (ИГХ) (Фиг. 1В). Были протестированы следующие типы опухолей и стадии заболевания: эндометриальная, инвазивная карцинома протоков молочной железы (IDC), тройной негативный рак молочной железы (поздняя стадия), рак яичников, рак мочевого пузыря (ранняя стадия), немелкоклеточный рак легкого (пл. (плоскоклеточный), ранняя стадия), немелкоклеточный рак легкого (пл. поздняя стадия), рак головы и шеи, мочевого пузыря (поздняя стадия), мелкоклеточный рак легкого, холангиокарцинома, немелкоклеточный рак легкого (ад. (аденокарцинома)), рак щитовидной железы, рак поджелудочной железы, рак желудка, меланома, глиобластома

или мультиформная глиобластома (GBM) и карцинома меркеля. Экспрессию поверхностного белка В7-Н4 на опухолевых клетках оценивали на закупленных образцах опухолей от различных типов опухолей и стадий заболевания, где это возможно (ранняя стадия (I/II), поздняя стадия (III/IV)). Интенсивность ИГХ с антителом А57.1 оценивалась по категориям от 0 до 3, и образцы были отнесены к одному баллу ИГХ по наибольшей интенсивности, наблюдаемой у как минимум 10 % всех опухолевых клеток на весь разрез. Всего было оценено от 50 до 100 образцов на тип опухоли.

# Пример 2: Получение новых антител против В7-Н4 человека

[00320] В7-Н4-специфичные антитела выделяли из полноразмерных библиотек наивных антител человека IgG1 с использованием системы презентации дрожжей *in vitro*. Библиотеки предназначены для имитации иммунной системы; они не содержат заранее определенных пар тяжелых и легких цепей. Библиотеки были подвергнуты множеству раундов стратегий позитивного и негативного отбора с использованием белка В7-Н4 для обогащения IgG, которые перекрестно реагировали с мишенью В7-Н4 человека, яванского макака и мыши. После четырех раундов отбора полученые IgG секвенировали, и были получены уникальные антитела, которые были оценены как по аффинному, так и по аффинности мономерного связывания с рекомбинантным эктодоменом В7-Н4, для связывания эпитопа и для специфического связывания клеток-мишеней.

[00321] Более подробное описание способов отбора, созревания аффинности и анализа, которые использовались для генерации и характеристики антител к В7-Н4, приводится ниже.

#### Материалы и способы

[00322] Антигены были биотинилированы с использованием набора EZ-Link Sulfo-NHS-Biotinylation от Pierce. F(ab') 2 анти-человеческий каппа-FITC (LC-FITC) козы, ExtrAvidin-PE (EA-PE) и стрептавидин-AF633 (SA-633) были получены от Southern Biotech, Sigma и Molecular Probes соответственно. Разделительные колонки со стрептавидином MicroBeads и MACS LC были приобретены у Miltenyi Biotec. Козий анти-человеческий IgG-PE (Human-PE) был получен от Southern Biotech.

#### Обнаружение наивных

[00323] Восемь наивных человеческих синтетических дрожжевых библиотек, каждая из  $\sim 10^9$  разнообразия, были размножены, как описано panee (см. Y.Xu et al., Addressing polyspecificity of antibodies selected from an in vitro yeast presentation system: a FACS-based, high-throughput selection and analytical tool. PEDS 26.10, 663-70 (2013); WO2009036379;

WO2010105256; и WO2012009568.) Для первых двух раундов отбора была проведена методика сортировки магнитными шариками с использованием системы Miltenyi MACS, как описано ранее (см. Siegel et al., High efficiency recovery and epitope-specific sorting of an scFv yeast display library." J Immunol Methods 286(1-2), 141-153 (2004).) Вкратце, дрожжевые клетки ( $\sim 10^{10}$  клеток/библиотека) инкубировали с 10 мл 10 нМ биотинилированного слитого Fc антигена в течение 30 мин при 30 °C в промывочном буфере (фосфатнобуферный солевой раствор (ФСБ)/0,1 % бычий сывороточный альбумин (БСА)). После однократной промывки 40 мл ледяного промывочного буфера осадок клеток ресуспендировали в 20 мл промывочного буфера и к дрожжам добавляли стрептавидиновые микрошарики (500 мкл) и инкубировали в течение 15 мин при 4 °C. Затем дрожжи осаждали, ресуспендировали в 20 мл промывочного буфера и загружали в колонку Miltenyi LS. После загрузки 20 мл колонку промывали 3 раза 3 мл промывочного буфера. Колонку затем удаляли из магнитного поля и дрожжи элюировали 5 мл питательной среды и затем выращивали в течение ночи. Следующие раунды отбора были выполнены с использованием проточной цитометрии. Приблизительно  $2 \times 10^7$  дрожжей осаждали, трижды промывали промывочным буфером и инкубировали при 30 °C либо с уменьшающимися концентрациями биотинилированного слитого Fc антигена (от 10 до 1 нМ) в равновесных условиях, 10 нМ биотинилированных слитых Fc антигенов различных видов для получения видовой перекрестной реактивности, или с реагентом для снижения полиспецифичности (PSR) для удаления неспецифических антител из отбора. Для деплетирования PSR библиотеки инкубировали с разведением 1:10 биотинилированного реагента PSR, как описано ранее (см. Y.Xu et al., Addressing polyspecificity of antibodies selected from an in vitro yeast presentation system: a FACS-based, high-throughput selection and analytical tool. PEDS 26.10, 663-70 (2013).) Затем дрожжи дважды промывали промывочным буфером и окрашивали LC-FITC (разбавленным 1:100) и либо SA-633 (разбавленным 1:500), либо EAPE (разбавленным 1:50) вторичными реагентами в течение 15 минут при 4 °C. После промывки дважды промывочным буфером клеточные осадки ресуспендировали в 0,3 мл промывочного буфера и переносили в пробирки с крышками с фильтром. Сортировку проводили с использованием сортировщика FACS ARIA (BD Biosciences) и определяли сортировочные ворота для отбора антител с желаемыми характеристиками. Отборочные раунды повторялись до тех пор, пока не была получена популяция со всеми желаемыми характеристиками. После последнего раунда сортировки дрожжи высевали и отбирали отдельные колонии для характеризации.

#### Оптимизация антитела

[00324] Оптимизацию антител проводили способом пакетной перестановки легкой цепи,

а затем путем введения различий в вариабельные участки тяжелой цепи и легкой цепи, как описано ниже. Комбинация некоторых из этих подходов была использована для каждого антитела.

[00325] Пакетная перестановка легкой цепи: Плазмиды тяжелой цепи из наивных результатов отбора экстрагировали из дрожжей посредством разбивания и захвата, размножали и затем очищали от E.coli и трансформировали в библиотеку легких цепей с разнообразием  $5 \times 10^6$ . Отборы выполнялись с одним раундом MACS и четырьмя раундами FACS с использованием тех же условий, что и наивное исследование.

[00326] Отбор CDRH1 и CDRH2:CDRH3 одиночного антитела рекомбинировали в предварительно созданную библиотеку с вариантами CDRH1 и CDRH2 с разнообразием 1 × 10<sup>8</sup>, и отбор проводили с одним раундом MACS и четырьмя раундами FACS, как описано в первоначальном открытии. Для каждого раунда FACS просматривали библиотеки на предмет связывания PSR, видовой перекрестной реактивности и давления аффинности, и проводили сортировку, чтобы получить популяцию с желаемыми характеристиками. Для этих отборов применяли аффинные давления с использованием снижающихся концентраций биотинилированного антигена HIS-B7-H4 (от 100 до 1 нМ) в условиях равновесия при 30 °C.

[00327] Отбор VH Mut: Вариабельный участок тяжелой цепи (VH) был мутагенизирован с помощью подверженной ошибкам ПЦР. Затем была создана библиотека путем трансформации этого мутагенизированного VH и вектора экспрессии тяжелой цепи в дрожжи, уже содержащие плазмиду легкой цепи родителя. Отборы осуществлялись аналогично предыдущим циклам с использованием сортировки FACS для двух раундов. Для каждого раунда FACS просматривали библиотеки на предмет связывания PSR и давления аффинности, и проводили сортировку, чтобы получить популяцию с желаемыми характеристиками. Давления аффинности для этих селекций выполняли, как описано выше в селекции CDRH1 и CDRH2.

[00328] Отбор CDRL1 и CDRL2: CDRL3 одиночного антитела рекомбинировали в предварительно созданную библиотеку с вариантами CDRL1 и CDRL2 с разнообразием  $\sim 5 \times 10^5$ , и отборы выполняли аналогично предыдущим циклам с использованием сортировки FACS в течение трех раундов. Для каждого раунда FACS просматривали библиотеки на предмет связывания PSR и давления аффинности, и проводили сортировку, чтобы получить популяцию с желаемыми характеристиками. Давления аффинности для этих селекций выполняли, как описано выше в селекции CDRH1 и CDRH2.

### Производство и очистка антител

[00329] Клоны дрожжей выращивали до насыщения и затем индуцировали в течение 48

ч при 30 °C при встряхивании. После индукции дрожжевые клетки осаждали и супернатанты собирали для очистки. IgG очищали с использованием колонки с белком A и элюировали уксусной кислотой, pH 2,0. Фрагменты Fab были получены путем расщепления папаином и очищены через KappaSelect (GE Healthcare LifeSciences).

## Измерения K<sub>D</sub> ForteBio

Измерения аффинности ForteBio проводили на Octet RED384, как правило, как [00330] описано ранее (см. Estep et al., High throughput solution-based measurement of antibody-antigen affinity and epitope binning. Mabs 5 (2), 270-278 (2013)). Вкратце, измерения аффинности ForteBio выполняли, загружая IgG онлайн на датчики AHQ. Датчики уравновешивали в автономном режиме в буфере для анализа в течение 30 минут и затем контролировали в режиме онлайн в течение 60 секунд для установления исходного уровня. Датчики с нагруженными IgG подвергали воздействию 100 нМ антигена в течение 3 минут, а затем переносили в буфер для анализа в течение 3 минут для измерения несоответствия. Для оценки моновалентной аффинности вместо IgG использовали Fab. Для этой оценки небиотинилированный слитый Fc антигена загружали в режиме онлайн на датчики АНО. Датчики уравновешивали в автономном режиме в буфере для анализа в течение 30 минут и затем контролировали в режиме онлайн в течение 60 секунд для установления исходного уровня. Датчики с загруженным антигеном подвергали воздействию 100 нМ Fab в течение 3 минут, а затем их переносили в буфер для анализа в течение 3 минут для измерения несоответствия. Кинетику анализировали с использованием модели связывания 1:1.

### ForteBio эпитоп-специфическая сортировка /блокирование лиганда

[00331] Эпитоп-специфическая сортировка/блокирование лиганда проводили с использованием стандартного перекрестного анализа сэндвич-формата. Контрольный IgG против мишени загружали на датчики AHQ, и незанятые Fc-связывающие сайты на датчике блокировали нерелевантным человеческим IgG1 антителом. Затем датчики подвергали воздействию 100 нМ целевого антигена, а затем второго антитела против мишени или лиганда. Дополнительное связывание вторым антителом или лигандом после ассоциации антигена указывает на незанятый эпитоп (не конкурент), тогда как отсутствие связывания указывает на блокирование эпитопа (конкурент или блокирование лиганда).

[00332] Четыре неконкурентных антитела («связывающие антитела» 1, 2, 3 и 4) были использованы для идентификации четырех отдельных частей эктодомена В7-Н4 с помощью SPR. Все антитела, сгенерированные во время этой кампании, были затем оценены на предмет конкурентного связывания с этими четырьмя связывающими антителами с эктодоменом В7-Н4. Если антитело В7-Н4 конкурировало с одним из четырех связывающих антител (например, связывающее антитело 1), было определено, что антитело

B7-H4 находится в этом BIN (например, BIN 1). Если антитело B7-H4 конкурировало с двумя из четырех связывающих антител (например, связывающими антителами 2 и 3), определяли, что антитело B7-H4 находится в обоих этих BIN (например, BIN2/3).

[00333] Антитела IgG попадали по меньшей мере в четыре связывающих группы, причем > 90 % антител связывались с B7-H4 человека/цино или мыши с аффинным ответом в диапазоне от > 0,1 нМ до < 100 нМ. Из рекомбинантных белковых связующих приблизительно 75 % также связываются с B7-H4 на клетках.

#### Анализ связывания клеток

[00334] 100000 клеток со сверхэкспрессией антигена промывали промывочным буфером и инкубировали с 100 мкл 100 нМ IgG в течение 5 минут при комнатной температуре. Затем клетки дважды промывали промывочным буфером и инкубировали с 100 мкл 1:100 античеловеческого IgGPE в течение 15 минут на льду. Затем клетки дважды промывали промывочным буфером и анализировали на анализаторе FACS Canto II (BD Biosciences).

#### Анализ связывания PSR

Анализ PSR проводили, как описано ранее (см. Xu Y, et al. (2013). Addressing polyspecificity of antibodies selected from an in vitro yeast presentation system: A FACS-based, high-throughput selection and analytical tool. Protein Eng Des Sel 26(10):663–670). Коротко говоря, растворимые мембранные белки получали из клеток СНО. Фракцию обогащенной мембраны биотинилировали с использованием NHS-LCBiotin (Pierce, Thermo Fisher). Этот полиспецифический реагент инкубировали с IgG-представляющими дрожжами с последующей промывкой. Затем к смеси добавляли вторичную смесь для мечения (Экстравидин-R-PE, анти-человеческий LC-FITC И йодид пропидия). Образцы анализировали на анализаторе FACSCanto II (BD Biosciences) с использованием инжектора образцов HTS. Данные проточной цитометрии были проанализированы на среднюю интенсивность флуоресценции (MFI) в канале R-PE для оценки неспецифического связывания. Значения MFI были нормализованы от 0 до 1 на основе трех эталонных антител, демонстрирующих низкие, средние и высокие значения MFI PSR.

#### Динамическая сканирующая флуориметрия

[00336] 10 мкл 20х Sypro Orange добавляют к 20 мкл 0,2-1 мг/мл раствора мАт или Fab. Прибор RT-PCR (BioRad CFX96 RT PCR) используется для повышения температуры пластины для образца с 40 до 95 С с шагом 0,5 С, с уравновешиванием в течение 2 минут при каждой температуре. Негатив первой производной для необработанных данных используется для извлечения Тт.

#### AC-SINS

[00337] Анализ AC-SINS выполняли, как описано ранее (см. Liu Y, et al. (2014). High-

throughput screening for developability during early-stage antibody discovery using self-interaction nanoparticle spectroscopy. MAbs 6(2):483–492). Коротко говоря, наночастицы золота (Ted Pella Inc.) покрывали 80 % захватывающим Fc анти-человеческими IgG козы (Jackson ImmunoResearch) и 20 % поликлональными неспецифическими антителами козы (Jackson ImmunoResearch). Затем представляющие интерес антитела инкубировали с частицами в течение 2 часов и измеряли сдвиг длины волны, используя Molecular Devices SpectraMax M2 с программным обеспечением SoftMax Pro6. Самовзаимодействующие клоны демонстрируют более высокий сдвиг длины волны от образца ФСБ.

# Пример 3: Структурная характеристика человеческих моноклональных антител против B7-H4

[00338] Антитела В7-Н4 являются изотипом IgG1/каппа человека. Тяжелые вариабельные участки (VH) состоят из аллелей из генов зародышевой линии VH1, VH3 и VH4 и вариабельных легких (VL) из аллелей из генов зародышевой линии, которые включают Vk1 и Vk3. Некоторые подмножества антител имеют высокую идентичность в соответствующих участках CDR VH и VL, которая может составлять от 72 до 100 %. Антитела, которые имеют один и тот же аллель зародышевой линии, имеют высокую идентичность в своих каркасных (FR) участках VH и VL, которая колеблется в пределах 88-100 %. Последовательности антител к В7-Н4 представлены в Таблицах 1-10.

# Пример 4: Характеризация связывания моноклональных антител с белком В7-Н4

[00339] Аффинность связывания анти-В7-Н4 антител с внеклеточным доменом В7-Н4 (ЕСD) определяли с помощью интерферометрии биослоя (ВLI). Анализы аффинности ForteBio более подробно описаны выше в Примере 2. Вкратце, рекомбинантный белок В7-Н4-huIgG1 человека (SEQ ID NO: 409) иммобилизовали на кончиках белка А с последующим изотипическим контролем hIgG1 для насыщения любых оставшихся сайтов связывания на кончике захвата. Анти-В7-Н4 антитела затем оценивали на связывание. Кроме того, связывание антитела с В7-Н4 яванского макака (SEQ ID NO:2) и мыши (SEQ ID NO:3) было также оценено с использованием того же протокола. Результаты суммированы в Таблице 12.

# B7-H4-huIgG1:

MASLGQILFWSIISIIIILAGAIALIIGFGISGRHSITVTTVASAGNIGEDGILSCTFEPDIKLSD IVIQWLKEGVLGLVHEFKEGKDELSEQDEMFRGRTAVFADQVIVGNASLRLKNVQLTD AGTYKCYIITSKGKGNANLEYKTGAFSMPEVNVDYNASSETLRCEAPRWFPQPTVVWA SQVDQGANFSEVSNTSFELNSENVTMKVVSVLYNVTINNTYSCMIENDIAKATGDIKVT ESEIKRRSHLQLLNSKASGSEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTP EVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEA LHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:409)

Таблица 12: Связывание антитела В7-Н4 с внеклеточным доменом с помощью интерферометрии биослоя

		B7-H4	человека		B7-H4	ява 4	нского	B7-H4	мыши	
					макак	макака:				
Антите	BIN	K <sub>D</sub>	kon	k <sub>off</sub>	K <sub>D</sub>	kon	k <sub>off</sub>	K <sub>D</sub>	kon	k <sub>off</sub>
ло		(M)	(1/Mc)	(1/c)	(M)	(1/Mc)	(1/c)	(M)	(1/Mc)	(1/c)
15441	2	7,15	1,22E+	8,72	5,46	1,33E+	7,27	NB	-	-
		E-09	06	E-03	E-08	06	E-02			
15461	2/3	6,29	3,81E+	2,40	6,21	4,34E+	2,70	5,57	3,05E+	1,70
		E-08	05	E-02	E-08	05	E-02	E-08	05	E-02
15462	2/3	PF	-	-	6,65	6,72E+	4,47	8,31	4,59E+	3,81
					E-08	05	E-02	E-08	05	E-02
15465	2/3	5,13	4,84E+	2,48	5,11	5,44E+	2,78	8,96	2,96E+	2,65
		E-08	05	E-02	E-08	05	E-02	E-08	05	E-02
15472	4	7,11	7,00E+	4,97	7,80	7,46E+	5,82	3,80	4,22E+	1,60
		E-09	05	E-03	E-09	05	E-03	E-08	05	E-02
15478	4	3,25	4,77E+	1,55	3,11	5,44E+	1,69	NB	-	-
		E-08	05	E-02	E-08	05	E-02			

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

	E-09	05	E-04	E-09	05	E-04	E-09	05	E-04

[00340] Кроме того, аффинность связывания выбранных анти-В7-Н4 антител с N-концевым доменом B7-H4 человека (B7-H4 IgV-huIgG1; SEQ ID NO: 410) определяли с помощью поверхностного плазмонного резонанса (SPR). Вкратце, Fab анти-человеческого антитела иммобилизовали на поверхности SPR-чипа, дериватизированного карбоксилом, и анти-В7-H4 антитело захватывали на полученной поверхности при 5 мкг/мл в течение 30 секунд. IgV-huIgG1 B7-H4 в различных концентрациях (0 нМ, 3,7 нМ, 11,1 нМ, 33,3 нМ, 100 нМ и 300 нМ) затем пропускали через поверхность и позволяли связываться с анти-В7-Н4 антителами во время ассоциации фазы с последующей промывкой буфера во время фазы диссоциации. Данные подгоняли, используя модель связывания 1:1, и результаты суммированы в Таблице 13.

## IgV-huIgG1 B7-H4:

MASLGQILFWSIISIIIILAGAIALIIGFGISGRHSITVTTVASAGNIGEDGILSCTFEPDIKLSD IVIQWLKEGVLGLVHEFKEGKDELSEQDEMFRGRTAVFADQVIVGNASLRLKNVQLTD AGTYKCYIITSKGKGNANLEYKTGAFSGSEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKP KDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQV SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:410)

Таблица 13: Связывание антитела В7-Н4 с N-концевым доменом посредством поверхностного плазмонного резонанса

		В7-Н4 человека						
Антитело	BIN	K <sub>D</sub> (M)	k <sub>on</sub> (1/Mc)	k <sub>off</sub> (1/c)				
15461	2/3	3,04E-08	1,71E+05	5,19E-03				
15462	2/3	1,69E-08	2,95E+05	4,98E-03				
15465	2/3	1,73E-08	2,41E+05	4,17E-03				
15483	2/3	1,84E-08	2,41E+05	4,43E-03				
15489	2/3	2,37E-08	1,64E+05	3,89E-03				
20502	3	2,03E-09	1,78E+05	3,61E-04				

[00341] Таким образом, множественные анализы демонстрируют, что антитела

связываются с В7-Н4.

# Пример 5: Эпитопное картирование

[00342] Группы для связывания анти-В7-Н4 антител определяли с помощью биослойной интерферометрии (BLI). Анализы картирования эпитопов более подробно описаны выше в Примере 2. Вкратце, первое анти-В7-Н4 антитело было захвачено на кончиках белка A, а затем контрольное антитело huIgG1 для насыщения дополнительных сайтов связывания на кончиках. Затем сенсорные кончики подвергали воздействию антигена (B7-H4-huIgG1) (SEQ ID NO: 409), а затем второго анти-В7-Н4 антитела, которое затем оценивали на связывание. Эпитопные группы определяли путем сравнения со связыванием после того, как не-В7-Н4-антитело использовали в качестве первого антитела. Результаты суммированы в Таблице 12.

# Пример 6: Характеризация связывания моноклональных антител с В7-Н4, экспрессируемыми на поверхности клеток

[00343] Клеточные линии НЕК293Т трансфицировали для экспрессии полноразмерного В7-Н4 человека, яванского макака, мыши или крысы. Кроме того, эндогенная человеческая В7-Н4-экспрессирующая клеточная линия рака молочной железы SK-BR-3 была использована для оценки способности антител связываться с В7-Н4, экспрессируемыми на поверхности клетки. 1 × 10<sup>5</sup> родительских клеточных линий НЕК293Т или трансфицированных НЕК293Т инкубировали с 100 нМ антител В7-Н4. После инкубации клетки осаждали, промывали и инкубировали со вторичным меченым антителом, и образцы собирали на проточном цитометре. Кратность связывания по родительской клеточной линии (FOP) рассчитывали следующим образом: МFI-трансфицированные клетки НКЕ293Т/МFI-родительские клетки НЕК293Т.Считалось, что значение FOP больше 10 демонстрирует специфическое связывание.

[00344] Чтобы оценить активность связывания клеток антителами B7-H4,  $1 \times 10^5$  клеток SK-BR-3 или клеток 293, трансфицированных для экспрессии B7-H4 яванского макака, мышей или крыс, инкубировали с титрующими дозами антител B7-H4. После инкубации клетки осаждали, промывали и инкубировали со вторичным меченым антителом, и образцы собирали на проточном цитометре. Данные анализировали с использованием программного обеспечения FlowJo, и MFI наносили на график в зависимости от концентрации антител. Активность связывания клеток EC50 рассчитывали с использованием подгонки кривой

нелинейной регрессии (GraphPad Prism).

[00345] Все антитела В7-Н4 продемонстрировали связывание с клетками НЕК293Т, которые экспрессировали В7-Н4 человека, В7-Н4 яванского макака или В7-Н4 мыши. Антитела также продемонстрировали сильное дозозависимое связывание с клетками SK-BR-3, эндогенно экспрессирующими В7-Н4 человека на клеточной поверхности или клеточными линиями НЕК293Т, трансфицированными для экспрессии В7-Н4 яванского макака, мыши или крысы на клеточной поверхности. Эти данные демонстрируют, что большинство антител В7-Н4 полностью перекрестно-реактивно реагируют с В7-Н4 яванского макака, мышей и крыс (Фиг. 2А и Фиг. 2В, Таблица 14).

Таблица 14: В7-Н4 антитело, связывающееся с клеточной поверхностью В7-Н4

Антитело	BIN	293-	293-	293-	SK-	293-	293-	293-
		huB7-	cynoB7-	moB7-	BR-3	cynoB7-	мышьВ7-	крысаВ7-
		H4	H4	H4	(EC50;	H4	H4	H4
		(FOP)	(FOP)	(FOP)	нМ)	(EC50;	(EC50;	(EC50;
						нМ)	нМ)	нМ)
15441	2	67	9	3	34,29	ND	ND	ND
15461	2/3	333	610	887	5,66	6,77	6,37	1,67
15462	2/3	530	416	456	4,55	5,29	5,40	1,13
15465	2/3	626	1324	690	2,13	4,90	5,34	1,47
15472	4	580	1279	685	8,86	-	-	-
15478	4	518	1130	125	PF	-	-	-
15483	2/3	805	1012	1402	14,81	17,4	8,82	1,87
15489	2/3	612	1118	674	31,73	13,7	17,5	4,55
15495	2	619	524	6	61,2	-	-	-
15503	2	289	877	5	PF	-	-	-
20496	Другой	179	758	604	7,60	7,91	6,70	ND
20500	3	182	630	478	1,54	3,38	4,00	1,14
20501	3	205	728	546	1,90	3,89	4,67	1,15
20502,1	3	200	683	559	2,50	4,94	5,57	1,26

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

Для того чтобы охарактеризовать активность блокады Т-клеточной контрольной [00347] точки антител В7-Н4, первичные Т-клетки человека были обогащены мононуклеарными клетками периферической крови (МКПК) с использованием набора для обогащения Тклеток EasySep<sup>тм</sup> человека в соответствии с инструкциями производителя. Обогащенные T-клетки инкубировали при  $2\times10^5$  клеток/мл с анти-CD3/анти-CD28 Dynabeads, в соотношении один шарик на клетку, при 37 °C. Через шесть дней шарики магнитно удаляли, а Т-клетки промывали и инкубировали при  $1\times10^6$  клеток/мл с 10 ед/мл ИЛ-2 при 37 °C. Через четыре дня Т-клетки промывали и инкубировали в концентрации  $1 \times 10^6$  клеток/мл вместе с искусственными антигенпрезентирующими клетками (иАПК) в концентрации  $2 \times 10^6$  клеток/мл при 37 °C в присутствии 10 мкг/мл антитела или титрования дозы антитела. иАПК представляют собой клеточную линию НЕК293Т, которая была трансфицирована для совместной экспрессии формата scFv анти-человеческого CD3-клона ОКТ3 и полноразмерного В7-Н4 человека на клеточной поверхности. иАПК обрабатывали митомицином С в течение одного часа при 37°C, а затем тщательно промывают перед добавлением к совместной культуре Т-клеток. Через 72 часа после совместного культивирования Т-клеток, иАПК и антитела В7-Н4 планшеты центрифугировали, супернатанты собирали и оценивали на продуцирование ИФНу с помощью ИФА, а клетки собирали и окрашивали для оценки пролиферации с помощью FACS (в частности, клетки в каждой лунке инкубировали с антителами против CD4 и CD8). Затем клетки промывали, фиксировали, пермеабилизировали и инкубировали с реагентом Edu-Click в соответствии с инструкциями производителя. Клетки отмывали и количество пролиферирующих CD4+, СD8+ или общего количества Т-клеток измеряли с помощью проточной цитометрии. Данные были проанализированы с использованием программного обеспечения FlowJo. Для образцов, обработанных только одной концентрацией антитела, данные были рассчитаны и представлены как кратное увеличение по сравнению с образцами, обработанными контрольным hulgG. Для образцов, обработанных дозы титрования антитела, график зависимости продукции ИФНу в зависимости от концентрации антитела и эффективность EC 50 рассчитывали с использованием подгонки кривой нелинейной регрессии (GraphPad Prism).

[00348] Все антитела BIN2/3 и BIN3 воспроизводимо приводили к активность блокады Т-клеточной контрольной точки, что измерялось по увеличению продукции ИФНγ и/или CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> или пролиферации общего количества Т-клеток. На Фиг. 3А продемонстрировано, что антитело 15441 увеличивает пролиферацию Т-клеток по меньшей мере на 3 % и увеличивает пролиферацию CD4+ и CD8+ Т-клеток по меньшей мере на 2 %. На Фиг. 3А также продемонстрировано, что антитело 15461 увеличивает пролиферацию Т-

клеток по меньшей мере на 21 %, увеличивает пролиферацию CD4+ T-клеток по меньшей мере на 9 % и увеличивает пролиферацию CD8+ T-клеток по меньшей мере на 11 %. На Фиг. 3B-3D продемонстрированы другие дозозависимые активности блокады T-клеточной контрольной точки.

Таблица 15: Антитело В7-Н4 - активность блокады Т-клеточной контрольной точки

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

Таблица 16: В7-Н4 антитело, связывающееся с клеточной поверхностью В7-Н4

Антитело	BIN	Анализ	Донор 1	Донор 2	Донор 3	Донор 4
		иАПК	(Макс.	(Макс.	(Макс.	(Макс.
		(EC50	ИФНү,	ИФНү,	ИФНү,	ИФНү,
		+/-STD;	пг/мл)	пг/мл)	пг/мл)	пг/мл)
		нМ)				
20496	Другой	PF	185,88	ND	ND	ND
20500	3	0,84 +/-	821	273,83	117,9	4027,1
		0,35				
20501	3	0,79 +/-	849,6	310	135,6	4493,1
		0,18				

20502,1	3	0,79 +/-	937	303,9	174,02	4269,7
		0,03				
20506	3	1,25 +/-	980,8	258,8	86,1	2301,8
		0,26				
20513	3	1,16 +/-	658,8	240,3	91,1	1634,5
		0,16				
20516	3	PF	ND	441,1	ND	ND
22213	3	1,79 +/-	ND	ND	ND	ND
		1,83				

Пример 8: Генерация афукозилированных и фукозилированных моноклональных антител

[00349] Антитела с Fc участками, имеющими пониженное содержание фукозы в гликановых фрагментах, могут проявлять более высокую активность АЗКЦ по сравнению с полностью фукозилированным антителом (Niwa R et al., Clinical Cancer Research 11 (6): 2327-36 (2005)). Антитела B7-H4 генерировались в клетках СНО-х (Yamane-Ohnuki N, et al. Biotechnology and Bioengineering 87 (5):614-22 (2004)), чтобы продуцировать нормально фукозилированные антитела и в клеточной линии СНО, разработанной для продуцирования афукозилированных антител (клетки СНО-у) (id.).

# Пример 9: Характеризация связывания афукозилированных и фукозилированных моноклональных антител

[00350] Фукозилированные и афукозилированные анти-В7-Н4 антитела характеризовали SPR, следуя протоколу, как описано в Примере 4. Антитела демонстрировали сходное связывание с белком В7-Н4 человека и, таким образом, гликозилирование не влияло на связывание (Таблица 17).

Таблица 17: Связывание афукозилированных и фукозилированных антител

		В7-Н4 человека						
Антите	BI	$K_D$	kon	k <sub>off</sub>	SK-	293-	293-	293-
ло	N	(M)	(1/Mc)	(1/c)	BR-3	cynoB	мышь	крыса
					(EC5	7-H4	B7-H4	B7-H4
					0;	(EC50	(EC50;	(EC50;

						нМ)	; нМ)	нМ)	нМ)
20502	3	Фукозилирован	2,58	4,28E+	1,10	0,57	3,291	4,371	2,486
		ный	E-09	05	E-03	1			
20502	3	Афокузилирова	2,74	4,19E+	1,15	0,48	2,923	1,655	2,446
		нный	E-09	05	E-03	3			
20506	3	Фукозилирован	1,93	3,65E+	7,03	0,73	1,770	1,77	3,249
		ный	E-09	05	E-04	9			
20506	3	Афокузилирова	2,01	3,60E+	7,25	0,76	1,769	1,769	PF
		нный	E-09	05	E-04	7			
22213	3	Фукозилирован	5,81	1,53E+	8,88	0,65	5,199	2,445	4,401
		ный	E-09	05	E-04	1			
22213	3	Афокузилирова	5,11	1,69E+	8,62	0,66	3,878	2,453	3,545
		нный	E-09	05	E-04	7			

[00351] Фукозилированные и афукозилированные анти-В7-Н4 антитела также характеризовали проточной цитометрией. В этих экспериментах клеточные линии НЕК293Т трансфицировали для экспрессии полноразмерного В7-Н4 человека, яванского макака, мыши или крысы. Кроме того, эндогенные человеческие В7-Н4-экспрессирующие клеточные линии рака молочной железы SK-BR-3 использовали для оценки эффективности связывания клеток антителами В7-Н4.1×10<sup>5</sup> клеток SK-BR-3 или клеток 293, трансфицированных для экспрессии полноразмерного В7-Н4 человека, яванского макака, мыши или крысы, инкубировали с титрующими дозами антител В7-Н4. После инкубации клетки осаждали, промывали, инкубировали со вторичным меченым антителом и запускали на проточном цитометре. Данные были проанализированы с использованием программного обеспечения FlowJo. МFI наносили на график в зависимости от концентрации антитела, и активность связывания клеток EC50 рассчитывали с использованием подгонки кривой нелинейной регрессии (GraphPad Prism).

[00352] Антитела В7-Н4 продемонстрировали сильное дозозависимое связывание с клетками SK-BR-3, эндогенно экспрессирующими В7-Н4 на клеточной поверхности или 293 клеточными линиями, трансфицированными для экспрессии В7-Н4 яванского макака, мыши или крысы на клеточной поверхности. На эффективность связывания и перекрестную реактивность видов не влияло то, было ли антитело фукозилированным или

афукозилированным (Фиг. 4А-4D и Таблица 17).

# Пример 10: Связывание афукозилированных и фукозилированных моноклональных антител с аллелем V158 рецептора IIIa (FcyRIIIa) Fcy человека

[00353] Антитело 20502 продуцировали как фукозилированное (Ат-F), так афукозилированное (Ат-А) и тестировали на аффинность связывания Fc участка с FcgRIIIa (V158) с помощью поверхностного плазмонного резонанса (SPR). Вкратце, белок А был ковалентно присоединен к декстрановому чипу с использованием набора для сочетания амина с 100 мМ этилендиамином в 100 мМ буфера борнокислого натрия, рН 8,0 в качестве блокирующего реагента. Ат-А или Ат-F собирали при 2 плотностях в отдельных проточных кюветах, и дериватизированный поток белка А служил в качестве эталонного контроля. Гсгамма RIIIA (V158) разбавляли в рабочем буфере HBS-P+ и вводили в 6 концентрациях (0 нМ, 1,37 нМ, 12,3 нМ, 37 нМ, 111 нМ, 333 нМ и 1000 нМ) в двух повторностях. Константу ассоциации, константу диссоциации и аффинность для связывания Ат-А рассчитывали с использованием модели связывания 1:1 программного обеспечения для оценки Віасоге Т200. Константу аффинности для связывания Ат-А и Ат-F определяли с использованием модели аффинного состояния программного обеспечения для оценки Віасоге Т200. Афукозилированное антитело В7-Н4 (Ат-А) имеет в 140 раз более высокую аффинность к Fc-гамма-рецептору IIIA (V158), чем то же самое антитело с фукозилированным Fc (Aт-F) (Фиг. 5А и Фиг. 5В, Таблица 18).

Таблица 18: Связывание аллеля V158 Fcy рецептора IIIa (FcyRIIIa)

	ka (1/Mc)	kd (1/c)	K <sub>D</sub> (нM)
Ат-А	6,46E+05	9,54E-10	15
Ат-F	N/A	N/A	210

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

[00354] Первичные человеческие Т-клетки были обогащены из МКПК с использованием набора для обогащения человеческих Т-клеток EasySep<sup>TM</sup> в соответствии с инструкциями производителя. Обогащенные Т-клетки инкубировали при  $2 \times 10^5$  клеток/мл с анти-CD3/анти-CD28 Dynabeads, в соотношении один шарик на клетку, при 37 °C. Через шесть дней шарики магнитно удаляли, а Т-клетки промывали и инкубировали при  $1 \times 10^6$  клеток/мл

с 10 ед/мл ИЛ-2 при 37 °C. Через четыре дня Т-клетки промывали и инкубировали при  $1\times10^6$  клеток/мл вместе с искусственными антигенпрезентирующими клетками (иАПК) при концентрации  $2\times10^6$  клеток/мл при 37 °C в присутствии титрования дозы антитела В7-Н4. иАПК обрабатывали митомицином С один час при 37 °C, а затем тщательно промыты перед добавлением к совместной культуре Т-клеток. Через 72 часа после совместного культивирования Т-клеток, иАПК и антител к В7-Н4 планшеты центрифугировали, и супернатанты собирали и оценивали на продуцирование ИФН $\gamma$  с помощью ИФА. Продукцию ИФН $\gamma$  наносили на график в зависимости от концентрации антитела, и эффективность ЕС50 рассчитывали с использованием подгонки кривой нелинейной регрессии (GraphPad Prism).

[00355] Антитела В7-Н4 продемонстрировали сильную активность блокады Т-клеточной контрольной точки, что измерялось по увеличению продукции ИФНү. Более того, не было очевидной разницы в эффективности между афукозилированными и фукозилированными антителами (Фиг. 6А и Таблица 19).

Таблица 19: Активность блокады контрольных точек Т-клеток

		Анализ иАПК (ЕС50 -	+/- STD; нM)
Антитело	BIN	Афокузилированный	Фукозилированный
20502	3	0,89 +/-0,44	0,74 +/-0,39
20506	3	1,05 +/-0,28	0,95 +/-0,46
22213	3	0,16 +/-0,05	0,17 +/-0,08

100356] Затем первичные Т-клетки человека были обогащены донорскими МКПК HLA-A2+ с использованием набора для выделения Pan Т-клеток человека, следуя инструкциям производителя. Экспрессирующие TCR MART-I Т-клетки генерировали, сначала активируя 5х10<sup>6</sup> обогащенных Pan Т-клеток 1,5х10<sup>7</sup> анти-CD3/анти-CD28 Dynabeads, 100 нг/мл ИЛ-2 и 15 нг/мл ИЛ-7 в течение 48 часов. Затем 5×10<sup>6</sup> активированных Т-клеток трансдуцировали лентивирусными частицами MART-I TCR в присутствии 200 нг/мл ИЛ-2, 30 нг/мл ИЛ-7 и 10 мкг/мл полибрена. Через 24 часа после трансдукции Т-клетки MART-I TCR+ Pan размножали в течение 15-дневного периода в присутствии 33,3 нг/мл ИЛ-2 и 5 нг/мл ИЛ-7. Для создания линий клеток-мишеней, экспрессирующих HLA-A2, эндогенные линии клеток рака молочной железы человека, экспрессирующих B7-H4, MDA-MB-468 и SK-BR-3, трансдуцировали лентивирусными частицами HLA-A2 в течение 48 часов. Кроме того, В7-H4 был нокаутирован из клеточной линии HLA-A2+ SK-BR-3. Т-клетки MART-I TCR+ Pan совместно культивировали в присутствии различных линий клеток-мишеней при соотношении E:T 1:1, 500 мкг/мл пептида MART-I и 67 нМ B7-H4 антитела 20502

(афукозилированного) или изотипического контроля человека. Через 24 часа после совместной инкубации планшеты центрифугировали и супернатанты собирали и оценивали на продуцирование ИЛ-2 AlphaLisa в соответствии с инструкциями производителя.

[00357] Как продемонстрировано на Фиг. 6В, В7-Н4 продемонстрировал активность лиганда Т-клеточной контрольной точки в этом анализе, когда он эндогенно экспрессируется на физиологических уровнях, поскольку продуцирование ИЛ-2 было уменьшено в лунках, содержащих клетки SK-BR-3 В7-Н4+, относительно SK-BR-3 КО клеток. Кроме того, антитело В7-Н4 также продемонстрировало активность блокады Т-клеточной контрольной точки, измеренную по увеличению продукции ИЛ-2 по сравнению с клетками, обработанными изотипическим контролем (Фиг. 6В). Таким образом, эти данные подтверждают активность блокады Т-клеточной контрольной точки антитела В7-Н4 20502 (афукозилированный) и показывают, что В7-Н4 антитела 20502 обеспечивает активность блокады Т-клеточной контрольной точки в клетках, которые эндогенно экспрессируют В7-Н4.

## Пример 12: Афукозилированные и фукозилированные моноклональные антитела с активностью АЗКЦ

[00358] Антитела В7-Н4 оценивали на активность АЗКЦ против линии клеток-мишеней, экспрессирующих В7-Н4. В частности, первичные клетки МКПК человека активировали цитокином при 1×10<sup>6</sup> клеток/мл с 200 ед/мл ИЛ-2 при 37 °C. На следующий день клетки промывали и инкубировали при соотношении эффектор:мишень 40:1 с клеткамимишенями SK-BR-3, которые были помечены кальцеином-АМ. Через 4 часа после инкубации лизис клеток-мишеней определяли количественно с помощью флуориметра. Образец, обработанный Тритон/Х, служил в качестве контрольного образца с максимальным лизисом, тогда как образец, обработанный только средой, служил в качестве контрольного образца с фоновым лизисом. Процент (%) удельного лизиса рассчитывали следующим образом: [1-((образец - контроль среды)/(максимальный лизис - контроль среды))]х100. Процент (%) специфического лизиса наносили на график в зависимости от концентрации антитела, и эффективность ЕС50 рассчитывали с использованием подгонки кривой нелинейной регрессии (GraphPad Prism).

[00359] Антитела В7-Н4 продемонстрировали сильную дозозависимую активность АЗКЦ против эндогенной экспрессирующей В7-Н4 линии клеток молочной железы SK-BR-3. Кроме того, афукозилированные антитела продемонстрировали значительно более высокую активность АЗКЦ по сравнению с фукозилированными антителами (Фиг. 7 и

Таблица 20).

Таблица 20: Активность АЗКЦ

		Анализ АЗКЦ (ЕС50 -	⊬/- STD; нМ)
Антитело	BIN	Афокузилированный	Фукозилированный
20502	3	0,0007 +/-1,1x10E-3	0,0370 +/-6,2E-2
20506	3	0,0015 +/-2,5x10E-3	0,0135 +/-2,1E-2
22213	3	0,0015	0,014

Пример 13: Корреляция активности АЗКЦ с плотностью рецептора

Плотность B7-H4 количественно определялась на поверхности клеток SK-BR-3, [00360] HCC1569, ZR-75-1, MDA-MB-48 и HCC1964 с помощью FACS в соответствии со спецификациями производителя. В частности, 1×10<sup>5</sup> клеток инкубировали с 15 мкг/мл антитела B7-H4 на льду в течение 25 минут. Параллельно одну каплю микросфер Quantum TM Simply Cellular (QSC) (предварительно покрытых увеличивающимися концентрациями анти-мышиного антитела захвата IgG) также инкубировали с 15 мкг/мл антитела B7-H4 на льду в течение 25 минут. После инкубации клетки и микросферы QSC осаждали и промывали, а образцы собирали на проточном цитометре. Данные были проанализированы обеспечения FlowJo. использованием программного Средняя интенсивность флуоресценции (MFI) была рассчитана и введена в электронную Таблицу QuickCal®. Регрессия, связывающая значение флуоресцентного канала каждого шарика с его предварительно назначенным значением емкости связывания антител (АВС), будет рассчитана автоматически. Значение ABC было назначено после добавления значений MFI для помеченных ячеек в шаблон).

[00361] Антитела В7-Н4 оценивали на активность АЗКЦ против линий клеток-мишеней, экспрессирующих В7-Н4, с различными уровнями плотности В7-Н4 поверхности клеток. В частности,  $1\times10^4$  клеток-мишеней SK-BR-3, HCC1569, ZR-75-1, MDA-MB-468 или HCC1964 совместно инкубировали с титрованием дозы антитела В7-Н4 при 4 °C. Через 25 минут размораживали одноразовый флакон репортерных клеток Jurkat-huCD16 от Promega, и  $7.5\times10^4$  клеток добавляли к смеси клеток-мишеней/антитела В7-Н4 и инкубировали при 37 °C. Через 24 часа образцы доводили до комнатной температуры (КТ) и инкубировали с буфером Віо-Glo. Субстрат и люминесценцию количественно определяли на считывающем устройстве для меток EnVision. Данные наносили на график в зависимости от концентрации антитела, и эффективность EC50 рассчитывали с использованием подгонки

кривой нелинейной регрессии (GraphPad Prism).

[00362] Активность АЗКЦ антител В7-Н4 зависела от плотности поверхности клеток В7-Н4: по мере того, как количество молекул клеточной поверхности уменьшалось, величина максимальной активности АЗКЦ также уменьшалась. Кроме того, афукозилированные антитела продемонстрировали улучшенную активность АЗКЦ по сравнению с фукозилированными антителами, особенно в отношении клеток-мишеней с более низкими уровнями плотности клеточной поверхности В7-Н4 (Фиг. 8).

#### Пример 14: In vivo противоопухолевая эффективность

[00363] Семинедельные самки мышей BALB/с были приобретены в Charles River Laboratories (Холлистер, Калифорния) и были акклиматизированы в течение не более трех недель до начала исследований. Клеточная линия мышиной колоректальной карциномы СТ26 была разработана для экспрессии химерного белка, состоящего из внеклеточного домена мышиного B7-H4 с трансмембранным доменом мышиного B7H3. Эти опухолевые клетки имплантировали подкожно на правый бок мышей при 1,0×10<sup>6</sup> клеток/200 мкл/мышь. Перед инокуляцией клетки культивировали не более трех пассажей в среде RPMI 1640, дополненной 10 % инактивированной нагреванием фетальной бычьей сывороткой (FBS), 2 мМ L-глютамином. Клетки выращивали при 37 °C в увлажненной атмосфере с 5 % CO<sub>2</sub>. По достижении 80-85 % слияния клетки собирали и ресуспендировали в смеси 1:1 бессывороточной RPMI 1640 и Matrigel при 5×10<sup>6</sup> клеток на миллилитр).

[00364] Мышей контролировали дважды в неделю после имплантации клеток на предмет роста опухоли. Для измерения опухоли длину и ширину каждой опухоли измеряли с помощью штангенциркуля, и объем рассчитывали по формуле: объем опухоли (мм³) = (ширина (мм) х длина (мм²)/2.В день начала лечения измеряли все опухоли, исключали выбросы и мышей случайным образом распределяли по группам лечения. Для лечения анти-В7-Н4, использованные антитела включают 20502 (Фиг. 9А) и 22213 (Фиг. 9В). В качестве контроля мышам вводили поликлональный IgG человека (Віо X Cell, ВЕ0092) или IgG2а мыши (Віо X Cell, ВЕ0085). Антитела вводили четыре раза посредством внутривенной (в/в) инъекции два раза в неделю, начиная с 4 или 5 дня после инокуляции. [00365] Опухоли продолжали измерять, по меньшей мере, два раза в неделю, пока объем опухоли не превысил 10 % массы животного или приблизительно 2000 мм³. Изменение

размера опухоли показано на графике отдельных опухолей относительно дня, в который

использованием непарного двустороннего t-критерия анализа рассчитанных объемов

СТ26. Р-значения

рассчитывали

были инокулированы клетками

животные

опухоли в каждый день исследования. Обработка 20502 или 22213 значительно снижала рост опухоли по сравнению с контролем IgG человека (p < 0.05) при введении между дозами 10-20 мг/кг (Фиг. 9A и 9B).

[00366] Подобные эксперименты были выполнены с использованием мышей с имплантированными клетками 4T1 (клеточная линия карциномы молочной железы мыши) или В16 (клеточная линия меланомы мыши). Этим мышам вводили 20 мг/кг суррогата мыши 20502, называемого 20502-msIgG2a-F, который содержит вариабельный участок 20502, слитый с фукозилированным мышиным IgG2a, или с мышиным контрольным антителом IgG. Обработка 20502-msIgG2a-F значительно снижала рост опухоли по сравнению с контролем IgG мыши как в модели рака молочной железы 4T1, так и в модели меланомы В16 (Фиг. 10).

[00367] Дополнительные эксперименты также проводили с использованием афукозилированного 20502 на модели ксенотрансплантата рака молочной железы человека МХ-1. Самки мышей NSG (NOD-scid, ИЛ2R gammanull) были приобретены в лаборатории Джексона (Бар-Харбор, Мэн-Айленд) и акклиматизированы в течение одной недели до начала исследований. Ранее было показано, что клеточная линия рака молочной железы человека МХ-1 эндогенно экспрессирует белок В7Н4 на клеточной поверхности. Эти опухолевые клетки имплантировали подкожно над правым боком мышей при  $1,0\times10^6$  клеток/100 мкл/мышь в смеси 1:1 бессывороточного RPMI 1640 и Matrigel при  $5\times10^6$  клеток на миллилитр.

Мышей контролировали дважды в неделю после имплантации клеток на предмет [00368] роста опухоли. Для измерения опухоли длину и ширину каждой опухоли измеряли с помощью штангенциркуля, и объем рассчитывали по формуле: Объем опухоли (мм<sup>3</sup>) = (ширина (мм) х длина (мм) $^2$ )/2. На 7-й день после инокуляции были измерены все опухоли, выбросы были исключены, и мыши были случайным образом распределены по группам лечения. животным вводили ДНК-конструкцию, которая индуцировала конститутивную экспрессию ИЛ-15 человека в кровотоке до конца исследования. В день 9 половина мышей получала внутривенную (в/в) инъекцию 20×10<sup>6</sup> моноцитарных клеток периферической крови человека (МКПК), полученных от StemCell Technologies (Таквила, Вашингтон). Начиная с 11-го дня мышам вводили афукозилированное 20502 (20 мг/кг) или физиологический раствор в качестве негативного контроля. Терапевтическое средство вводили четыре раза посредством внутривенной (в/в) инъекции два раза в неделю.

[00369] Опухоли продолжали измерять по меньшей мере два раза в неделю, пока объем опухоли не превысил 10 % веса животного или пока животные не продемонстрировали потерю исходной массы тела на 15 % или более. Р-значения рассчитывали с

использованием одностороннего ANOVA, сравнивая средние объемы опухолей во всех группах лечения на 28-й день. Как показано на Фиг. 11, лечение афукозилированным 20502 значительно снижало рост опухоли по сравнению с физиологическим контролем (р < 0,05) только при введении мышам, которым ранее вводили МКПК человека.

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

#### Способы

[00370] Восьминедельные самки мышей ВАLВ/с были приобретены в Charles River Laboratories (Холлистер, Калифорния) и были акклиматизированы в течение не более двух недель до начала исследования. Клеточная линия карциномы молочной железы мыши 4Т1 была сконструирована для экспрессии химерного белка, содержащего внеклеточный домен мышиного В7-Н4 и трансмембранный домен мышиного В7Н3. Опухолевые клетки имплантировали ортотопически в жировую подушку молочной железы мышей при  $0.5 \times 10^5$  клеток/50 мкл/мышь. Перед инокуляцией клетки культивировали не более трех пассажей в среде RPMI 1640, дополненной 10 % инактивированной нагреванием фетальной бычьей сывороткой (FBS). Клетки выращивали при 37 С в увлажненной атмосфере с 5 % CO<sub>2</sub>. По достижении слияния 80-85 % клетки собирали и ресуспендировали в бессывороточной RPMI 1640 на вентральном боку каждой мыши в жировую подушку молочных желез.

[00371] Мышей контролировали дважды в неделю после имплантации клеток на предмет роста опухоли. Длину и ширину каждой опухоли измеряли с помощью штангенциркуля, а объем рассчитывали по формуле: Объем опухоли (мм³) = (ширина (мм) х длина (мм)²)/2. В день начала лечения измеряли все опухоли, исключали выбросы и мышей случайным образом распределяли по группам лечения. Для лечения анти-В7-Н4, использовали мышиный суррогат 20502, называемый 20502-msIgG2a-F, который содержит вариабельный участок 20502, слитый с фукозилированным IgG2a мыши. В качестве контроля мышам вводили msIgG2a (анти-HEL). 20502-msIgG2a-F или msIgG2a вводили четыре раза посредством внутривенной (в/в) инъекции два раза в неделю, начиная с 11-го дня после инокуляции. Анти-PD-1 (модифицированная версия RMP1-14 (Віо X Сеll), содержащая Fc молчащего домена msIgG2a) вводили три раза посредством внутрибрюшинной (в/б) инъекции два раза в неделю, начиная с 11 дня после инокуляции. Опухоли продолжали измерять, по меньшей мере, два раза в неделю, пока объем опухоли не превысил 10 % массы животного или приблизительно 2000 мм³.

#### Результаты

[00372] Изменение размера опухоли, изменение среднего объема опухоли и процент выживания показаны на Фиг. 12A, Фиг. 12B и Фиг. 12C соответственно. Лечение с 20502-msIgG2a-F или анти-PD-1 значительно снижала рост опухоли по сравнению с контролем msIgG2a (р < 0,05). Совместное введение 20502-msIgG2a-F и анти-PD-1 значительно усиливало ингибирование роста опухоли по сравнению с любой монотерапией (р < 0,05). Кроме того, комбинированная терапия привела к полной регрессии опухоли у 5 из 12 мышей. Р-значения рассчитывали с использованием одностороннего анализа ANOVA рассчитанных объемов опухоли в каждый день исследования с множественными сравнениями между каждой группой.

### Пример 16: Анти-В7-Н4 антитело усиливает инфильтрацию НК-клеток и Тклеток и повышает уровень PD-L1

[00373] Восьминедельные самки мышей BALB/с были приобретены в Charles River Laboratories (Холлистер, Калифорния) и имплантированы ортотопически в жировую подушку молочных желез мышей клетками 4T1+moB7-H4/H3 в количестве  $0.5 \times 10^5$  клеток/50 мкл/мышь. В день начала лечения измеряли все опухоли, исключали выбросы и мышей случайным образом распределяли по группам лечения. Мышам вводили huIgG1 (анти-HEL) или афукозилированное 20502 в дозе 20 мг/кг посредством внутривенной (в/в) инъекции дважды (день 11 и день 14 после инокуляции).

[00374] Через 24 часа после введения второй дозы мышей умерщвляли и перфузировали физиологическим раствором с фосфатным буфером (ФСБ). Затем опухоли экстрагировали, фиксировали в 10 % формалине в течение пяти часов, промывали в ФСБ и помещали в 30%-ный раствор сахарозы как минимум на 24 часа. Опухоли были погружены в Tissue-Tek® О.С.Т. Соединены и порезаны при 20 мкм в камере при -15 °C (криостат). Срезы с тканями промывали в 0,3 % Тритоне в ФСБ, блокировали 5 % нормальной козьей сывороткой и окрашивали первичным антителом (анти-NKp46, анти-CD3 или анти-PD-L1; 1:500) в течение ночи. Два последовательных среза от каждой опухоли окрашивали.

[00375] После инкубации в течение ночи предметные стекла промывали в 0,3 % Тритоне, затем инкубировали со вторичным антителом (1:400) в течение трех часов в темной влажной камере и промывали. Затем ткань фиксировали в 1 % параформальдегиде и промывали в ФСБ. Покровные стекла были фиксированы с использованием Vectashield® с

DAPI, запечатаны Cytoseal<sup>TM</sup> и оставлены для сушки в темной камере. Изображения были получены вручную с помощью флуоресцентного микроскопа и камеры. Как показано на Фиг. 13, обработка афукозилированными 20502 привела к увеличению числа клеток натуральных киллеров (НК) (по данным антитела против NKp46) и увеличению CD3+ Т-клеток на краях опухоли с умеренным увеличением CD3+ Т-клеток в ядре опухоли. Повышенная экспрессия PD-L1 также наблюдалась.

## Пример 17: Анти-В7-Н4 антитело значительно снижает рост опухоли in vivo в моделях 4Т1 и В16-moB7-H4/H3 в зависимости от дозы.

[00376] Самки мышей BALB/с или C57Bl/6 в возрасте от шести до восьми недель были приобретены в Charles River Laboratories (Холлистер, Калифорния) и были акклиматизированы в течение не более трех недель до начала исследований. Клеточная линия карциномы молочной железы мыши 4T1 и клеточная линия меланомы B16-F10 были сконструированы для экспрессии химерного белка мыши, состоящего из внеклеточного домена мышиного B7-H4, с трансмембранным доменом мышиного B7-H3. Эти опухолевые клетки имплантировали ортотопически в жировую подушку молочной железы при 0,05×106 клеток/50 мкл/мышь для 4T1+moB7-H4/H3 или подкожно над правым боком мышей при 0,5×106 клеток/100 мкл/мышь для B16+moB7-H4/H3. Перед инокуляцией клетки культивировали не более трех пассажей в среде RPMI-1640 или DMEM, дополненной 10 % инактивированной нагреванием фетальной бычьей сывороткой (FBS) и 2 мМ L-глютамином. Клетки выращивали при 37 °C в увлажненной атмосфере с 5 % CO<sub>2</sub>.

[00377] Мышей контролировали дважды в неделю после имплантации клеток на предмет роста опухоли. Для измерения опухоли длину и ширину каждой опухоли измеряли с помощью штангенциркуля, и объем рассчитывали по формуле: Объем опухоли (мм³) = (ширина (мм) х длина (мм)²)/2. В день начала лечения измеряли все опухоли, исключали выбросы и мышей случайным образом распределяли по группам лечения. Мышам вводили антитело 20502-msIgG2a-F (анти-B7-H4, msIgG2a, фукозилированное (также называемое «сmFPA150-F») или контрольное антитело IgG2a мыши четыре раза с помощью внутривенной (в/в) инъекции два раза в неделю, начиная с дня 11 (4T1+moB7-H4/H3) или дня 6 (В16+moB7-H4/H3) после инокуляции, за исключением группы 20 мг/кг, которой вводили непрерывно два раза в неделю до конца исследования.

[00378] Опухоли продолжали измерять, по меньшей мере, два раза в неделю, пока объем опухоли не превысил 10 % массы животного или приблизительно 2000 мм<sup>3</sup>. Изменение размера опухоли показано на графике среднего объема опухоли относительно дня, когда

животные были привиты. Лечение с 20502-msIgG2a-F значительно снижало рост опухоли по сравнению с контролем IgG2a мыши (р < 0,05) при введении в дозах 1 мг/кг или выше на модели 4T1+moB7-H4/H3 (см. Фиг. 14A и 14B) и в дозах 3 мг/кг или более в модели B16+moB7-H4/H3 (Фиг. 15A и 15B). Статистическую значимость рассчитывали с использованием одностороннего ANOVA, сравнивая все группы лечения с msIgG2a.

[00379] Фиг.14А и 14В демонстрируют, что антитело 20502-msIgG2a-F значительно снижает рост 4Т1, экспрессирующего B7-H4/H3. Мышей BALB/с инокулировали ортотопически клетками карциномы молочной железы 4Т1, сконструированными для экспрессии ECD мышиных B7-H4, слитых с B7-H3 ТМ. Мышам вводили антитело 20502-msIgG2a-F (анти-B7-H4, msIgG2a, фукозилированное) дважды в неделю, начиная с 11-го дня после инокуляции. Антитело 20502-msIgG2a-F продемонстрировало дозозависимое снижение роста опухоли со значительным ингибированием роста опухоли при 30 мг/кг (р = 0,0003), 20 мг/кг (р = 0,0103), 10 мг/кг (р = 0,0419), 3 мг/кг (р = 0,0277) и 1 мг/кг (р = 0,0333) по оценке OneWay ANOVA на 30-й день.

[00380] Фиг. 15А и 15В демонстрируют, что антитело 20502-msIgG2a-F значительно снижает рост В16, экспрессирующего В7-H4/H3. Мышей С57Вl/6 инокулировали подкожно клетками меланомы В16-F10, сконструированными для экспрессии ECD мышиных В7-H4, слитых с В7-H3 ТМ. Мышам вводили антитело 20502-msIgG2a-F (анти-В7-H4, msIgG2a, фукозилированное) дважды в неделю, начиная с 6-го дня после инокуляции. Антитело 20502-msIgG2a-F продемонстрировало дозозависимое снижение роста опухоли (Фиг. 15А) со значительным ингибированием роста опухоли при 30 мг/кг (p = 0,0085), 20 мг/кг (p = 0,0041), 10 мг/кг (p = 0,0017) и 3 мг/кг (p = 0,0420) по оценке OneWay ANOVA на 23-й день (Фиг. 15В).

[00381] Таким образом, антитело 20502-msIgG2a-F значительно уменьшало размер опухоли дозозависимым образом в двух разных моделях рака. Эти данные в клеточных линиях карциномы молочной железы и меланомы указывают на то, что антитело 20502-msIgG2a-F можно использовать для лечения больных раком.

Таблицы последовательности
Последовательности антител GITR

SEQ	ID	Последовательность	
NO			
411		SGSVFSIDAM	
412		LSGISSAK	
413		YADVSTGWGRDAHGYW	

414	EVQLLESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSVFSIDAMGWYRQAPGKQREL
	VAVLSGISSAKYAASAPGRFTISRDNAKNTVYLQMSSLRAEDTAVYYC
	YADVSTGWGRDAHGYWGQGTLVTV
415	EVQLLESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSVFSIDAMGWYRQAPGKQREL
	VAVLSGISSAKYAASAPGRFTISRDNAKNTVYLQMSSLRAEDTAVYYC
	YADVSTGWGRDAHGYWGQGTLVTVKPGGSGGSEVQLLESGGGEVQP
	GGSLRLSCAASGSVFSIDAMGWYRQAPGKQRELVAVLSGISSAKYAAS
	APGRFTISRDNAKNTVYLQMSSLRAEDTAVYYCYADVSTGWGRDAHG
	YWGQGTLVTVKPGGGGDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLM
	ISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST
	YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ
	VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP
	VLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL
	SPGK
416	EPKSSDKTHTCPPC
417	DKTHTCPPC
418	ESKYGPPCPPC
419	GGSGGS
420	GGSGGSGGS
421	GGSGGSGGS
422	GGSGGSGGSGGS
423	GGGG
424	GGGGG
425	GGGGGG
	I

## СD80 последовательности

Последовательность	
VIHVTKEVKEVATLSCGHNVSVEELAQTRIYWQKEKKMVLTMMSG	
DMNIWPEYKNRTIFDITNNLSIVILALRPSDEGTYECVVLKYEKDAFK	
REHLAEVTLSVKADFPTPSISDFEIPTSNIRRIICSTSGGFPEPHLSWLE	
NGEELNAINTTVSQDPETELYAVSSKLDFNMTTNHSFMCLIKYGHLR	
VNQTFNWNTTKQEHFPDN	

427	VIHVTKEVKEVATLSCGHNVSVEELAQTRIYWQKEKKMVLTMMSG
	DMNIWPEYKNRTIFDITNNLSIVILALRPSDEGTYECVVLKYEKDAFK
	REHLAEVTLSVKADFPTPSISDFEIPTSNIRRIICSTSGGFPEPHLSWLE
	NGEELNAINTTVSQDPETELYAVSSKLDFNMTTNHSFMCLIKYGHLR
	VNQTFNWNTTKQEHFPDNEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFP
	PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT
	KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT
	ISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE
	SNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM
	HEALHNHYTQKSLSLSPGK
428	VIHVTKEVKEVATLSCGHNVSVEELAQTRIYWQKEKKMVLTMMSG
	DMNIWPEYKNRTIFDITNNLSIVILALRPSDEGTYECVVLKYEKDAFK
	REHLAEVTLSVKADFPTPSISDFEIPTSNIRRIICSTSGGFPEPHLSWLE
	NGEELNAINTTVSQDPETELYAVSSKLDFNMTTNHSFMCLIKYGHLR
	VNQTFNWNTTKQEHFPDNEPKSSDKTHTCPPCPAPEFEGGPSVFLFP
	PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT
	KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPASIEKT
	ISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE
	SNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM
	HEALHNHYTQKSLSLSPGK
CED1	1

### CSFR1 последовательности

SEQ ID NO	Последовательность
429	QVQLVQSGAE VKKPGSSVKV SCKASGYTFT DNYMIWVRQA
	PGQGLEWMGD INPYNGGTTF NQKFKGRVTI TADKSTSTAY
	MELSSLRSED TAVYYCARES PYFSNLYVMD YWGQGTLVTV SS
430	EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCKASQSVD YDGDNYMNWY
	QQKPGQAPRL LIYAASNLES GIPARFSGSG SGTDFTLTIS
	SLEPEDFAVY YCHLSNEDLS TFGGGTKVEI K
431	GYTFTDNYMI
432	DINPYNGGTT FNQKFKG
433	ESPYFSNLYV MDY

434	KASQSVDYDG DNYMN		
435	AASNLES		
436	HLSNEDLST		
437	QVQLVQSGAE VKKPGSSVKV SCKASGYTFT DNYMIWVRQA		
	PGQGLEWMGD INPYNGGTTF NQKFKGRVTI TADKSTSTAY		
	MELSSLRSED TAVYYCARES PYFSNLYVMD YWGQGTLVTV		
	SSASTKGPSV FPLAPCSRST SESTAALGCL VKDYFPEPVT		
	VSWNSGALTS GVHTFPAVLQ SSGLYSLSSV VTVPSSSLGT		
	KTYTCNVDHK PSNTKVDKRV ESKYGPPCPP CPAPEFLGGP		
	SVFLFPPKPK DTLMISRTPE VTCVVVDVSQ EDPEVQFNWY		
	VDGVEVHNAK TKPREEQFNS TYRVVSVLTV LHQDWLNGKE		
	YKCKVSNKGL PSSIEKTISK AKGQPREPQV YTLPPSQEEM		
	TKNQVSLTCL VKGFYPSDIA VEWESNGQPE NNYKTTPPVL		
	DSDGSFFLYS RLTVDKSRWQ EGNVFSCSVM HEALHNHYTQ		
	KSLSLSLGK		
438	EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCKASQSVD YDGDNYMNWY		
	QQKPGQAPRL LIYAASNLES GIPARFSGSG SGTDFTLTIS		
	SLEPEDFAVY YCHLSNEDLS TFGGGTKVEI KRTVAAPSVF		
	IFPPSDEQLK SGTASVVCLL NNFYPREAKV QWKVDNALQS		
	GNSQESVTEQ DSKDSTYSLS STLTLSKADY EKHKVYACEV		
	THQGLSSPVT KSFNRGEC		
-	DD 1/(		

### Последовательности антител PD-1 (ниволумаб)

SEQ ID	Описание	Последовательность
NO:		
440	вариабельны	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLDCKASGITFSNSGMHWVRQ
	й участок	APGKGLEWVAVIWYDGSKRYYADSVKGRFTISRDNSKNT
	тяжелой	LFLQMNSLRAEDTAVYYCATNDDYWGQGTLVTVSS
	цепи	
441	константный	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSW
	участок	NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYT
	тяжелой	CNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFL
	цепи	FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDG

		VEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY
		KCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTK
		NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDS
		DGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQK
		SLSLSLGK
442	вариабельны	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPG
	й участок	QAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDF
	легкой цепи	AVYYCQQSSNWPRTFGQGTKVEIK
443	константный	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQ
	участок	WKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYE
	легкой цепи	KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
444	тяжелый FR1	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLDCKASGITFS
445	тяжелый	NSGMH
	CDR1	
446	тяжелый FR2	WVRQAPGKGLEWVA
447	тяжелый	VIWYDGSKRYYADSVKG
	CDR2	
448	тяжелый FR3	RFTISRDNSKNTLFLQMNSLRAEDTAVYYCAT
449	тяжелый	NDDY
	CDR3	
450	тяжелый FR4	WGQGTLVTVSS
451	легкий FR1	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSC
452	легкий CDR1	RASQSVSSYLA
453	легкий FR2	WYQQKPGQAPRLLIY
454	легкий CDR2	DASNRAT
455	легкий FR3	GIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYC
456	легкий CDR3	QQSSNWPRT
457	легкий FR4	FGQGTKVEIK
k *	*	

\* \* \*

[00382] Изобретение не должно быть ограничено в объеме конкретными вариантами осуществления данного изобретения, описанными в данном документе. Действительно, различные модификации изобретения в дополнение к описанным станут очевидными для специалистов в данной области техники из предшествующего описания и сопровождающих фигур. Такие модификации предназначены для попадания в объем прилагаемой формулы изобретения.

[00383] Все ссылки (например, публикации или патенты или патентные заявки), цитированные в данном документе, включены в данный документ посредством ссылки во всей их полноте и для всех целей в той же степени, как если бы каждая отдельная ссылка (например, публикация или патент или заявка на патент) была конкретно и индивидуально указана, включена посредством ссылки во всей своей полноте для всех целей.

[00384] Другие варианты осуществления данного изобретения находятся в пределах следующей формулы изобретения.

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

- 1. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с B7-H4 человека, содержащие последовательности определяющего комплементарность участка (CDR) 1 вариабельного участка тяжелой цепи (VH), CDR2 VH, CDR3 VH и CDR1, CDR2, CDR3 вариабельного участка легкой цепи (VL) выбраные из группы, состоящей из:
  - (a) SEQ ID NO: 458-463 соответственно;
  - (b) SEQ ID NO: 5-10 соответственно;
  - (c) SEQ ID NO: 15-20 соответственно;
  - (d) SEQ ID NO: 25-30 соответственно;
  - (e) SEQ ID NO: 35-40 соответственно;
  - (f) SEQ ID NO: 45-50 соответственно;
  - (g) SEQ ID NO: 55-60 соответственно;
  - (h) SEQ ID NO: 65-70 соответственно;
  - (i) SEQ ID NO: 75-80 соответственно;
  - (j) SEQ ID NO: 85-90 соответственно;
  - (k) SEQ ID NO: 95-100 соответственно;
  - (1) SEQ ID NO: 105-110 соответственно;
  - (m) SEQ ID NO: 115-120 соответственно;
  - (n) SEQ ID NO: 125-130 соответственно;
  - (o) SEQ ID NO: 135-140 соответственно;
  - (р) SEQ ID NO: 145-150 соответственно;
  - (q) SEQ ID NO: 155-160 соответственно;
  - (r) SEQ ID NO: 165-170 соответственно;
  - (s) SEQ ID NO: 175-180 соответственно;
  - (t) SEQ ID NO: 185-190 соответственно; и
  - (u) SEQ ID NO: 195-200 соответственно.
- 2. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 1, отличающиеся тем, что указанные антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат VH, содержащий аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 11, 21, 31, 41, 464, 51, 61, 71, 81, 91, 101, 111, 121, 131, 141, 151, 161, 171, 181, 191 или 201.
- 3. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 1 или п. 2, отличающиеся тем,

что указанные антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат VL, содержащий аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 12, 22, 32, 42, 52, 62, 72, 82, 92, 102, 112, 122, 132, 142, 152, 162, 172, 182, 192 или 202.

- 4. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с В7-Н4 человека, причем указанные антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат вариабельный участок тяжелой цепи и вариабельный участок легкой цепи, при этом вариабельный участок тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 11, 21, 31, 41, 464, 51, 61, 71, 81, 91, 101, 111, 121, 131, 141, 151, 161, 171, 181, 191 или 201.
- 5. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с В7-Н4 человека, при этом указанное антитело содержит вариабельный участок тяжелой цепи и вариабельный участок легкой цепи, при этом вариабельный участок легкой цепи содержит аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 12, 22, 32, 42, 52, 62, 72, 82, 92, 102, 112, 122, 132, 142, 152, 162, 172, 182, 192 или 202.
- 6. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с В7-Н4 человека, содержащие вариабельный участок тяжелой цепи и вариабельный участок легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности:
  - (a) SEQ ID NO: 464 и 42 соответственно;
  - (b) SEQ ID NO: 11 и 12 соответственно;
  - (c) SEQ ID NO: 21 и 22 соответственно;
  - (d) SEQ ID NO: 31 и 32 соответственно;
  - (e) SEQ ID NO: 41 и 42 соответственно;
  - (f) SEQ ID NO: 51 и 52 соответственно;
  - (g) SEQ ID NO: 61 и 62 соответственно;
  - (h) SEQ ID NO: 71 и 72 соответственно;
  - (i) SEQ ID NO: 81 и 82 соответственно;
  - (j) SEQ ID NO: 91 и 92 соответственно;
  - (k) SEQ ID NO: 101 и 102 соответственно;
  - (1) SEQ ID NO: 111 и 112 соответственно;
  - (m) SEQ ID NO: 121 и 122 соответственно;
  - (n) SEQ ID NO: 131 и 132 соответственно;
  - (o) SEQ ID NO: 141 и 142 соответственно;

- (р) SEQ ID NO: 151 и 152 соответственно;
- (q) SEQ ID NO: 161 и 162 соответственно;
- (r) SEQ ID NO: 171 и 172 соответственно;
- (s) SEQ ID NO: 181 и 182 соответственно;
- (t) SEQ ID NO: 191 и 192 соответственно; или
- (u) SEQ ID NO: 201 и 202 соответственно.
- 7. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-6, отличающиеся тем, что указанные антитело или антигенсвязывающий фрагмент дополнительно содержат константный участок тяжелой цепи.
- 8. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 7, отличающиеся тем, что константный участок тяжелой цепи выбран из группы, состоящей из константных участков тяжелой цепи иммуноглобулинов IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub>, IgG<sub>4</sub>, IgA<sub>1</sub> и IgA<sub>2</sub>.
- 9. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-8, отличающиеся тем, что указанные антитело или антигенсвязывающий фрагмент дополнительно содержат константный участок легкой цепи.
- 10. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 9, отличающиеся тем, что константный участок легкой цепи выбран из группы, состоящей из константных участков легкой цепи иммуноглобулинов человека IgGк и IgGλ.
- 11. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-6, отличающиеся тем, что указанные антитело или антигенсвязывающий фрагмент дополнительно содержат константный участок тяжелой цепи и константный участок легкой цепи, при этом константный участок тяжелой цепи представляет собой константный участок тяжелой цепи  $IgG_1$  человека, и при этом константный участок легкой цепи представляет собой константный участок легкой цепи  $IgG_6$  человека.
- 12. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-6, отличающиеся тем, что указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13, 23, 33, 43, 469, 53, 63, 73, 83, 93, 103, 113, 123, 133, 143, 153, 163, 173, 183, 193 или 203.

- 13. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-6 или п. 12, отличающиеся тем, что указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14, 24, 34, 44, 54, 64, 74, 84, 94, 104, 114, 124, 134, 144, 154, 164, 174, 184, 194 или 204.
- 14. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-6, отличающиеся тем, что указанные антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержат тяжелую цепь и легкую цепь, содержащие аминокислотные последовательности:
  - (a) SEQ ID NO: 469 и 44 соответственно;
  - (b) SEQ ID NO: 13 и 14 соответственно;
  - (c) SEQ ID NO: 23 и 24 соответственно;
  - (d) SEQ ID NO: 33 и 34 соответственно;
  - (e) SEQ ID NO: 43 и 44 соответственно;
  - (f) SEQ ID NO: 53 и 54 соответственно;
  - (g) SEQ ID NO: 63 и 64 соответственно;
  - (h) SEQ ID NO: 73 и 74 соответственно;
  - (i) SEQ ID NO: 83 и 84 соответственно;
  - (j) SEQ ID NO: 93 и 94 соответственно;
  - (k) SEQ ID NO: 103 и 104 соответственно;
  - (1) SEQ ID NO: 113 и 114 соответственно;
  - (m) SEQ ID NO: 123 и 124 соответственно;
  - (n) SEQ ID NO: 133 и 134 соответственно;
  - (o) SEQ ID NO: 143 и 144 соответственно;
  - (р) SEQ ID NO: 153 и 154 соответственно;
  - (q) SEQ ID NO: 163 и 164 соответственно;
  - (r) SEQ ID NO: 173 и 174 соответственно;
  - (s) SEQ ID NO: 183 и 184 соответственно;
  - (t) SEQ ID NO: 193 и 194 соответственно; или
  - (u) SEQ ID NO: 203 и 204 соответственно.
- 15. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с B7-H4 человека, при этом указанные антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат CDR1 VH, CDR2 VH, CDR3 VH, CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL антитела, выбранного из группы, состоящей из 15461, 20500, 20501, 20502, 20502.1, 22208, 15462, 22213, 15465, 20506, 15483, 20513, 22216, 15489,

- 20516, 15472, 15503, 15495, 15478, 15441 и 20496.
- 16. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 15, отличающиеся тем, что CDR представляют собой CDR, определенные по Кабат, CDR, определенные по Хотиа, или CDR, определенные по AbM.
- 17. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с B7-H4 человека, при этом указанные антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат определяемые по Хотиа или AbM CDR1 VH, CDR2 VH, CDR3 VH, CDR3 VL из 20502.1.
- 18. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с B7-H4 человека, содержащие последовательности определяющего комплементарность участка (CDR) 1 вариабельного участка тяжелой цепи (VH), CDR2 VH, CDR3 VH и CDR1, CDR2 и CDR3 вариабельного участка легкой цепи (VL) из SEQ ID NO: 458-463 соответственно.
- 19. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 18, отличающиеся тем, что (i) указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат вариабельный участок тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 464, и вариабельный участок легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 42, или (ii) указанное антитело содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 469, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 44.
- 20. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с B7-H4 человека, содержащие последовательности определяющего комплементарность участка (CDR) 1 вариабельного участка тяжелой цепи (VH), CDR2 VH, CDR3 VH и CDR1, CDR2 и CDR3 вариабельного участка легкой цепи (VL) из SEQ ID NO: 35-40 соответственно.
- 21. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 20, отличающиеся тем, что (i) указанные антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат вариабельный участок тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 41, и вариабельный участок легкой цепи, содержащий аминокислотную

- последовательность из SEQ ID NO: 42, или (ii) указанное антитело содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 43, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 44.
- 22. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с B7-H4 человека, содержащие последовательности определяющего комплементарность участка (CDR) 1 вариабельного участка тяжелой цепи (VH), CDR2 VH, CDR3 VH и CDR1, CDR2 и CDR3 вариабельного участка легкой цепи (VL) из SEQ ID NO: 65-70 соответственно.
- 23. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 22, отличающиеся тем, что (i) указанные антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат вариабельный участок тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 71, и вариабельный участок легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 72, или (ii) указанное антитело содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 73, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 74.
- 24. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с тем же эпитопом В7-Н4 человека, что и антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-23.
- 25. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-24, отличающиеся тем, что указанные антитело или антигенсвязывающий фрагмент представляют собой антитело человека или его антигенсвязывающий фрагмент.
- 26. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из п. 1, пп. 15-20, п. 22 или п. 24, отличающиеся тем, что указанные антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляют собой мышиное, гуманизированное или химерное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент.
- 27. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-26, отличающиеся тем, что указанные антитело или его антигенсвязывающий фрагмент индуцируют пролиферацию Т-клеток.

- 28. Антитело его антигенсвязывающего фрагмента по п. 27, отличающиеся тем, что указанные антитело или антигенсвязывающий фрагмент усиливают пролиферацию Т-клеток по меньшей мере на 21 % по сравнению с обработкой контрольным антителом.
- 29. Антитело его антигенсвязывающего фрагмента по п. 27, отличающееся тем, что указанные антитело или антигенсвязывающий фрагмент усиливают пролиферацию Т-клеток на от около 5 % до около 35 % по сравнению с обработкой контрольным антителом.
- 30. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-29, отличающиеся тем, что указанные антитело или его антигенсвязывающий фрагмент индуцируют пролиферацию CD4+ Т-клеток.
- 31. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 30, отличающиеся тем, что указанные антитело или его антигенсвязывающий фрагмент усиливают пролиферацию CD4+ Т-клеток по меньшей мере на 9 % по сравнению с обработкой контрольным антителом.
- 32. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 30, отличающиеся тем, что указанные антитело или его антигенсвязывающий фрагмент усиливают пролиферацию CD4+ Т-клеток на от около 5 % до около 15 % по сравнению с обработкой контрольным антителом.
- 33. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-32, отличающиеся тем, что указанные антитело или его антигенсвязывающий фрагмент индуцируют пролиферацию CD8+ T-клеток.
- 34. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 33, отличающиеся тем, что указанные антитело или его антигенсвязывающий фрагмент усиливают пролиферацию CD8+ Т-клеток по меньшей мере на 11 % по сравнению с обработкой контрольным антителом.
- 35. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 34, отличающиеся тем, что указанные антитело или его антигенсвязывающий фрагмент усиливают пролиферацию CD8+ T-клеток на от около 5 % до около 15 % по сравнению с обработкой контрольным

антителом.

- 36. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-35, отличающиеся тем, что указанные антитело или его антигенсвязывающий фрагмент индуцируют продуцирование интерферона-гамма (ИФНү).
- 37. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 36, отличающиеся тем, что указанные антитело или его антигенсвязывающий фрагмент способны увеличивать продукцию ИФНγ по меньшей мере в 2 раза, по меньшей мере в 3 раза, по меньшей мере в 4 раза и по меньшей мере в 5 раз, по меньшей мере в 6 раз, по меньшей мере в 7 раз, по меньшей мере в 8 раз, в от около 2 до около 10 раз или в от около 3 до около 10 раз.
- 38. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-37, отличающиеся тем, что указанные антитело или его антигенсвязывающий фрагмент способны индуцировать антитело-зависимую клеточно-опосредованную цитотоксичность (АЗКЦ) в В7-Н4-экспрессирующей клетке.
- 39. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 38, отличающиеся тем, что указанные антитело или его антигенсвязывающий фрагмент индуцируют специфический лизис по меньшей мере 20 %, по меньшей мере 30 %, по меньшей мере 40 %, от около 20 % до около 50 % или от около 30 % до около 50 % В7-Н4-экспрессирующих клеток.
- 40. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-39, отличающиеся тем, что указанные антитело или его антигенсвязывающий фрагмент ингибируют рост опухоли в модели мышиной СТ26 колоректальной карциномы, мышиной модели 4Т1 карциномы молочной железы или модели линии клеток меланомы В16-moB7-H4/H3.
- 41. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.40, отличающиеся тем, что указанные антитело или его антигенсвязывающий фрагмент снижают рост опухоли по меньшей мере на 25 %, по меньшей мере на 30 %, по меньшей мере на 40 %, по меньшей мере на 45 % или по меньшей мере на 50 % по сравнению с обработкой контрольным антителом.
- 42. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 27-41,

- отличающиеся тем, что индукция пролиферации Т-клеток, индукция пролиферации CD4+ Т-клеток, индукция пролиферации CD8+ Т-клеток, индукция продукции ИФНү, активность АЗКЦ и/или ингибирование роста опухоли зависят от дозы.
- 43. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-42, отличающиеся тем, что указанные антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связываются с В7- Н4 яванского макака (Cynomolgus).
- 44. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-43, отличающиеся тем, что указанные антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связываются с В7- Н4 крысы.
- 45. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-44, отличающиеся тем, что указанные антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связываются с В7- Н4 мыши.
- 46. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-45, отличающиеся тем, что указанные антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связываются с доменом IgV B7-H4 человека.
- 47. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-46, отличающиеся тем, что указанные антитело или его антигенсвязывающий фрагмент являются афукозилированными.
- 48. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-47, отличающееся тем, что антитело является полноразмерным.
- 49. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-47, которые представляют собой антигенсвязывающий фрагмент.
- 50. Антигенсвязывающий фрагмент по п. 49, отличающийся тем, что указанный антигенсвязывающий фрагмент содержит Fab, Fab',  $F(ab')_2$ , одноцепочечный Fv (scFv), дисульфидно-связанный Fv, домен V-NAR, IgNar, интратело, IgG $\Delta$ CH2, минитело,  $F(ab')_3$ , тетратело, триатело, диатело, однодоменное антитело, DVD-Ig, Fcab, мАт  $^2$ , (scFv)  $_2$  или scFv-Fc.

- 51. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-50, дополнительно содержащие детектируемую метку.
- 52. Выделенный полинуклеотид, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую вариабельный участок тяжелой цепи или тяжелую цепь антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп. 1-51.
- 53. Выделенный полинуклеотид по п. 52, отличающийся тем, что указанная молекула нуклеиновой кислоты кодирует VH из SEQ ID NO: 11, 21, 31, 41, 464, 51, 61, 71, 81, 91, 101, 111, 121, 131, 141, 151, 161, 171, 181, 191 или 201 или тяжелую цепь из SEQ ID NO: 13, 23, 33, 43, 469, 53, 63, 73, 83, 93, 103, 113, 123, 133, 143, 153, 163 173, 183, 193 или 203.
- 54. Выделенный полинуклеотид по п. 52, отличающийся тем, что молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность из SEQ ID NO: 213, 223, 233, 243, 470, 253, 263, 273, 283, 293, 303, 313, 323, 333, 343, 353, 363, 373, 383, 393 или 403.
- 55. Выделенный полинуклеотид по п. 52, отличающийся тем, что молекула нуклеиновой кислоты содержит (i) последовательность из SEQ ID NO: 213, 223, 233, 243, 470, 253, 263, 273, 283, 293, 303, 313, 323, 333, 343, 353, 363, 373, 383, 393 или 403 и (ii) последовательность из SEQ ID NO: 408.
- 56. Выделенный полинуклеотид, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую вариабельный участок легкой цепи или легкую цепь антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп. 1-51.
- 57. Выделенный полинуклеотид по п. 56, отличающийся тем, что указанная молекула нуклеиновой кислоты кодирует VL из SEQ ID NO: 12, 22, 32, 42, 52, 62, 72, 82, 92, 102, 112, 122, 132, 142, 152, 162, 172, 182, 192 или 202 или легкую цепь из SEQ ID NO: 14, 24, 34, 44, 54, 64, 74, 84, 94, 104, 114, 124, 134, 144, 154, 164, 174, 184 194 или 204.
- 58. Выделенный полинуклеотид по п. 56, отличающийся тем, что молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность из SEQ ID NO: 214, 224, 234, 244, 254, 264, 274, 284, 294, 304, 314, 324, 334, 344, 354, 364, 374, 384, 394 или 404.

- 59. Выделенный полинуклеотид по п. 56, отличающийся тем, что молекула нуклеиновой кислоты содержит (i) последовательность из SEQ ID NO: 214, 224, 234, 244, 254, 264, 274, 284, 294, 304, 314, 324, 334, 344, 354, 364, 374, 384, 394 или 404 и (ii) последовательность из SEQ ID NO: 406.
- 60. Выделенный полинуклеотид, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую вариабельный участок тяжелой цепи или тяжелую цепь антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп. 1-51, и вариабельный участок легкой цепи или легкую цепь антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп. 1-51.
- 61. Выделенный вектор, содержащий полинуклеотид по любому из пп. 52-60.
- 62. Клетка-хозяин, содержащая полинуклеотид по любому из пп. 52-60, вектор по п. 61 или первый вектор, содержащий полинуклеотид по любому из пп. 52-55, и второй вектор, содержащий полинуклеотид по любому из пп. 56-59.
- 63. Клетка-хозяин по п. 62, которая выбрана из группы, состоящей из *E.coli, Pseudomonas, Bacillus, Streptomyces*, дрожжей, клетки CHO, YB/20, NS0, PER-C6, HEK-293T, NIH-3T3, HeLa, BHK, Hep G2, SP2/0, R1.1, B-W, L-M, COS 1, COS 7, BSC1, BSC40, BMT10, клетки растения, клетки насекомого и клетки человека в культуре ткани.
- 64. Клетка-хозяин по п. 62 или п. 63, отличающаяся тем, что указанная клетка-хозяин лишена функционального гена альфа-1,6-фукозилтрансферазы (FUT8).
- 65. Способ получения антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которые связываются с В7-Н4 человека, включающий культивирование клетки-хозяина по любому из пп. 62-64, так что молекула нуклеиновой кислоты экспрессируется и антитело или его антигенсвязывающий фрагмент продуцируются.
- 66. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с В7-Н4 человека и кодируются полинуклеотидом по любому из пп. 52-60.
- 67. Фармацевтическая композиция, содержащая антитело или его антигенсвязывающий

фрагмент по любому из пп. 1-51 или п. 66 и фармацевтически приемлемый наполнитель.

- 68. Фармацевтическая композиция, содержащая (i) антитела или антигенсвязывающие фрагменты по любому из пп. 1-51 или п. 66 и (ii) фармацевтически приемлемый наполнитель, при этом по меньшей мере 95 % указанных антител или их антигенсвязывающих фрагментов находятся в композиции в афукозилированном состоянии.
- 69. Фармацевтическая композиция, содержащая (i) антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связываются с B7-H4 человека и содержат последовательности определяющего комплементарность участка (CDR) 1 вариабельного участка тяжелой цепи (VH), CDR2 VH, CDR3 VH и CDR1, CDR2 и CDR3 вариабельного участка легкой цепи (VL) из SEQ ID NO: 458-460 соответственно и (ii) фармацевтически приемлемый наполнитель, при этом по меньшей мере 95 % указанных антител или их антигенсвязывающих фрагментов находятся в композиции в афукозилированном состоянии.
- 70. Фармацевтическая композиция по п. 69, отличающаяся тем, что (i) указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат вариабельный участок тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 464, и вариабельный участок легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 42, или (ii) указанное антитело содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 469, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 44.
- 71. Фармацевтическая композиция, содержащая (i) антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связываются с B7-H4 человека и содержат последовательности определяющего комплементарность участка (CDR) 1 вариабельного участка тяжелой цепи (VH), CDR2 VH, CDR3 VH и CDR1, CDR2 и CDR3 вариабельного участка легкой цепи (VL) из SEQ ID NO: 35-40 соответственно и (ii) фармацевтически приемлемый наполнитель, при этом по меньшей мере 95 % указанных антител или их антигенсвязывающих фрагментов находятся в композиции в афукозилированном состоянии.
- 72. Фармацевтическая композиция по п. 71, отличающаяся тем, что (і) указанное антитело

или его антигенсвязывающий фрагмент содержат вариабельный участок тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 41, и вариабельный участок легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 42, или (ii) указанное антитело содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 43, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 44.

- 73. Фармацевтическая композиция, содержащая (i) указанные антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связываются с B7-H4 человека и содержат последовательности определяющего комплементарность участка (CDR) 1 вариабельного участка тяжелой цепи (VH), CDR2 VH, CDR3 VH и CDR1, CDR2 и CDR3 вариабельного участка легкой цепи (VL) из SEQ ID NO: 65-70 соответственно и (ii) фармацевтически приемлемый наполнитель, при этом по меньшей мере 95 % указанных антител или их антигенсвязывающих фрагментов находятся в композиции в афукозилированном состоянии.
- 74. Фармацевтическая композиция по п. 73, отличающаяся тем, что (i) указанные антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат вариабельный участок тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 71, и вариабельный участок легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 72, или (ii) при этом антитело содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 73, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 74.
- 75. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 67-74, отличающаяся тем, что фукозилирование не обнаруживается в композиции.
- 76. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 67-75, дополнительно содержащая анти-PD-1 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент.
- 77. Фармацевтическая композиция по п. 76, отличающаяся тем, что анти-PD-1 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляют собой ниволумаб или пембролизумаб.
- 78. Фармацевтическая композиция по п. 76, отличающаяся тем, что анти-PD-1 антитело или

- его антигенсвязывающий фрагмент представляют собой АМР-514, камрелизумаб, тизелизумаб и спартализумаб.
- 79. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 67-75, дополнительно содержащая анти-PD-L1 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент.
- 80. Способ индукции пролиферации Т-клеток, включающий приведение в контакт Т-клетки с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом по любому из пп. 1-51 или п. 66 или фармацевтической композицией по любому из пп. 67-79.
- 81. Способ по п. 80, отличающийся тем, что пролиферация Т-клеток снижается по меньшей мере на 30 %, по меньшей мере на 40 %, по меньшей мере на 50 %, по меньшей мере на 60 %, по меньшей мере на 70 % или по меньшей мере на 80 %.
- 82. Способ индукции пролиферации CD4+ Т-клеток, включающий приведение в контакт CD4+ Т-клетки с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом по любому из пп. 1-51 или п. 66 или фармацевтической композицией по любому из пп. 67-79.
- 83. Способ по п. 82, отличающийся тем, что пролиферация CD4+ Т-клеток снижается по меньшей мере на 30 %, по меньшей мере на 40 %, по меньшей мере на 50 %, по меньшей мере на 60 %, по меньшей мере на 70 % или по меньшей мере на 80 %.
- 84. Способ индукции пролиферации CD8+ Т-клеток, включающий приведение в контакт CD8+ Т-клетки с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом по любому из пп. 1-51 или п. 66 или фармацевтической композицией по любому из пп. 67-79.
- 85. Способ по п. 84, отличающийся тем, что пролиферация CD8+ Т-клеток снижается по меньшей мере на 30 %, по меньшей мере на 40 %, по меньшей мере на 50 %, по меньшей мере на 60 %, по меньшей мере на 70 % или по меньшей мере на 80 %.
- 86. Способ индукции продукции интерферона-гамма, включающий приведение в контакт Т-клетки с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом по любому из пп. 1-51 или п. 66 или фармацевтической композицией по любому из пп. 67-79.
- 87. Способ по п. 86, отличающийся тем, что продуцирование интерферона-гамма

увеличивается по меньшей мере на 30 %, по меньшей мере на 40 %, по меньшей мере на 50 %, по меньшей мере на 60 %, по меньшей мере на 70 % или по меньшей мере на 80 %.

- 88. Способ уничтожения клетки, экспрессирующей В7-Н4, включающий приведение в контакт указанной клетки с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом по любому из пп. 1-51 или п. 66 или фармацевтической композицией по любому из пп. 67-79.
- 89. Способ деплетирования В7-Н4-экспрессирующих клеток в популяции клеток, включающий приведение в контакт популяции клеток с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом по любому из пп. 1-51 или п. 66 или фармацевтической композицией по любому из пп. 67-79.
- 90. Способ по п. 88 или п. 89, отличающийся тем, что указанное уничтожение или деплетирование происходит посредством АЗКЦ.
- 91. Способ по любому из пп. 80-90, дополнительно включающий приведение в контакт Т-клетки, CD4+ Т-клетки, CD8+ Т-клетки, клетки или популяции клеток с анти-PD-1 антителом или его антигенсвязывающим фрагментом.
- 92. Способ по п. 91, отличающийся тем, что приведение в контакт с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом по любому из пп. 1-51 или п. 66 или с фармацевтической композицией по любому из пп. 67-78 и приведение в контакт с анти-PD-1 антителом или его антигенсвязывающим фрагментом происходит одновременно.
- 93. Способ по п. 91, отличающийся тем, что указанное приведение в контакт с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом по любому из пп. 1-51 или п. 66 или с фармацевтической композицией по любому из пп. 67-78 и приведение в контакт с анти-PD-1 антителом или его антигенсвязывающим фрагментом происходит последовательно.
- 94. Способ по любому из пп. 80-90, дополнительно включающий приведение в контакт Т-клетки, CD4+ Т-клетки, CD8+ Т-клетки, клетки или популяции клеток с анти-PD-L1 антителом или его антигенсвязывающим фрагментом.

- 95. Способ по п. 94, отличающийся тем, что указанное приведение в контакт с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом по любому из пп. 1-51 или п. 66 или с фармацевтической композицией по любому из пп. 67-75 и приведение в контакт с анти-PD-L1 антителом или его антигенсвязывающим фрагментом происходит одновременно.
- 96. Способ по п. 94, отличающийся тем, что указанное приведение в контакт с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом по любому из пп. 1-51 или п. 66 или с фармацевтической композицией по любому из пп. 67-75 и приведение в контакт с анти-PD-L1 антителом или его антигенсвязывающим фрагментом происходит последовательно.
- 97. Способ по любому из пп. 80-96, отличающийся тем, что указанное приведение в контакт происходит *in vitro*.
- 98. Способ по любому из пп. 80-96, отличающийся тем, что указанное приведение в контакт происходит у субъекта.
- 99. Способ лечения рака, экспрессирующего B7-H4, у субъекта, включающий введение субъекту эффективного количества антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп. 1-51 или п. 66 или фармацевтической композиции по любому из пп. 67-79.
- 100. Способ по п. 99, отличающийся тем, что злокачественную опухоль выбирают из группы, содержащей рак молочной железы, рак протоков, рак эндометрия, рак яичников, немелкоклеточный рак легких, рак поджелудочной железы, рак щитовидной железы, рак почки и рак мочевого пузыря.
- 101. Способ по п. 100, отличающийся тем, что рак молочной железы представляет собой тройной негативный рак молочной железы, или отличающийся тем, что немелкоклеточный рак легкого представляет собой плоскоклеточный рак.
- 102. Способ по п. 100, отличающийся тем, что немелкоклеточный рак легкого представляет собой аденокарциному.

- 103. Способ по п. 99, отличающийся тем, что рак выбран из группы, состоящей из рака головы и шеи, мелкоклеточного рака легкого, рака желудка и меланомы.
- 104. Способ по п. 100, отличающийся тем, что рак представляет собой рак яичника, который представляет собой серозную аденокарциному.
- 105. Способ по п. 101, отличающийся тем, что рак представляет собой рак молочной железы, который представляет собой аденокарциному протоков.
- 106. Способ по любому из пп. 99-105, отличающийся тем, что рак представляет собой случай, неадекватно отвечающий на ингибитор PD-1.
- 107. Способ по любому из пп. 99-106, отличающийся тем, что рак представляет собой случай, неадекватно отвечающий на ингибитор PD-L1.
- 108. Способ по любому из пп. 99-107, отличающийся тем, что рак экспрессирует низкий уровень PD-L1.
- 109. Способ по любому из пп. 99-108, отличающийся тем, что субъектом является человек.
- 110. Способ по любому из пп. 99-109, дополнительно включающий введение субъекту анти-PD-1 антитела или его антигенсвязывающего фрагмента.
- 111. Способ по п. 110, отличающийся тем, что введение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп. 1-51 или п. 66 или фармацевтической композиции по любому из пп. 67-78 и введение анти-PD-1 антитела или его антигенсвязывающего фрагмента происходит одновременно.
- 112. Способ по п. 110, отличающийся тем, что введение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп. 1-51 или п. 66 или фармацевтической композиции по любому из пп. 67-78 и введение анти-PD-1 антитела или его антигенсвязывающего фрагмента происходит последовательно.
- 113. Способ по п. 112, отличающийся тем, что введение анти-PD-1 антитела или его

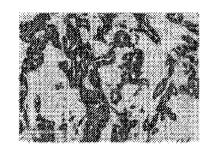
- антигенсвязывающего фрагмента происходит после введения антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп. 1-51 или п. 66 или фармацевтической композиции по любому из пп. 67-78.
- 114. Способ по любому из пп. 91-93, п. 97, п. 98 и пп. 110-113, отличающийся тем, что анти-PD-1 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляют собой ниволумаб или пембролизумаб.
- 115. Способ по любому из пп. 91-93, п. 97, п. 98 и пп. 110-113, отличающийся тем, что анти-PD-1 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляют собой AMP-514, камрелизумаб, тизелизумаб или спартализумаб.
- 116. Способ обнаружения B7-H4 в образце, включающий приведение в контакт указанного образца с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом по любому из пп. 1-51 или п. 66.
- 117. Способ по п. 116, отличающийся тем, что образец получают из рака у субъектачеловека.
- 118. Набор, содержащий антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-51 или п. 66 или фармацевтическую композицию по любому из пп. 67-79 и а) реагент для детекции, b) антиген В7-Н4, c) уведомление, которое отражает одобрение для использования или продажи для введения человеку, или d) их комбинацию.
- 119. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-51 или п. 66, отличающиеся тем, что указанные антитело или его антигенсвязывающий фрагмент ингибируют активность блокады Т-клеточной контрольной точки В7-Н4.
- 120. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 119, отличающиеся тем, что активность блокады Т-клеточной контрольной точки измеряют по увеличению продукции ИЛ-2 по сравнению с контрольными клетками.
- 121. Фармацевтическая композиция, содержащая (i) указанные антитела или антигенсвязывающие фрагменты по любому из пп. 1-51 или п. 66 и (ii) фармацевтически приемлемый наполнитель, при этом указанные антитела или антигенсвязывающие

фрагменты ингибируют активность блокады Т-клеточной контрольной точки В7-Н4.

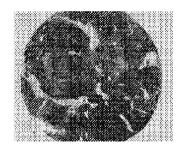
122. Фармацевтическая композиция по п. 121, отличающаяся тем, что активность блокады Т-клеточной контрольной точки измеряется по увеличению продукции ИЛ-2 по сравнению с контрольными клетками.



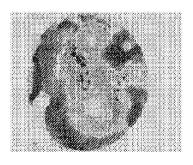
Инвазивный рак протоков



Тройной негативный рак молочной железы



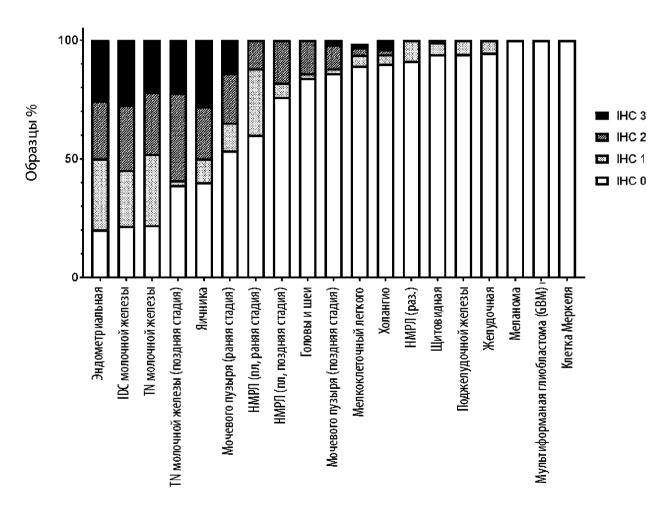
Рак яичников



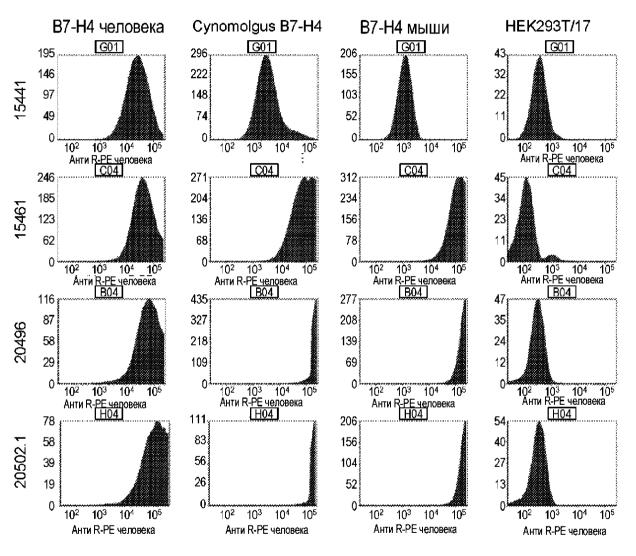
Немелкоклеточный рак легких



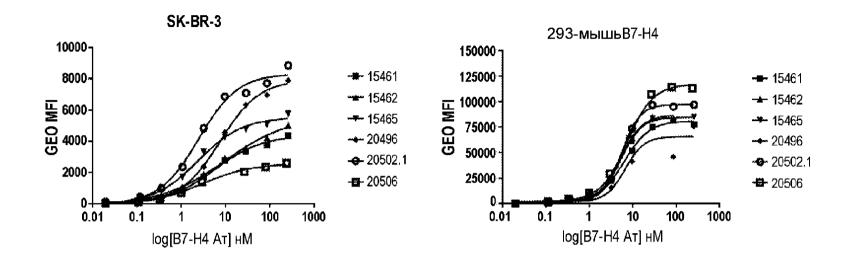
Рак эндометрия

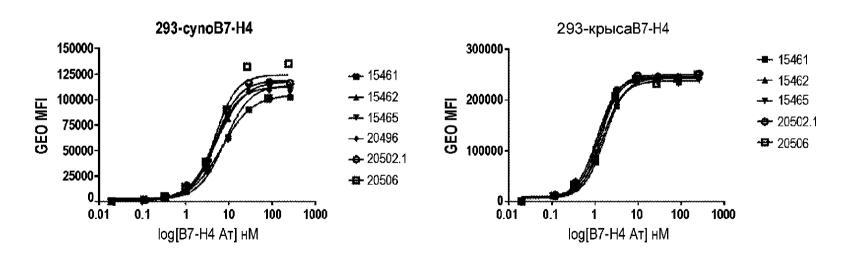


2/22

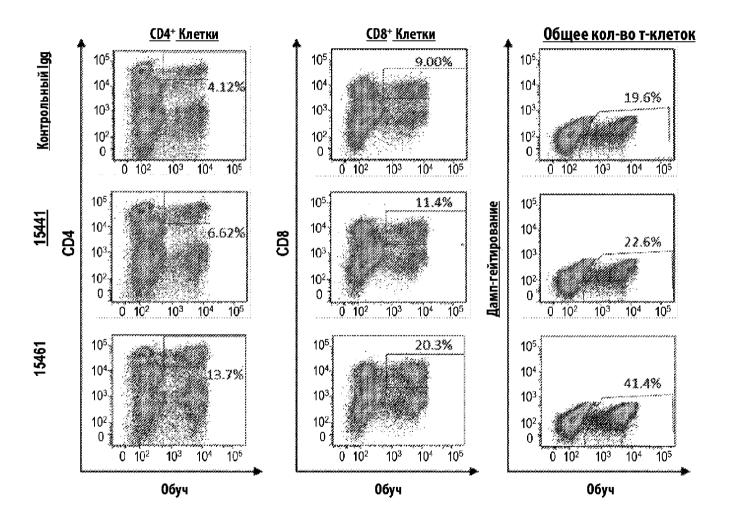


Фиг. 2А

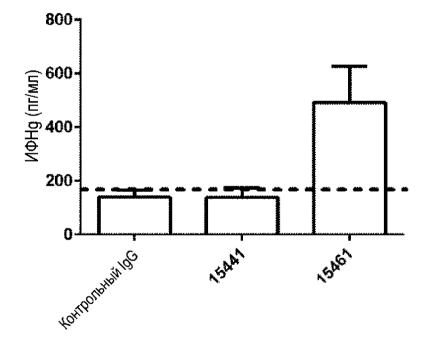




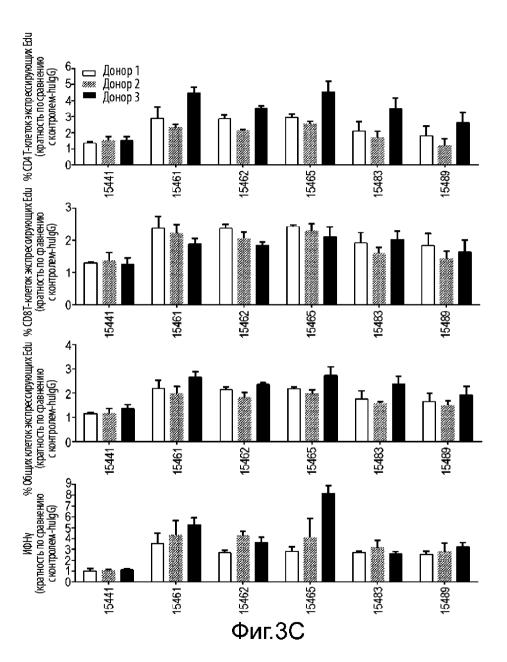
Фиг. 2В

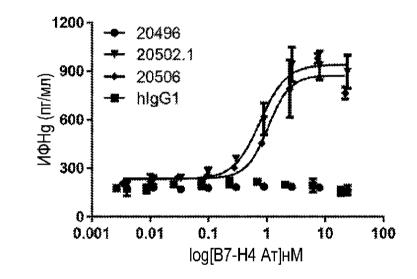


Фиг. 3А

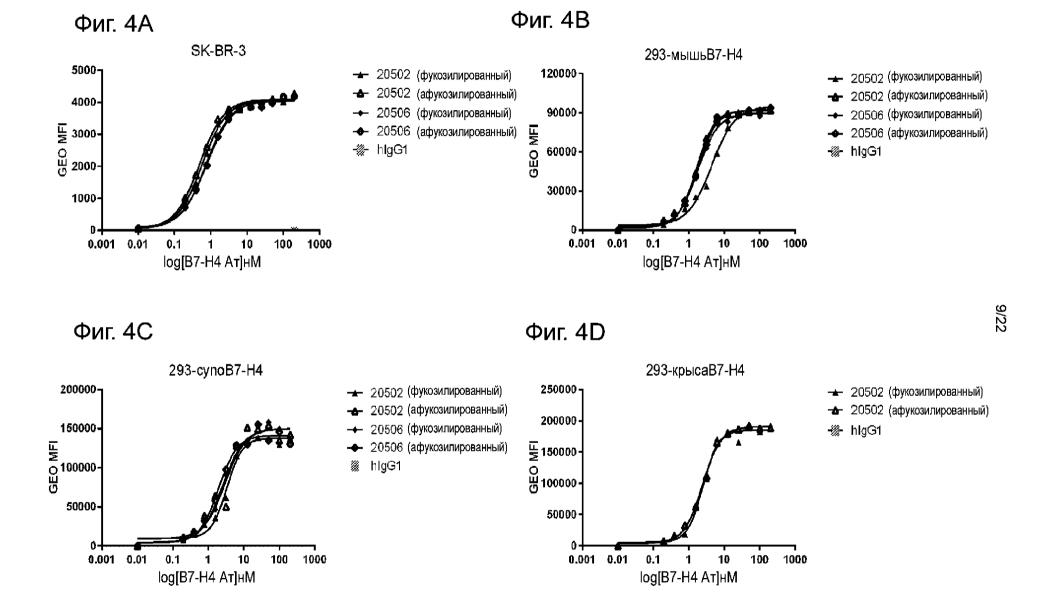


Фиг. 3В



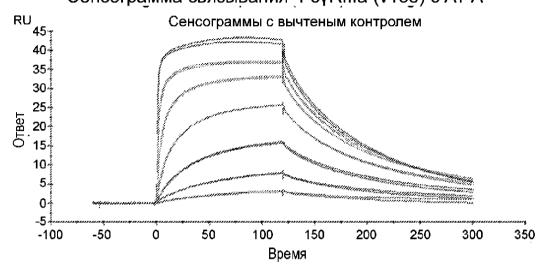


Фиг. 3D



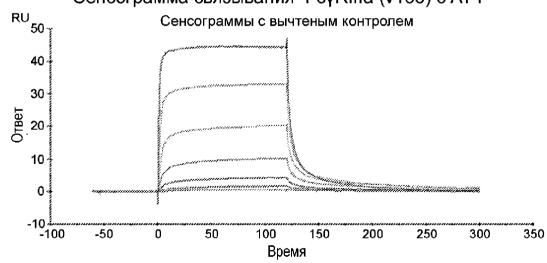
Фиг. 5А

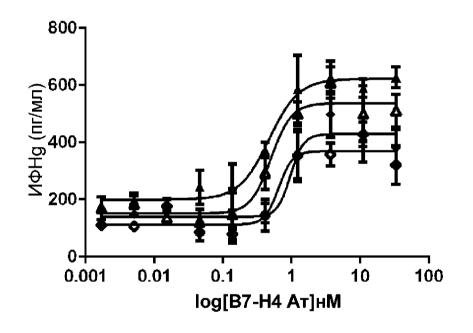




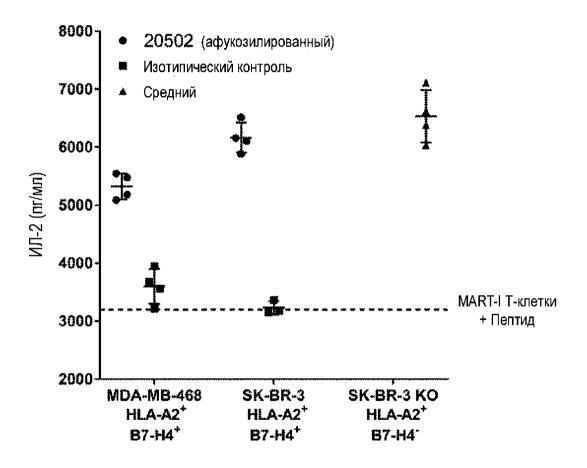
Фиг. 5В

Сенсограмма связывания FcyRIIIa (v158) с Ат-F

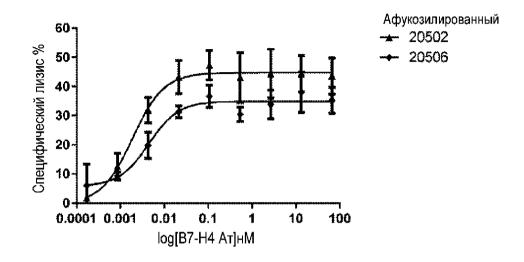


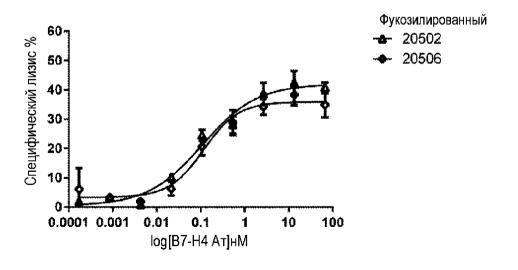


- 🛨 20502 (афукозилированный)
- 📤 20502 (фукозилированный)
- → 20506 (афукозилированный)
- 20506 (фукозилированный)

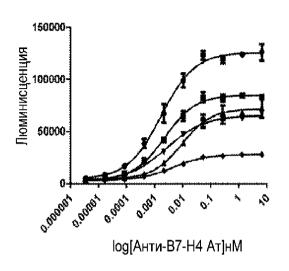


Фиг. 6В



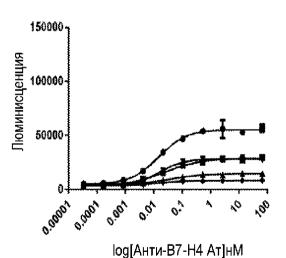


Фиг. 7



## Афукозилированный

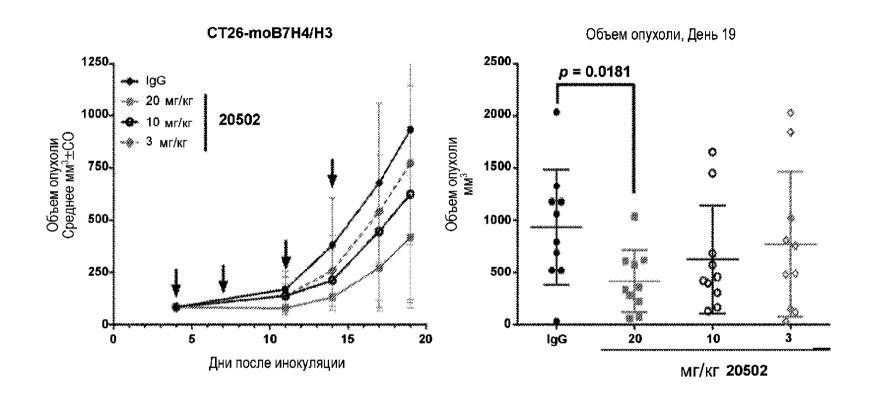
- → SK-BR-3 (342,348 рецепторы)
- НСС1569 (122,474 рецепторы)
- → ZR-75-1 (51,617 рецепторы)
- **---** MDA-MB-468 (34,659 рецепторы)
- → HCC1964 (15,676 рецепторы)



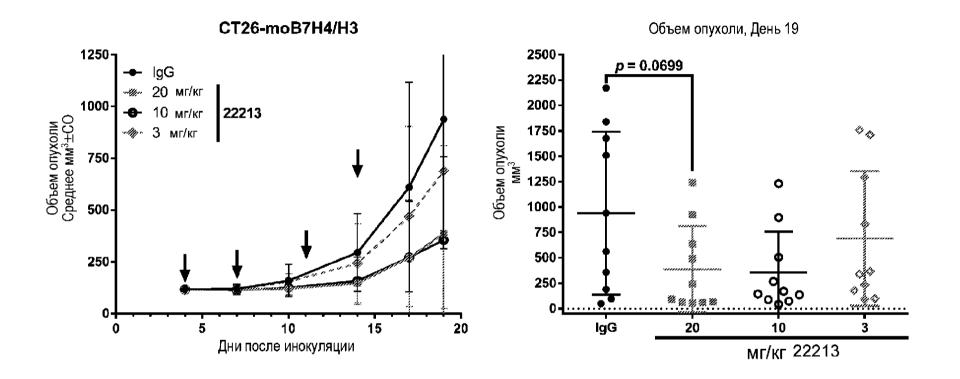
## Фукозилированный

- ◆ SK-BR-3 (342,348 рецепторы)
- **-** HCC1569 (122,474 рецепторы)
- ZR-75-1 (51,617 рецепторы)
- **---** MDA-MB-468 (34,659 рецепторы)
- **—** HCC1964 (15,676 рецепторы)

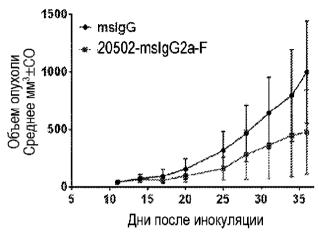
Фиг. 8

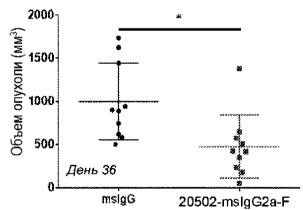


Фиг. 9А

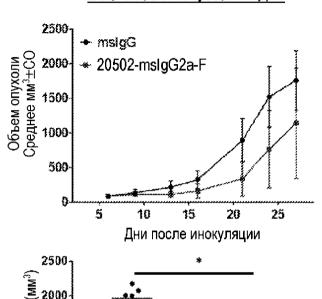


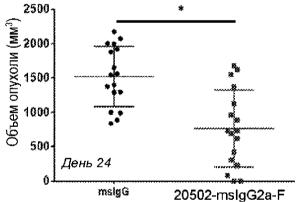
## <u>4T1-moB7-H4/H3 Модель</u>

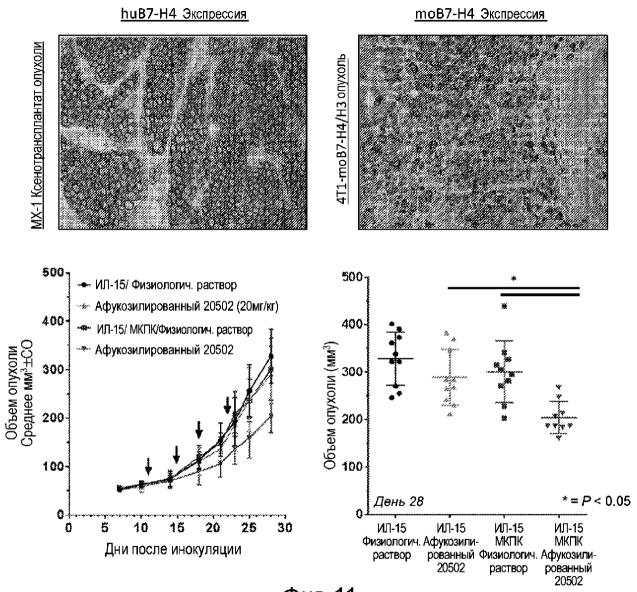




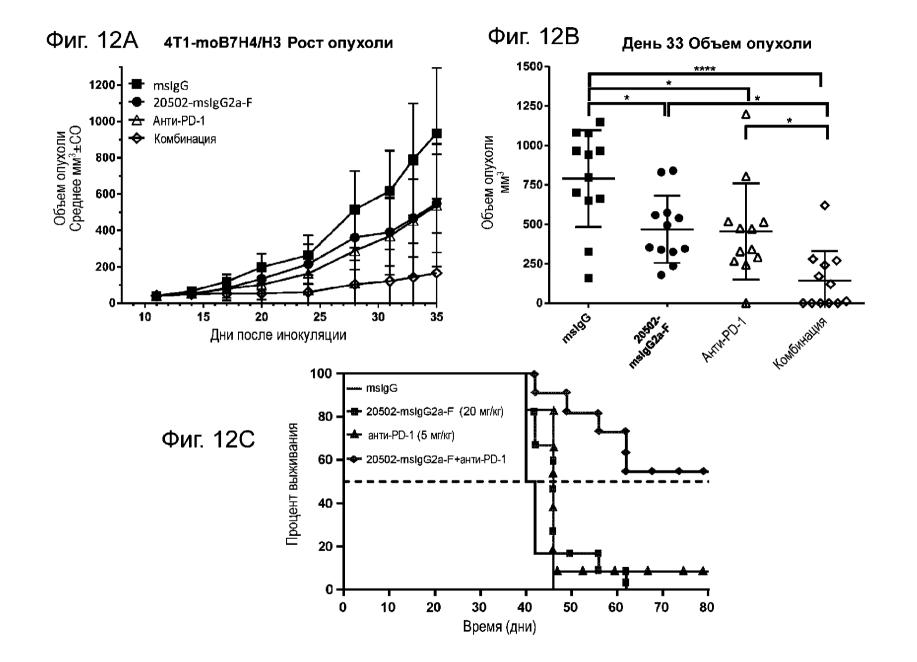
## **B16-moB7-H4/H3** Модель

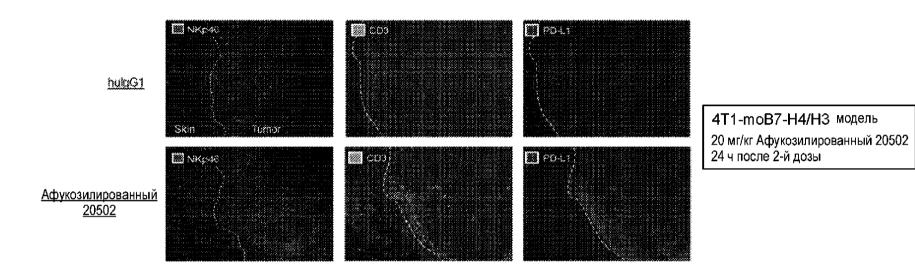






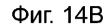
Фиг. 11

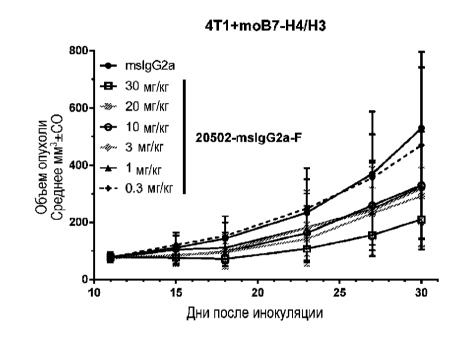


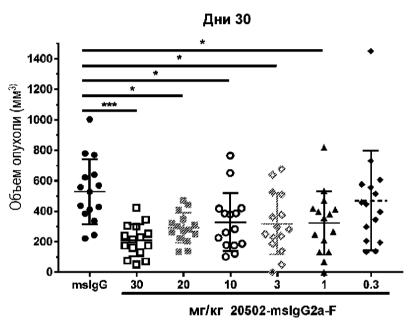


Фиг. 13

Фиг. 14А







Фиг. 15А

Фиг. 15В

