

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202190818** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2021.10.27

(51) Int. Cl. *C07K 16/28* (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2019.10.15

(54) КОМБИНИРОВАННАЯ ТЕРАПИЯ ОНКОЛОГИЧЕСКОГО ЗАБОЛЕВАНИЯ

(31) 62/745,464; 62/802,091; 62/854,494

(32) 2018.10.15; 2019.02.06; 2019.05.30

(33) US

(86) PCT/US2019/056210

(87) WO 2020/081497 2020.04.23

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

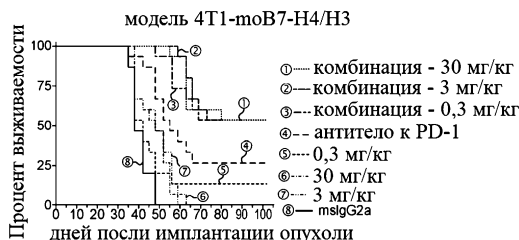
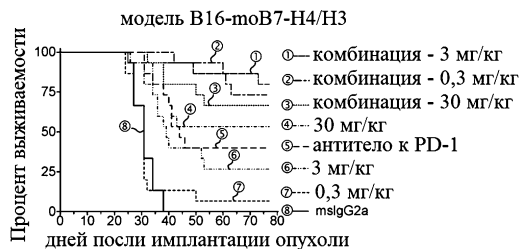
(72) Изобретатель:

**Инамдар Сандип П., Коллинс
Хелен Л., Сян Хун, Чжан Сян,
Марина Нейсса (US)**

(74) Представитель:

**Строкова О.В., Гизатуллин Ш.Ф.,
Гизатуллина Е.М., Лебедев В.В.,
Парамонова К.В., Джермакян Р.В.,
Христофоров А.А., Угрюмов В.М.,
Костюшенкова М.Ю. (RU)**

(57) В настоящем изобретении представлены способы введения антител и их антигенсвязывающих фрагментов, которые специфически связываются с B7-H4 человека, субъекту, нуждающемуся в этом, например пациенту с онкологическим заболеванием, в комбинации с антагонистом PD-1/PD-L1, таким как антитело к PD-1.



A1

202190818

202190818

A1

КОМБИНИРОВАННАЯ ТЕРАПИЯ ОНКОЛОГИЧЕСКОГО ЗАБОЛЕВАНИЯ

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

[0001] Настоящее раскрытие относится к способам введения антител, которые специфически связываются с B7-H4 человека в комбинации с антагонистом PD-1/PD-L1, таким как пембролизумаб, для лечения таких заболеваний, как онкологическое заболевание. Предлагаются схемы введения, обладающие преимуществом.

1. УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[0002] B7-H4 (также известный как B7х, B7-S1 и VTCN1) представляет собой иммунорегулирующую молекулу, которая имеет гомологию с другими членами семейства B7, включая PD-L1. Это трансмембранный белок I типа, состоящий из эктодоменов IgV и IgC. В то время как экспрессия B7-H4 в здоровых тканях относительно ограничена на уровне белка, B7-H4 экспрессируется в нескольких солидных опухолях, таких как гинекологические карциномы молочной железы, яичников и эндометрия. Экспрессия B7-H4 в опухолях имеет тенденцию коррелировать с неблагоприятным прогнозом. Рецептор B7-H4 неизвестен, но предполагается, что он экспрессируется на Т-клетках. Считается, что B7-H4 напрямую ингибирует активность Т-клеток.

[0003] Учитывая экспрессию и функцию B7-H4, антитела, которые специфически связываются с B7-H4, разрабатываются для терапии, включающей модуляцию активности B7-H4, например, для лечения онкологического заболевания.

[0004] PD-1 является ключевым рецептором иммунной контрольной точки, экспрессируемым активированными Т- и В-клетками, и опосредует иммуносупрессию. PD-1 является членом семейства рецепторов CD28, которое включает CD28, CTLA-4, ICOS, PD-1 и BTLA. Были идентифицированы два гликопротеиновых лиганда клеточной поверхности для PD-1, лиганд программируемой клеточной гибели-1 (PD-L1) и лиганд программируемой клеточной гибели-2 (PD-L2), которые экспрессируются на антигенпрезентирующих клетках, а также на многих злокачественных клетках человека и было показано, что они подавляют активацию Т-клеток и секрецию цитокинов при связывании с PD-1. Ингибирование взаимодействия PD-1/PD-L1, например, антителами к PD-1 или к PD-L1, опосредует сильную противоопухолевую активность.

[0005] Соответственно, существует потребность в эффективных схемах введения для введения антител, которые связываются с B7-H4 и ингибиторами взаимодействия PD-1/PD-L1.

2. КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0006] В настоящем документе представлены способы введения антител к B7-H4 и их антигенсвязывающих фрагментов в комбинации с антагонистом PD-1/PD-L1 с применением терапевтически эффективной схемы введения. Антитела к B7-H4 и их антигенсвязывающие фрагменты могут быть антителом 20502 или его антигенсвязывающим фрагментом; или антитело или антигенсвязывающий фрагмент, содержащий переменную область тяжелой и легкой цепей CDR антитела 20502; или антитело, или антигенсвязывающий фрагмент, содержащий переменные области тяжелой и легкой цепей антитела 20502, включая афукозилированные формы любого из вышеперечисленных. Антагонист PD-1/PD-L1 может представлять собой антитело к PD-1, такое как пембролизумаб, или антитело, или антигенсвязывающий фрагмент, содержащий переменную область тяжелой и легкой цепей CDR пембролизумаба; или антитело, или антигенсвязывающий фрагмент, содержащий переменные области тяжелой и легкой цепей пембролизумаба.

[0007] В некоторых аспектах способ лечения солидной опухоли у субъекта человека включает введение субъекту (a) от около 0,1 до около 20 мг/кг антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которое специфически связывается с B7-H4 человека и содержит последовательности определяющей комплементарность переменной области тяжелой цепи (VH) (CDR) 1, VH CDR2, VH CDR3 и переменной области легкой цепи (VL) CDR1, VL CDR2 и VL CDR3 антитела 20502; и (b) около 200 мг пембролизумаба. В некоторых вариантах реализации, (a) и (b) вводят одновременно или последовательно.

[0008] В некоторых аспектах способ лечения солидной опухоли у субъекта-человека, включает введение субъекту (a) фармацевтической композиции, содержащей (i) антитела или их антигенсвязывающий фрагмент, причем антитела или их антигенсвязывающие фрагменты специфически связываются с B7-H4 человека и содержат последовательности определяющей комплементарность области (CDR) 1 переменной области тяжелой цепи (VH), CDR2 VH, CDR3 VH и CDR1 переменной области легкой цепи (VL), CDR2 VL и CDR3 VL антитела 20502 и (ii) фармацевтически приемлемый наполнитель, причем по меньшей мере 95% антител или их антигенсвязывающих фрагментов в композиции являются афукозилированными, и при этом вводят от около 0,1 до около 20 мг/кг антител или их антигенсвязывающих фрагментов; и (b) фармацевтической композиции, содержащей пембролизумаб, при этом вводят около 200 мг пембролизумаба. В некоторых вариантах реализации, (a) и (b) вводят одновременно или последовательно.

[0009] В некоторых аспектах указанные CDR антител или антигенсвязывающих

фрагментов представляют собой CDR, определенные по Кабат, CDR, определенные по Чотиа, или CDR, определенные по AbM. В некоторых аспектах указанные последовательности VH CDR1, VH CDR2, VH CDR3, VL CDR1, VL CDR2 и CDR3 содержат аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 5-10 соответственно.

[0010] В некоторых аспектах субъекту вводят около 20 мг/кг или 20 мг/кг антитела к B7-H4 или его антигенсвязывающего фрагмента. В некоторых аспектах субъекту вводят около 10 мг/кг или 10 мг/кг антитела к B7-H4 или его антигенсвязывающего фрагмента. В некоторых аспектах субъекту вводят около 3 мг/кг или 3 мг/кг антитела к B7-H4 или его антигенсвязывающего фрагмента. В некоторых аспектах субъекту вводят около 1 мг/кг или 1 мг/кг антитела к B7-H4 или его антигенсвязывающего фрагмента. В некоторых аспектах субъекту вводят около 0,3 мг/кг или 0,3 мг/кг антитела к B7-H4 или его антигенсвязывающего фрагмента. В некоторых аспектах субъекту вводят около 0,1 мг/кг или 0,1 мг/кг антитела к B7-H4 или его антигенсвязывающего фрагмента.

[0011] В некоторых аспектах указанное антитело к B7-H4 или его антигенсвязывающий фрагмент, и/или пембролизумаб вводят приблизительно один раз в три недели.

[0012] В некоторых аспектах указанное антитело к B7-H4 или его антигенсвязывающий фрагмент, и/или пембролизумаб вводят внутривенно.

[0013] В некоторых аспектах B7-H4 был обнаружен в солидной опухоли с использованием иммуногистохимии (ИГХ) до его введения.

[0014] В некоторых аспектах указанное антитело к B7-H4 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит VH, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 11, и/или VL, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 12. В некоторых аспектах указанное антитело к B7-H4 или антигенсвязывающий фрагмент содержит константную область тяжелой цепи и/или константную область легкой цепи. В определенных аспектах указанная константная область тяжелой цепи представляет собой константную область тяжелой цепи иммуноглобулина IgG₁ человека и/или константная область легкой цепи представляет собой константную область легкой цепи иммуноглобулина IgG_k человека. В некоторых аспектах указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит константную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 25, и/или константную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 23. В некоторых аспектах указанное антитело к B7-H4 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 21, и/или легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность,

приведенную в SEQ ID NO: 22

[0015] В некоторых аспектах указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляет собой антитело человека или его антигенсвязывающий фрагмент.

[0016] В некоторых аспектах указанное антитело к B7-H4 или его антигенсвязывающий фрагмент является афукозилированным.

[0017] В некоторых аспектах указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляет собой полноразмерное антитело. В некоторых аспектах указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляет собой антигенсвязывающий фрагмент. В некоторых аспектах указанный антигенсвязывающий фрагмент содержит или представляет собой Fab, Fab', F(ab')₂, одноцепочечный Fv (scFv), дисульфидносвязанный Fv, домен V-NAR, IgNar, интратело, IgGACH2, минитело, F(ab')₃, тетратело, триатело, диатело, однодоменное антитело, DVD-Ig, Fcab, mAb², (scFv)₂ или scFv-Fc.

[0018] В некоторых аспектах уровень фукозилирования является не обнаруживаемым в композиции, содержащей антитела к B7-H4.

[0019] В определенных аспектах указанная солидная опухоль экспрессирует B7-H4.

[0020] В некоторых аспектах указанная солидная опухоль является неоперабельной, местнораспространенной или метастатической.

[0021] В некоторых аспектах указанная солидная опухоль выбрана из группы, состоящей из рака молочной железы, протоковой карциномы, карциномы эндометрия, рака яичников, уротелиального рака, немелкоклеточного рака легкого, рака поджелудочной железы, рака щитовидной железы, рака почки и рака мочевого пузыря. В определенных аспектах указанная солидная опухоль представляет собой рак молочной железы, рак яичников, рак эндометрия или уротелиальный рак. В определенных аспектах указанный рак молочной железы представляет собой рак молочной железы на поздней стадии. В некоторых аспектах указанный рак молочной железы является HER2-отрицательным. В некоторых аспектах указанный рак молочной железы представляет собой трижды негативный рак молочной железы. В определенных аспектах указанный рак молочной железы представляет собой рак молочной железы, положительный в отношении рецепторов гормонов (HR). В некоторых аспектах указанный немелкоклеточный рак легкого представляет собой плоскоклеточный рак. В некоторых аспектах указанный субъект не получал предшествующую терапию антагонистом PD-1/PD-L1.

[0022] В некоторых аспектах указанный способ дополнительно включает мониторинг количества иммунных клеток в опухоли. В некоторых аспектах указанный способ дополнительно включает мониторинг количества естественных клеток-киллеров (NK), клеток CD4⁺ и/или клеток CD8⁺ в опухоли. В некоторых аспектах указанный способ

дополнительно включает мониторинг уровней цитокинов у субъекта. В некоторых аспектах указанный способ дополнительно включает мониторинг уровней IL-2, IL-6, IL-10, TNF и/или гамма-интерферона (IFN γ) у субъекта.

[0023] В некоторых аспектах введение антитела к B7-H4 или его антигенсвязывающего фрагмента, и антитела к PD-1 или его антигенсвязывающего фрагмента приводит к синергетическому эффекту.

[0024] В некоторых аспектах способ лечения солидной опухоли у субъекта-человека включает введение субъекту (i) около 20 мг/кг антитела к B7-H4, которое специфически связывается с B7-H4 человека и содержит VH, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 11 и VL, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 12; и (ii) около 200 мг антитела к PD-1, содержащего VH, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 32, и VL, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 33, причем антитело к B7-H4 и антитело к PD-1 вводят внутривенно приблизительно один раз в три недели.

[0025] В определенных аспектах способ лечения солидной опухоли у субъекта-человека включает введение субъекту (a) фармацевтической композиции, содержащей (i) антитела к B7-H4, которые специфически связываются с B7-H4 человека и содержат VH, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 11 и VL, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 12, и (ii) фармацевтически приемлемый наполнитель, причем по меньшей мере 95% их антител к B7-H4 в композиции афукозилированы, и при этом вводят около 20 мг/кг антител; и (b) фармацевтической композиции, содержащей антитело к PD-1 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащий VH, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 32, и VL, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 33 и фармацевтически приемлемый наполнитель, причем вводят около 200 мг антитела или антигенсвязывающего фрагмента, при этом антитело к B7-H4 и антитело к PD-1 вводят внутривенно приблизительно один раз в три недели.

[0026] В некоторых аспектах указанное антитело к B7-H4 содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 21, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 22. В некоторых аспектах указанное антитело к PD-1 содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 30, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 31.

[0027] В определенных аспектах указанная солидная опухоль представляет собой рак молочной железы, необязательно, при этом рак молочной железы представляет собой трижды негативный рак молочной железы или рак яичников.

3. КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

[0028] На Фиг. 1А, 1В и 1С продемонстрирована *in vivo* противоопухолевая эффективность антитела к В7-Н4 в комбинации с антителом к PD-1. (См. Пример 4).

[0029] На Фиг. 2 продемонстрирована дозозависимая противоопухолевая активность антитела к В7-Н4. (См. Пример 4).

[0030] На Фиг. 3 продемонстрировано, что антитело к В7-Н4 синергетически сочетается с антителом к PD1, даже когда антитело к В7-Н4 вводят в дозе, которая не эффективна в качестве монотерапии. (См. Пример 4).

4. ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0031] В настоящем документе представлены способы введения антител (*например*, моноклональных антител) и их антигенсвязывающих фрагментов, которые специфически связываются с В7-Н4 (*например*, с В7-Н4 человека), в комбинации с антагонистом PD-1/PD-L1 (*например*, пембролизумабом). Антитела к В7-Н4 и их антигенсвязывающие фрагменты можно вводить в комбинации с антагонистом PD-1/PD-L1 (*например*, пембролизумабом), *например*, для лечения солидной опухоли у субъекта. В конкретном варианте осуществления около 20 мг/кг, около 10 мг/кг, около 3 мг/кг, около 1 мг/кг, около 0,3 мг/кг или около 0,1 мг/кг антитела или его антигенсвязывающего фрагмента вводят субъекту в комбинации с около 200 мг пембролизумаба, *например*, при этом введение выполняют около каждые три недели.

4.1 Терминология

[0032] Термин «В7-Н4», в контексте данного документа, относится к полипептидам В7-Н4 млекопитающих, включая, но не ограничиваясь этим, нативные полипептиды В7-Н4 и изоформы полипептидов В7-Н4. «В7-Н4» включает полноразмерные необработанные полипептиды В7-Н4, а также формы полипептидов В7-Н4, которые возникают в результате процессинга внутри клетки. Термин «В7-Н4 человека», в контексте данного документа, относится к полипептиду, содержащему аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 1. «Полинуклеотид В7-Н4», «нуклеотид В7-Н4» или «нуклеиновая кислота В7-Н4» относятся к полинуклеотиду, кодирующему В7-Н4.

[0033] 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 вариабельной области молекулы иммуноглобулина. Термин «антитело», в контексте данного документа, 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 принадлежать любому из пяти основных классов иммуноглобулинов: IgA, IgD, IgE, IgG и IgM или их подклассов (изотипов) (например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и IgA2), на основании идентичности их константных доменов тяжелой цепи называемых альфа, дельта, эpsilon, гамма и мю, соответственно. Различные классы иммуноглобулинов имеют различные и хорошо известные структуры субъединиц и трехмерные конфигурации. Антитела могут быть неконъюгированными или конъюгированными с другими молекулами, такими как токсины, радиоизотопы и т.д.

[0034] Термин «фрагмент антитела» относится к части интактного антитела. «Антигенсвязывающий фрагмент», «антигенсвязывающий домен» или «антигенсвязывающая область» относится к части интактного антитела, которая связывается с антигеном. Антигенсвязывающий фрагмент может содержать сайт распознавания антигена интактного антитела (например, определяющие комплементарность области (CDR), достаточные для специфического связывания антигена). Примеры антигенсвязывающих фрагментов антител включают, но не ограничиваются ими, фрагменты Fab, Fab', F(ab')₂ и Fv, линейные антитела и одноцепочечные антитела. Антигенсвязывающий фрагмент антитела может быть получен от любого вида животных, таких как грызуны (*например*, мышь, крыса или хомяк) и человека, или может быть получен искусственно.

[0035] Термины «антитело к B7-H4», «антитело B7-H4» и «антитело, которое связывается с B7-H4» относятся к антителу, которое способно специфически связывать B7-H4 с достаточной аффинностью, так что антитело становится пригодным в качестве диагностического и/или терапевтического средства нацеливания на B7-H4. Термины «специфическое связывание», «иммуноспецифическое связывание», «иммуноспецифическое распознавание» и «специфическое распознавание», в контексте данного документа, являются аналогичными терминами в контексте антител или их антигенсвязывающих фрагментов. Эти термины указывают на то, что антитело или его

антигенсвязывающий фрагмент связывается с эпитопом через его антигенсвязывающий домен и что связывание влечет за собой некоторую комплементарность между антигенсвязывающим доменом и эпитопом. Соответственно, антитело, которое «специфически связывается» с B7-H4 человека (SEQ ID NO: 1), может также связываться с B7-H4 других видов (например, B7-H4 яванского макака, мыши и/или крысы) и/или белками B7-H4, продуцируемыми другими аллелями человека, но степень связывания с неродственным, не-B7-H4 белком (например, другими членами семейства белков B7, такими как PD-L1) составляет менее чем около 10% связывания антитела к B7-H4, как измерено, например, с помощью радиоиммуноанализа (РИА). В конкретном варианте осуществления в настоящем документе предусмотрено антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который специфически связывается с B7-H4 человека, яванского макака, мыши и крысы.

[0036] «Моноклональное» антитело или его антигенсвязывающий фрагмент относится к популяции гомогенного антитела или антигенсвязывающего фрагмента, участвующего в высокоспецифическом связывании одной антигенной детерминанты или эпитопа. Этим они отличаются от поликлональных антител, которые обычно включают различные антитела, направленные против различных антигенных детерминант. Термин «моноклональное» антитело или его антигенсвязывающий фрагмент охватывает как интактные, так и полноразмерные моноклональные антитела, а также фрагменты антител (такие как Fab, Fab', F(ab')₂, Fv), одноцепочечные (scFv) мутанты, слитые белки, содержащие часть антитела, и любую другую модифицированную молекулу иммуноглобулина, содержащую сайт распознавания антигена. Кроме того, «моноклональное» антитело или его антигенсвязывающий фрагмент относится к таким антителам и их антигенсвязывающим фрагментам, полученным любым количеством способов, включая, но не ограничиваясь, гибридомой, селекцией с помощью фагового дисплея, рекомбинантной экспрессией и трансгенными животными.

[0037] В контексте данного документа термины «вариабельная область» или «вариабельный домен» используются взаимозаменяемо и являются общими в данной области техники. Указанная вариабельная область обычно относится к фрагменту антитела, как правило, к фрагменту легкой или тяжелой цепи, обычно около аминоконцевого участка от 110 до 120 аминокислот или от 110 до 125 аминокислот в зрелой тяжелой цепи и от около 90 до 115 аминокислот в зрелой легкой цепи, которые различаются по последовательности среди антител и используются для связывания и специфичности конкретного антитела в отношении его конкретного антигена. Вариабельность последовательности сосредоточена в тех областях, которые называются определяющими комплементарность областями (CDR),

в то время как более высококонсервативные области в вариабельном домене называются каркасными областями (FR). Не желая связываться каким-либо конкретным механизмом или теорией, считается, что CDR легкой и тяжелой цепей в первую очередь ответственны за взаимодействие и специфичность антитела с антигеном. В некоторых вариантах осуществления указанная вариабельная область представляет собой вариабельную область человека. В некоторых вариантах осуществления указанная вариабельная область включает CDR грызунов или мышей, и каркасные области человека (FR). В конкретных вариантах осуществления указанная вариабельная область представляет собой вариабельную область приматов (*например*, приматов, отличных от человека). В некоторых вариантах осуществления указанная вариабельная область содержит CDR грызунов или мышей, и каркасные области (FR) приматов (*например*, приматов, не относящихся к человеку).

[0038] Термины «VL» и «домен VL» используются взаимозаменяемо для обозначения вариабельной области легкой цепи антитела.

[0039] Термины «VH» и «VH домен» используются взаимозаменяемо для обозначения вариабельной области тяжелой цепи антитела.

[0040] Термин «нумерация по Кабат» и подобные термины известны в данной области техники и относятся к системе нумерации аминокислотных остатков в вариабельных областях тяжелой и легкой цепей антитела или его антигенсвязывающего фрагмента. В некоторых аспектах CDR могут быть определены в соответствии с системой нумерации по 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 с 31 по 35, которые необязательно могут включать одну или две дополнительные аминокислоты, следующие за 35 (обозначенные в схеме нумерации по Кабат, как 35A и 35B) (CDR1), положения аминокислот с 50 по 65 (CDR2) и положения аминокислот с 95 по 102 (CDR3). Используя систему нумерации по Кабат, CDR в легкой цепи молекулы антитела обычно присутствуют в положениях аминокислот с 24 по 34 (CDR1), положениях аминокислот с 50 по 56 (CDR2) и положениях аминокислот с 89 по 97 (CDR3). В конкретном варианте осуществления указанные CDR описанных в данном документе антител были определены в соответствии со схемой нумерации по Кабат.

[0041] Нумерация по Чотия, напротив, относится к расположению структурных петель (Chothia and Lesk, J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987)). Конец петли CDR-H1 по Чотия при нумерации согласно системе нумерации по Кабат варьируется между H32 и H34 в

зависимости от длины петли (это связано с тем, что в схеме нумерации по Кабат в H35A и H35B размещаются вставки; если ни 35A, ни 35B не присутствуют, петля заканчивается на 32; если присутствует только 35A, петля заканчивается на 33; если присутствуют оба 35A и 35B, петля заканчивается на 34). Гипервариабельные области по AbM представляют собой компромиссный вариант между CDR по Кабат и структурными петлями по Чотия, и используются в программном обеспечении для моделирования антител Oxford Molecular's AbM.

Петля	Кабат	AbM	Чотия
L1	L24-L34	L24-L34	L24-L34
L2	L50-L56	L50-L56	L50-L56
L3	L89-L97	L89-L97	L89-L97
H1	H31-H35B	H26-H35B	H26-H32..34
		Нумерация по Кабат	
H1	H31-H35	H26-H35	H26-H32
		Нумерация по Чотия	
H2	H50-H65	H50-H58	H52-H56
H3	H95-H102	H95-H102	H95-H102

[0042] Термины «константная область» или «константный домен», в контексте данного документа, являются взаимозаменяемыми и имеют общепринятое значение в данной области техники. Константная область представляет собой фрагмент антитела, *например*, карбоксильный концевой фрагмент легкой и/или тяжелой цепи, который не участвует непосредственно в связывании антитела с антигеном, но может проявлять различные эффекторные функции, такие как взаимодействие с рецептором Fc. Константная область молекулы иммуноглобулина обычно имеет более консервативную аминокислотную последовательность по сравнению с вариабельным доменом иммуноглобулина. В некоторых аспектах антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержит константную область или ее часть, достаточную для антителозависимой клеточно-опосредованной цитотоксичности (ADCC).

[0043] Термин «тяжелая цепь», в контексте данного документа, когда он используется в отношении антитела, может относиться к любому отдельному типу, *например*, альфа (α), дельта (δ), эпсилон (ϵ), гамма (γ) и мю (μ), на основе аминокислотной последовательности константного домена, которые дают начало классам антител IgA, IgD, IgE, IgG и IgM, соответственно, включая подклассы IgG, *например*, IgG₁, IgG₂, IgG₃ и IgG₄. Аминокислотные последовательности тяжелой цепи хорошо известны в данной области

техники. В конкретных вариантах осуществления, тяжелая цепь представляет собой тяжелую цепь человека.

[0044] Термин «легкая цепь», в контексте данного документа, при использовании в отношении антитела может относиться к любому отдельному типу, *например*, каппа (κ) или лямбда (λ) на основе аминокислотной последовательности константных доменов. Аминокислотные последовательности легкой цепи хорошо известны в данной области техники. В конкретный вариант осуществления, легкая цепь представляет собой легкую цепь человека.

[0045] Термин «химерные» антитела или их антигенсвязывающие фрагменты относятся к антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, в которых аминокислотная последовательность получена от двух или более видов. Как правило, переменная область как легких, так и тяжелых цепей соответствует переменной области антител или их антигенсвязывающих фрагментов, полученных от одного вида млекопитающих (например, мыши, крысы, кролика и т.д.) с желаемой специфичностью, аффинностью и характеристиками, в то время как константные области гомологичны последовательностям антител или их антигенсвязывающих фрагментов, полученным от другого источника (как правило, человека), чтобы избежать индукции иммунного ответа у этого вида.

[0046] Термин «гуманизированное» антитело или его антигенсвязывающий фрагмент относится к формам антител, не являющихся человеческими (например, мышинных) или антигенсвязывающим фрагментам, которые представляют собой специфические цепи иммуноглобулина, химерные иммуноглобулины или их фрагменты, которые содержат минимальное количество не являющихся человеческими (например, мышинные) последовательностей. Как правило, гуманизированные антитела или антигенсвязывающие фрагменты представляют собой иммуноглобулины человека, в которых остатки из определяющей комплементарности области (CDR) заменены остатками из CDR не относящихся к человеку видов (например, мыши, крысы, кролика, хомяка), которые имеют желаемую специфичность, аффинность и характеристики («с привитой CDR») (Jones et al., Nature 321:522-525 (1986); Riechmann et al., Nature 332:323-327 (1988); Verhoeven et al., Science 239:1534-1536 (1988)). В некоторых случаях определенные остатки каркасной области (FR) Fv иммуноглобулина человека заменяются соответствующими остатками антитела или фрагмента из отличных от человека видов, которое обладает желаемой специфичностью, аффинностью и характеристиками. Гуманизированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент может быть дополнительно модифицирован путем замены дополнительных остатков или в каркасной области Fv и/или в пределах нечеловеческих остатков CDR для улучшения и оптимизации специфичности, аффинности, и/или

характеристик антитела или его антигенсвязывающего фрагмента. В общем, гуманизированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент будет содержать переменные домены, содержащие все или практически все области CDR, которые соответствуют нечеловеческому иммуноглобулину, тогда как все или практически все области FR являются областями консенсусной последовательности иммуноглобулина человека. Гуманизированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент может также содержать по меньшей мере часть константной области или домена (Fc) иммуноглобулина, как правило, иммуноглобулина человека. Примеры способов, используемых для создания 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 «гуманизированное антитело» представляет собой антитело с измененной поверхностью.

[0047] Термин «антитело человека» или его антигенсвязывающий фрагмент означает антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, имеющий аминокислотную последовательность, полученную из локуса гена иммуноглобулина человека, где такое антитело или антигенсвязывающий фрагмент получают с использованием любого способа, известного в данной области техники. Это определение антитела человека или его антигенсвязывающего фрагмента включает интактные или полноразмерные антитела и их фрагменты.

[0048] «Афукозилированное» антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, или его антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент «без фукозы» относится к изотипному антителу IgG1 или IgG3, или его антигенсвязывающему фрагменту, в котором отсутствует фукоза в его гликозилировании константной области. Гликозилирование IgG1 или IgG3 человека происходит в Asn297 в виде гликозилирования корового фукозилированного биантенного комплексного олигосахарида с окончанием из вплоть до 2 остатков Gal. В некоторых вариантах осуществления афукозилированное антитело лишено фукозы в положении Asn297. Такие структуры обозначают G0, G1 (1,6 или 1,3), или G2 гликановые остатки в зависимости от количества терминальных остатков Gal. См., например, Raju, T. S., BioProcess Int. 1 : 44-53 (2003). Гликозилирование CHO-типа Fc-области антител описано, например, в Routier, F. FL, Glycoconjugate J. 14: 201-207 (1997).

[0049] Способы измерения фукозилирования включают любые способы, известные в данной области техники. Для целей настоящего описания фукозилирование обнаруживается способом, описанным в Примере 1 WO2015/017600, который полностью включен в настоящий документ посредством ссылки. Вкратце, анализ гликанов выполняется путем высвобождения гликанов из антитела (например, путем

ферментативного высвобождения), мечения гликанов антраниловой кислотой (2-АА) и затем очистки меченых гликанов. Нормально-фазовая ВЭЖХ с флуоресцентным детектированием используется для разделения гликанов и измерения относительного количества каждого гликана в антителе. Гликаны могут быть положительно идентифицированы как не содержащие фукозу или содержащие фукозу с помощью масс-спектрометрии. В некоторых вариантах осуществления, фукоза не обнаруживается в композиции, содержащей множество афукозилированных антител или их антигенсвязывающих фрагментов. В некоторых вариантах осуществления, афукозилированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент обладает повышенной аффинностью к Fc-гамма RIIIА. В некоторых вариантах осуществления, афукозилированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент обладает повышенной аффинностью к Fc-гамма RIIIА (V158). В некоторых вариантах осуществления, афукозилированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент обладает повышенной аффинностью к Fc-гамма RIIIА (F158).

[0050] «Аффинность связывания» обычно относится к силе общей суммы нековалентных взаимодействий между одним сайтом связывания молекулы (*например*, антителом или его антигенсвязывающим фрагментом) и ее партнером по связыванию (*например*, антигеном). Если не указано иное, в контексте настоящего описания «аффинность связывания» относится к действительной аффинности связывания, которая отражает взаимодействие в соотношении 1:1 между членами связывающей пары (*например*, антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, и антигеном). Аффинность молекулы X к ее партнеру Y обычно может быть представлена константой диссоциации (K_D). Аффинность может быть измерена и/или выражена рядом способов, известных в данной области техники, включая, помимо прочего, константу равновесной диссоциации (K_D) и константу равновесной ассоциации (K_A). K_D рассчитывается как соотношение k_{off}/k_{on} , тогда как K_A рассчитывается как соотношение k_{on}/k_{off} . k_{on} относится к константе скорости ассоциации, *например*, антитела или его антигенсвязывающего фрагмента с антигеном, а k_{off} относится к диссоциации, *например*, антитела или его антигенсвязывающего фрагмента от антигена. k_{on} and k_{off} могут быть определены с помощью способов, известных специалисту в данной области техники, такими как BIAcore® или KinExA.

[0051] В контексте данного документа, термин «эпитоп» относится к локализованной области антигена, с которой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент могут специфически связываться. Эпитоп может представлять собой, например, смежные аминокислоты полипептида (линейный или непрерывный эпитоп), или эпитоп может, например, представлять собой объединенные две или более несмежные области

полипептида или полипептидов (конформационный, нелинейный, прерывистый или несмежный эпитоп). В некоторых вариантах осуществления, указанный эпитоп, с которым специфически связывается антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, может быть определен, *например*, с помощью ЯМР-спектроскопии, исследований дифракционной рентгеновской кристаллографии, ИФА, анализов обмена водорода/дейтерия в сочетании с масс-спектрометрией (например, жидкостной хроматографией с масс-спектрометрией с электрораспылением), анализы сканирования массива олигопептидов и/или картирование мутагенеза (*например*, картирование 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 рентгенографических методов и могут быть уточнены с помощью компьютерного программного обеспечения, такого как X-PLOR (Йельский университет, 1992, распространяется Molecular Simulations, Inc.; см., например, *Meth Enzymol* (1985) volumes 114 & 115, eds Wyckoff HW *et al.*; U.S. 2004/0014194) и BUSTER (Bricogne G (1993) *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 49(Pt 1): 37-60; Bricogne G (1997) *Meth Enzymol* 276A: 361-423, ed Carter 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 метода, известного специалистам в данной области техники. 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 методов исследования мутагенеза, включая методы исследования аланин-сканирующим мутагенезом.

[0052] Термины «белок программируемой клеточной гибели 1» и «PD-1» относятся к иммуноингибирующему рецептору, принадлежащему к семейству CD28. PD-1 экспрессируется преимущественно на ранее активированных Т-клетках *in vivo* и связывается с двумя лигандами, PD-L1 и PD-L2. В контексте данного документа термин «PD-1» включает PD-1 человека (hPD-1), встречающиеся в природе варианты и изоформы hPD-1 и видовые гомологи hPD-1.

[0053] Термины «лиганд 1 белка программируемой клеточной гибели 1» и «PD-L1» относятся к одному из двух лигандов гликопротеина клеточной поверхности для PD-1 (другим является PD-L2), которые подавляют активацию Т-клеток и секрецию цитокинов при связывании с PD-1. В контексте данного документа термин «PD-L1» включает PD-L1 человека (hPD-L1), встречающиеся в природе варианты и изоформы hPD-L1 и видовые

гомологи hPD-L1.

[0054] Термин «антагонист PD-1/PD-L1» относится к фрагменту, который нарушает сигнальный путь PD-1/PD-L1. В некоторых вариантах осуществления указанный антагонист ингибирует сигнальный путь PD-1/PD-L1 путем связывания с PD-1 и/или PD-L1. В некоторых вариантах осуществления указанный антагонист PD-1/PD-L1 также связывается с PD-L2. В некоторых вариантах осуществления антагонист PD-1/PD-L1 блокирует связывание PD-1 с PD-L1 и, необязательно, PD-L2. Неограничивающие примеры антагонистов PD-1/PD-L1 включают антагонисты PD-1, такие как антитела, которые связываются с PD-1, например, ниволумаб (OPDIVO) и пембролизумаб (KEYTRUDA); антагонисты PD-L1, такие как антитела, которые связываются с PD-L1 (например, атезолизумаб (TECENTRIQ), дурвалумаб и авелумаб); слитые белки, такие как AMP-224; и пептиды, такие как AUR-012.

[0055] «Пембролизумаб» относится к гуманизированным моноклональным антителам к PD-1, которые являются активным ингредиентом коммерческого лекарственного препарата, называемого KEYTRUDA®, продаваемого Merck & Co.

[0056] Полипептид, антитело, полинуклеотид, вектор, клетка или композиция, которые «выделены», представляют собой полипептид, антитело, полинуклеотид, вектор, клетку или композицию, которые находятся в форме, не встречающейся в природе. Выделенные полипептиды, антитела, полинуклеотиды, векторы, клетка или композиции включают те, которые были очищены до такой степени, что они больше не находятся в той форме, в которой они встречаются в природе. В некоторых вариантах осуществления выделенные антитело, полинуклеотид, вектор, клетка или композиция являются по существу чистой. В данном контексте «по существу чистый» относится к материалу, который имеет чистоту не менее 50% (т.е., не содержит загрязняющих веществ), чистоту не менее 90%, чистоту не менее 95%, чистоту не менее 98% или чистоту не менее 99%.

[0057] Термины «полипептид», «пептид» и «белок» используются в данном документе взаимозаменяемо для обозначения полимеров аминокислот любой длины. Полимер может быть линейным или разветвленным, он может содержать модифицированные аминокислоты и может прерываться не аминокислотами. Указанные термины также охватывают полимер аминокислоты, который был модифицирован естественным путем или искусственно; например, образование дисульфидной связи, гликозилирование, липидирование, ацетилирование, фосфорилирование или любые другие манипуляции или модификации, такие как конъюгация с метящим компонентом. Также термин включает, например, полипептиды, содержащие один или более аналогов аминокислоты (включающие, например, неприродные аминокислоты и т.д.), а также другие модификации

известные в данной области техники. Понятно, что, поскольку полипептиды согласно данному изобретению основаны на антителах, в некоторых вариантах осуществления полипептиды могут встречаться в виде отдельных цепей или связанных цепей.

[0058] Термин «клетка-хозяин», в контексте данного документа, может означать любой тип клетки, *например*, первичную клетку, клетку в культуре или клетку из линии клеток. В конкретных вариантах осуществления термин «клетка-хозяин» относится к клетке, трансфицированной молекулой нуклеиновой кислоты, и потомству или потенциальному потомству такой клетки. Потомство такой клетки может не быть идентичным с родительской клеткой, трансфицированной молекулой нуклеиновой кислоты, *например*, вследствие мутаций или влияния окружения, которые могут возникать в последующих поколениях, или интеграции молекулы нуклеиновой кислоты в геном клетки-хозяина.

[0059] Термин «фармацевтическая композиция» относится к препарату, который находится в такой форме, чтобы обеспечить биологическую активность активного ингредиента, чтобы быть эффективным, и который не содержит каких-либо дополнительных компонентов, которые являются неприемлемо токсичными для субъекта, которому будет вводиться композиция. Композиция может быть стерильной.

[0060] Термины «ввести», «вводить», «введение» и т.п., используемые в данном документе, относятся к способам, которые могут использоваться для обеспечения доставки лекарственного средства, например, антитела к B7-H4 или его антигенсвязывающего фрагмента в желаемый участок биологического действия (например, внутривенное введение). Методы введения, которые можно использовать с описанными в данном документе агентами и способами, можно найти в, *например*, Goodman and Gilman, *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, current edition, Pergamon; and Remington's, *Pharmaceutical Sciences*, current edition, Mack Publishing Co., Easton, Pa.

[0061] В контексте данного документа термины «субъект» и «пациент» употребляются взаимозаменяемо. Субъект может быть животным. В некоторых вариантах осуществления указанный субъект представляет собой млекопитающее, такое как животное, не являющееся человеком (*например*, корова, свинья, лошадь, кошка, собака, крыса, мышь, обезьяна или другой примат и т.д.). В некоторых вариантах осуществления указанным субъектом является яванский макак. В некоторых вариантах осуществления указанным субъектом является человек.

[0062] Термин «терапевтически эффективное количество» относится к количеству лекарственного средства, например, антитела к B7-H4 или его антигенсвязывающего фрагмента, эффективного для лечения заболевания или расстройства у субъекта. В случае онкологического заболевания, указанное терапевтически эффективное количество

лекарственного средства может уменьшить количество раковых клеток; уменьшить размер или нагрузку опухоли; ингибировать до некоторой степени инфильтрацию раковых клеток в периферические органы; ингибировать до некоторой степени метастазирование опухоли; ингибировать до некоторой степени рост опухоли; облегчить в некоторой степени один или более симптомов, связанных с онкологическим заболеванием; и/или привести к положительному ответу, такому как увеличенная выживаемость без прогрессирования (ВБП), безрецидивная выживаемость (БРВ), или общая выживаемость (ОВ), полный ответ (ПО), частичный ответ (ЧО), или, в некоторых случаях, стабильное заболевание (СЗ), уменьшение прогрессирования заболевания (ПЗ), уменьшенное время до прогрессирования (ВДП) 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.

[0063] Такие термины, как «лечение», «лечат», «лечить», «облегчение» и «облегчить» относятся к терапевтическим мерам, которые излечивают, замедляют, уменьшают симптомы и/или останавливают прогрессирование патологического состояния или расстройства. Таким образом, в лечении нуждаются те, у кого уже диагностировано заболевание или есть подозрение на его наличие. В некоторых вариантах осуществления у субъекта успешно «лечат» онкологическое заболевание в соответствии со способами согласно 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 метастазов опухоли; ингибирование или отсутствие роста опухоли; облегчение одного или более симптомов, ассоциированных с конкретным онкологическим заболеванием; снижение заболеваемости и смертности; улучшение качества жизни; уменьшение туморогенности, частоты развития опухолей или туморогенного потенциала опухоли; уменьшение количества или частоты раковых стволовых клеток в опухоли; дифференциацию туморогенных клеток в нетуморогенное состояние; увеличение выживаемости без прогрессирования (ВБП), безрецидивной выживаемости (DFS), общей выживаемости (ОВ), полного ответа (ПО), частичного ответа (ЧО), стабильного заболевания (СЗ), уменьшение прогрессирования заболевания (ПЗ), уменьшенное время до прогрессирования (ВДП) или любую их комбинацию.

[0064] Термины «онкологическое заболевание» и «злокачественный» относятся или описывают физиологическое состояние у млекопитающих, при котором популяция клеток характеризуется нерегулируемым ростом клеток. Примеры онкологического заболевания

включают, но не ограничиваются ими, гинекологические онкологические заболевания (например, рак молочной железы (включая трижды негативный рак молочной железы, рак молочной железы, положительное по рецепторам гормонов (HR), протоковую карциному, рак яичников и рак эндометрия)), немелкоклеточный рак легкого, рак поджелудочной железы, рак щитовидной железы, рак почки (например, почечно-клеточный рак) и рак мочевого пузыря (например, уротелиально-клеточный рак). Онкологическое заболевание может быть «онкологическим заболеванием, при котором экспрессируется B7-H4», или «B7-H4-экспрессирующим онкологическим заболеванием», или «B7-H4-положительным онкологическим заболеванием». Такие термины относятся к онкологическому заболеванию, содержащему клетки, экспрессирующие B7-H4. Онкологическое заболевание может быть солидной опухолью, которая экспрессирует B7-H4. Онкологическое заболевание может быть первичной опухолью, прогрессирующим или метастатическим онкологическим заболеванием.

[0065] «Рефрактерное» онкологическое заболевание представляет собой онкологическое заболевание, которое прогрессирует, даже если пациенту с онкологическим заболеванием проводится противоопухолевое лечение, такое как химиотерапия.

[0066] «Рецидивирующее» онкологическое заболевание представляет собой онкологическое заболевание, которое повторно развивается, или на начальном участке или в отдаленном месте, после ответа на начальную терапию.

[0067] Как показано в данном документе, введение антитела к B7-H4 или его антигенсвязывающего фрагмента, и антитела к PD-1 или его антигенсвязывающего фрагмента может обеспечивать «синергизм» или быть «синергическим», то есть эффект, достигаемый, когда количество активных ингредиентов, используемых вместе, превышает сумму эффектов, возникающих в результате использования активных ингредиентов по отдельности. Синергетический эффект может быть достигнут, когда активные ингредиенты: (1) составлены совместно и вводятся, или доставляются одновременно в комбинированной лекарственной форме с однократной дозировкой; (2) поставляются серийно, поочередно или параллельно в виде отдельных составов; или (3) с помощью каких-либо других схем введения. При введении чередующейся терапии, синергетический эффект может быть достигнут, когда соединения вводятся или доставляются последовательно, например, посредством различных инъекций в отдельных шприцах.

[0068] Как используется в настоящем раскрытии и формуле изобретения, формы единственного числа включают формы множественного числа, если из контекста явно не следует иное.

[0069] Следует понимать, что в тех случаях, когда варианты осуществления описаны в данном документе с формулировкой «содержащий», также предусмотрены аналогичные варианты осуществления, описанные в терминах «состоящий из» и/или «состоящий по существу из». В этом описании термины «содержит», «содержащий», «закрывающий» и «имеющий» и тому подобное могут иметь значение, приписываемое в патентном законодательстве США, и могут означать «включает», «включающий» и тому подобное; выражения «по существу состоящий из» или «состоит по существу» аналогичным образом имеют значение, указанные в патентном законодательстве США, и термин является неограниченным, что допускает присутствие более того, что указано, если основные или новые характеристики того, о чем говорится, не по существу меняются при наличии более того, что указано, но исключают варианты осуществления по предшествующему уровню техники.

[0070] Если специально не указано или не очевидно из контекста, то как используется в настоящем документе, термин «или» понимается как включающий. Термин «и/или», используемый в данном документе во фразе, такой как «А и/или В», предназначен для включения как «А и В», так и «А или В», «А» и «В». Аналогичным образом, термин «и/или», используемый во фразе, такой как «А, В и/или В», предназначен для охвата каждого из следующих вариантов осуществления: А, В и В; А, В или В; А или В; А или В; В или В; А и В; А и В; В и В; А (отдельно); В (отдельно); и В (отдельно).

[0071] Используемые в настоящем документе термины «около» и «приблизительно» при использовании для изменения числового значения или числового диапазона указывают, что отклонения от 5% до 10% больше и от 5% до 10% меньше значения или диапазона остаются в предполагаемых пределах приведенного значения или диапазона.

[0072] Любые композиции или способы, представленные в настоящем документе, могут быть объединены с одной или более из любых других композиций и способов, представленных в настоящем документе.

4.2 Способы лечения онкологического заболевания

[0073] В одном аспекте в настоящем документе представлены способы лечения онкологического заболевания у субъекта-человека, включающие введение субъекту, нуждающемуся в этом, (i) антитела к В7-Н4 или его антигенсвязывающего фрагмента, описанного в данном документе, или его фармацевтической композиции, как описано в данном документе, в комбинации с (ii) ингибитором PD-1/PD-L1, описанным в данном документе, или его фармацевтической композицией, как описано в данном документе, и

причем (i) и (ii) вводятся одновременно или последовательно. Для введения «одновременно» в некоторых вариантах осуществления агенты, указанные в (i) и (ii), вводят в виде отдельных составов в один и тот же день, причем один вводят за другим; или в других вариантах осуществления агенты, указанные в (i) и (ii), смешивают вместе перед введением и, таким образом, вводят в виде смеси. Например, в некоторых вариантах осуществления агенты, как в (i) и (ii), могут быть упакованы и храниться в одном и том же флаконе (т.е. препарат с фиксированной комбинацией доз), или, альтернативно, флаконы, содержащие каждый отдельный агент, могут быть смешаны вместе непосредственно перед введением. Для «последовательного» введения агенты, как в (i) и (ii), вводят в виде отдельных составов в разные дни. В различных вариантах осуществления указанные агенты могут быть введены *in vivo* различными путями, включая, но не ограничиваясь этим, внутривенный.

[0074] Комбинация антитела к B7-H4 или его антигенсвязывающего фрагмента и ингибитора PD-1/PD-L1 может быть синергической.

[0075] В одном аспекте ингибитор PD-1 представляет собой пембролизумаб. Последовательности тяжелой и легкой цепей пембролизумаба перечислены в следующей таблице. В контексте последовательностей тяжелой и легкой цепей последовательности CDR показаны жирным шрифтом, а последовательности вариабельной области подчеркнуты.

Последовательности пембролизумаба

Домен	Аминокислотная последовательность (SEQ ID NO)
Тяжелая цепь	<u>QVQLVQSGVEVKKPGASVKV</u> <u>SCKASGYTFTNYYMYWVRQAPGQGL</u> <u>EWMGGINPSNGGTNFNEKFKNRVTLTTDSSTTTAYMELKSLQFDDT</u> <u>AVYYCARRDYRFDMGFDYW</u> <u>GQGTTVTVSS</u> ASTKGPSVFPLAPCSRS TSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS LSSVVTVPSSSLGKTYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAP EFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS NKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSRLTVDKSRWQE GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLK (SEQ ID NO:30)
Легкая цепь	<u>EIVLTQSPATLSLSPGERATL</u> <u>SCRASKGVSTSGYSYLHWYQQKPGQA</u> <u>PRLIYLA</u> <u>SYLESGV</u> <u>PARFSGSGSGTDFTLT</u> <u>ISSLEPEDFAVYYCQHSR</u> <u>DLPLTFGGGTKVEIK</u> RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFY PREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYSTLSSTLTLSKADYE KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:31)

VH	QVQLVQSGVEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYYMYWVRQAPGQGL EWMGGINPSNGGTNFNEK KFK NRVTLTTDSSTTTAYMELKSLQFDDT AVYYCARRDY RFD MGFDYWGGQTTVTVSS (SEQ ID NO:32)
VL	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASKGVSTSGYSYLHWYQQKPGQA PRLLIY LAS YLESGVPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYC QHSR DLPL TFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:33)
VH-CDR1	NYYMY (SEQ ID NO:34)
VH-CDR2	GINPSNGGTNFNEK KFK N (SEQ ID NO:35)
VH-CDR3	RDY RFD MGFDY (SEQ ID NO:36)
VL-CDR1	RASKGVSTSGYSYLH (SEQ ID NO:37)
VL-CDR2	L AS YLES (SEQ ID NO:38)
VL-CDR3	QHSRDLPL T (SEQ ID NO:39)

[0076] В одном аспекте указанный ингибитор PD-1 представляет собой антитело или антигенсвязывающий фрагмент, содержащий CDR варибельной области тяжелой и легкой цепей пембролизумаба; или антитело или антигенсвязывающий фрагмент, содержащий варибельные области тяжелой и легкой цепей пембролизумаба.

[0077] В одном аспекте способ лечения онкологического заболевания у человека включает введение субъекту, нуждающемуся в этом, (i) антитела к B7-H4 или его антигенсвязывающего фрагмента, описанного в данном документе, или его фармацевтической композиции, как описано в данном документе, причем вводят от около 0,005 до около 20 мг/кг антитела к B7-H4 или антигенсвязывающего фрагмента, и (ii) пембролизумаба или его фармацевтическую композицию, как описано в данном документе, причем вводят около 200 мг пембролизумаба, и при этом (i) и (ii) вводят одновременно или последовательно с частотой, например, приблизительно один раз в три недели.

[0078] В одном аспекте способ лечения онкологического заболевания у человека включает введение субъекту, нуждающемуся в этом, (i) антитела к B7-H4 или его антигенсвязывающего фрагмента, описанного в данном документе, или его фармацевтической композиции, как описано в данном документе, причем вводят около 0,1 мг/кг антитела к B7-H4 или его антигенсвязывающего фрагмента, и (ii) пембролизумаба или его фармацевтической композиции, как описано в данном документе, причем вводят около 200 мг пембролизумаба, и при этом (i) и (ii) вводят одновременно или последовательно с частотой, например, приблизительно один раз в три недели. В одном аспекте способ лечения онкологического заболевания у человека включает введение субъекту, нуждающемуся в этом, (i) антитела к B7-H4 или его антигенсвязывающего фрагмента,

описанного в данном документе, или его фармацевтической композиции, как описано в данном документе, причем вводят около 0,3 мг/кг антитела к В7-Н4 или его антигенсвязывающего фрагмента, и (ii) пембролизумаба или его фармацевтической композиции, как описано в данном документе, причем вводят около 200 мг пембролизумаба, и при этом (i) и (ii) вводят одновременно или последовательно с частотой, например, приблизительно один раз в три недели. В одном аспекте способ лечения онкологического заболевания у человека включает введение субъекту, нуждающемуся в этом, (i) антитела к В7-Н4 или его антигенсвязывающего фрагмента, описанного в данном документе, или его фармацевтической композиции, как описано в данном документе, причем вводят около 1 мг/кг антитела к В7-Н4 или его антигенсвязывающего фрагмента, и (ii) пембролизумаба или его фармацевтической композиции, как описано в данном документе, причем вводят около 200 мг пембролизумаба, и при этом (i) и (ii) вводят одновременно или последовательно с частотой, например, приблизительно один раз в три недели. В одном аспекте способ лечения онкологического заболевания у человека включает введение субъекту, нуждающемуся в этом, (i) антитела к В7-Н4 или его антигенсвязывающего фрагмента, описанного в данном документе, или его фармацевтической композиции, как описано в данном документе, причем вводят около 3 мг/кг антитела к В7-Н4 или его антигенсвязывающего фрагмента, и (ii) пембролизумаба или его фармацевтической композиции, как описано в данном документе, причем вводят около 200 мг пембролизумаба, и при этом (i) и (ii) вводят одновременно или последовательно с частотой, например, приблизительно один раз в три недели. В одном аспекте способ лечения онкологического заболевания у человека включает введение субъекту, нуждающемуся в этом, (i) антитела к В7-Н4 или его антигенсвязывающего фрагмента, описанного в данном документе, или его фармацевтической композиции, как описано в данном документе, причем вводят около 10 мг/кг антитела к В7-Н4 или его антигенсвязывающего фрагмента, и (ii) пембролизумаба или его фармацевтической композиции, как описано в данном документе, причем вводят около 200 мг пембролизумаба, и при этом (i) и (ii) вводят одновременно или последовательно с частотой, например, приблизительно один раз в три недели. В одном аспекте способ лечения онкологического заболевания у человека включает введение субъекту, нуждающемуся в этом, (i) антитела к В7-Н4 или его антигенсвязывающего фрагмента, описанного в данном документе, или его фармацевтической композиции, как описано в данном документе, причем вводят около 20 мг/кг антитела к В7-Н4 или его антигенсвязывающего фрагмента, и (ii) пембролизумаба или его фармацевтической композиции, как описано в данном документе, причем вводят около 200 мг пембролизумаба, и при этом (i) и (ii) вводят одновременно или последовательно с частотой, например,

приблизительно один раз в три недели.

[0079] В одном аспекте способ лечения онкологического заболевания у человека включает введение субъекту, нуждающемуся в этом, (i) антитела к B7-H4 или его антигенсвязывающего фрагмента, описанного в данном документе, или его фармацевтической композиции, как описано в данном документе, причем вводят 0,1 мг/кг антитела к B7-H4 или его антигенсвязывающего фрагмента, и (ii) пембролизумаба или его фармацевтической композиции, как описано в данном документе, причем вводят около 200 мг пембролизумаба, и при этом (i) и (ii) вводят одновременно или последовательно с частотой один раз каждые три недели. В одном аспекте способ лечения онкологического заболевания у человека включает введение субъекту, нуждающемуся в этом, (i) антитела к B7-H4 или его антигенсвязывающего фрагмента, описанного в данном документе, или его фармацевтической композиции, как описано в данном документе, причем вводят 0,3 мг/кг антитела к B7-H4 или его антигенсвязывающего фрагмента, и (ii) пембролизумаба или его фармацевтической композиции, как описано в данном документе, причем вводят около 200 мг пембролизумаба, и при этом (i) и (ii) вводят одновременно или последовательно с частотой один раз каждые три недели. В одном аспекте способ лечения онкологического заболевания у человека включает введение субъекту, нуждающемуся в этом, (i) антитела к B7-H4 или его антигенсвязывающего фрагмента, описанного в данном документе, или его фармацевтической композиции, как описано в данном документе, причем вводят 1 мг/кг антитела к B7-H4 или его антигенсвязывающего фрагмента, и (ii) пембролизумаба или его фармацевтической композиции, как описано в данном документе, причем вводят около 200 мг пембролизумаба, и при этом (i) и (ii) вводят одновременно или последовательно с частотой один раз каждые три недели. В одном аспекте способ лечения онкологического заболевания у человека включает введение субъекту, нуждающемуся в этом, (i) антитела к B7-H4 или его антигенсвязывающего фрагмента, описанного в данном документе, или его фармацевтической композиции, как описано в данном документе, причем вводят 3 мг/кг антитела к B7-H4 или его антигенсвязывающего фрагмента, и (ii) пембролизумаба или его фармацевтической композиции, как описано в данном документе, причем вводят около 200 мг пембролизумаба, и при этом (i) и (ii) вводят одновременно или последовательно с частотой один раз каждые три недели. В одном аспекте способ лечения онкологического заболевания у человека включает введение субъекту, нуждающемуся в этом, (i) антитела к B7-H4 или его антигенсвязывающего фрагмента, описанного в данном документе, или его фармацевтической композиции, как описано в данном документе, причем вводят 10 мг/кг антитела к B7-H4 или его антигенсвязывающего фрагмента, и (ii) пембролизумаба или его фармацевтической композиции, как описано в данном документе, причем вводят около 200

мг пембролизумаба, и при этом (i) и (ii) вводят одновременно или последовательно с частотой один раз каждые три недели. В одном аспекте способ лечения онкологического заболевания у человека включает введение субъекту, нуждающемуся в этом, (i) антитела к B7-H4 или его антигенсвязывающего фрагмента, описанного в данном документе, или его фармацевтической композиции, как описано в данном документе, причем вводят 20 мг/кг антитела к B7-H4 или его антигенсвязывающего фрагмента, и (ii) пембролизумаба или его фармацевтической композиции, как описано в данном документе, причем вводят около 200 мг пембролизумаба, и при этом (i) и (ii) вводят одновременно или последовательно с частотой один раз каждые три недели.

[0080] В некоторых вариантах осуществления способов, представленных в настоящем документе, антитело к B7-H4 или его антигенсвязывающий фрагмент или фармацевтическая композиция, содержащая антитела к B7-H4 или их антигенсвязывающие фрагменты, вводят внутривенно. В некоторых вариантах осуществления способов, представленных в настоящем документе, пембролизумаб или его фармацевтическая композиция вводится внутривенно.

[0081] В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе представлены способы лечения онкологического заболевания, выбранного из группы, состоящей из: рака молочной железы (например, прогрессирующего рака молочной железы, трижды негативного рака молочной железы, рак молочной железы, положительное по рецепторам гормонов (HR) или протоковой карциномы), карциномы эндометрия, рака яичников, уротелиального рака, немелкоклеточного рака легкого (например, плоскоклеточного рака), плоскоклеточного рака головы и шеи (HNSCC), лимфомы Ходжкина (например, классическая лимфома Ходжкина), меланомы, рака поджелудочной железы, рака щитовидной железы, рака почки (например, почечно-клеточная карцинома), рака мочевого пузыря (например, уротелиальная карцинома), рака желудка, рака шейки матки и рака с высокой микросателлитной нестабильностью. В определенном варианте осуществления в настоящем документе представлены способы лечения распространенного рака молочной железы (включая трижды негативный рак молочной железы, рак молочной железы, положительное по рецепторам гормонов (HR)), рак яичников, рак эндометрия или уротелиальный рак. В определенном варианте осуществления в настоящем документе представлены способы лечения рака молочной железы. В определенном варианте осуществления рака молочной железы представляет собой трижды негативный рак молочной железы. В определенном варианте осуществления в настоящем документе представлены способы лечения рака молочной железы, положительного по рецепторам гормонов (HR). В определенном варианте осуществления в настоящем документе

представлены способы лечения рака яичников. В определенном варианте осуществления в настоящем документе представлены способы лечения рака эндометрия. В определенном варианте осуществления в настоящем документе представлены способы лечения уротелиального рака. В определенном варианте осуществления в настоящем документе представлены способы лечения рака желудочно-кишечного тракта. В определенном варианте осуществления в настоящем документе представлены способы лечения гинекологического онкологического заболевания. В определенном варианте осуществления в настоящем документе представлены способы лечения рака головы и шеи. В определенном варианте осуществления в настоящем документе представлены способы лечения рака мочеполовой системы. В определенном варианте осуществления, представленном в настоящем документе, субъект ранее не получал терапию антагонистом PD-1/PD-L1. В некоторых вариантах осуществления такие способы включают введение антитела к B7-H4 или его антигенсвязывающего фрагмента, представленного в настоящем документе, или фармацевтической композиции, содержащей антитела к B7-H4 или их антигенсвязывающие фрагменты, представленные в настоящем документе, в комбинации с ингибитором PD-1/PD-L1 или его фармацевтической композиции, представленной в настоящем документе, пациенту (например, пациенту-человеку), нуждающемуся в этом.

[0082] В некоторых вариантах осуществления указанный рак представляет собой онкологическое заболевание, экспрессирующее B7-H4. В некоторых вариантах осуществления указанный рак представляет собой солидную опухоль, которая экспрессирует B7-H4. В некоторых вариантах осуществления B7-H4 был обнаружен (например, с помощью иммуногистохимии (ИГХ)) в биологическом образце, полученном от субъекта.

[0083] Биологический образец может быть любым биологическим образцом, полученным от субъекта, линии клеток, ткани или другого источника клеток, потенциально экспрессирующих B7-H4. Способы получения биопсий тканей и биологических жидкостей человека хорошо известны в данной области техники. Биологические образцы включают периферические мононуклеарные клетки крови. Биологический образец также может быть образцом крови, в котором циркулирующие опухолевые клетки (или «СТС») могут экспрессировать B7-H4 и обнаруживаться.

[0084] Анализ уровня экспрессии белка B7-H4 предназначен для включения качественного или количественного измерения или оценки уровня белка B7-H4 в первом биологическом образце либо напрямую (*например*, путем определения или оценки абсолютного уровня белка), либо относительно (*например*, сравнивая с уровнем белка во втором биологическом образце). Уровень экспрессии полипептида B7-H4 в первом

биологическом образце можно измерить или оценить, и сравнить со стандартным уровнем белка В7-Н4, при этом стандартный уровень определяется из второго биологического образца, который не поврежден, или определяется путем усреднения уровней из популяции образцы, которой не повреждены. Как будет понятно в данной области техники, как только «стандартный» уровень полипептида В7-Н4 известен, его можно повторно использовать в качестве стандарта для сравнения.

[0085] В другом варианте осуществления антитело к В7-Н4 или его антигенсвязывающий фрагмент, или фармацевтическую композицию, как описано в данном документе, вводят пациенту (например, пациенту-человеку) с диагнозом онкологическое заболевание для увеличения пролиферации Т-клеток, $CD4^+$ Т-клеток или $CD8^+$ Т-клеток у пациента. В таком варианте осуществления пациенту также вводят антагонист PD-1/PD-L1, например пембролизумаб, для блокирования связывания PD-1 с PD-L1 и PD-L2 и активации Т-клеток. В другом варианте осуществления антитело к В7-Н4 или его антигенсвязывающий фрагмент, или фармацевтическую композицию вводят пациенту (например, пациенту-человеку) с диагнозом онкологическое заболевание для увеличения продукции интерферона-гамма ($IFN\gamma$) у пациента. В таком варианте осуществления пациенту также вводят антагонист PD-1/PD-L1, например, пембролизумаб, для блокирования связывания PD-1 с PD-L1 и PD-L2, и активации Т-клеток. В другом варианте осуществления антитело к В7-Н4 или его антигенсвязывающий фрагмент, или фармацевтическую композицию вводят пациенту (например, пациенту-человеку) с диагнозом онкологическое заболевание для блокирования ингибирующей активности В7-Н4 против Т-клеток у пациента. В таком варианте осуществления пациенту также вводят антагонист PD-1/PD-L1, например, пембролизумаб, для блокирования связывания PD-1 с PD-L1 и PD-L2, и активации Т-клеток. В другом варианте осуществления антитело к В7-Н4 или его антигенсвязывающий фрагмент, или фармацевтическую композицию вводят пациенту (например, пациенту-человеку) с диагнозом онкологическое заболевание для истощения у пациента раковых клеток, экспрессирующих В7-Н4. В таком варианте осуществления пациенту также вводят антагонист PD-1/PD-L1, например, пембролизумаб, для блокирования связывания PD-1 с PD-L1 и PD-L2, и активации Т-клеток.

[0086] В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к антителу к В7-Н4 или его антигенсвязывающему фрагменту, или к фармацевтической композиции, представленной в настоящем документе, для использования в комбинации с антагонистом PD-1/PD-L1, таким как пембролизумаб или его фармацевтической композиции, в качестве лекарственного средства, причем лекарственное средство предназначено для введения в количестве от около 0,1 мг/кг до около 20 мг/кг (например,

около 0,1 мг/кг, около 0,3 мг/кг, около 1 мг/кг, около 3 мг/кг, около 10 мг/кг или около 20 мг/кг) антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, и около 200 мг пембролизумаба. В таких вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, и пембролизумаб могут быть составлены совместно или по отдельности для введения одновременно или последовательно. В некоторых аспектах настоящее изобретение относится к антителу к В7-Н4 или его антигенсвязывающему фрагменту, или к фармацевтической композиции, представленной в настоящем документе, для использования в комбинации с антагонистом PD-1/PD-L1, таким как пембролизумаб или его фармацевтической композиции в способе лечения рака, причем вводят от около 0,1 мг/кг до около 20 мг/кг (например, около 0,1 мг/кг, около 0,3 мг/кг, около 1 мг/кг, около 3 мг/кг, около 10 мг/кг или около 20 мг/кг) антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, и вводят около 200 мг пембролизумаба, и причем введения осуществляют последовательно или одновременно. В некоторых аспектах настоящее изобретение относится к антителу к В7-Н4 или его антигенсвязывающему фрагменту, или к фармацевтической композиции, представленной в настоящем документе, для использования в комбинации с антагонистом PD-1/PD-L1, таким как пембролизумаб, в способе для лечения рака у субъекта, включающий введение субъекту от около 0,1 мг/кг до около 20 мг/кг (например, около 0,1 мг/кг, около 0,3 мг/кг, около 1 мг/кг, около 3 мг/кг, около 10 мг/кг или около 20 мг/кг) антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, или фармацевтической композиции, представленной в настоящем документе, и введение около 200 мг пембролизумаба или фармацевтической композиции, представленной в настоящем документе, причем введения осуществляют последовательно или одновременно.

[0087] В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к антителу к В7-Н4 или его антигенсвязывающему фрагменту, или к фармацевтической композиции, представленной в настоящем документе, для использования в комбинации с антагонистом PD-1/PD-L1, таким как пембролизумаб или его фармацевтической композиции, в качестве лекарственного средства, причем лекарственное средство предназначено для введения в дозах от 0,1 мг/кг до 20 мг/кг (например, 0,1 мг/кг, 0,3 мг/кг, 1 мг/кг, 3 мг/кг, 10 мг/кг или 20 мг/кг) антитела или его антигенсвязывающего фрагмента и 200 мг пембролизумаба. В таких вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, и пембролизумаб могут быть составлены совместно или по отдельности для введения одновременно или последовательно. В некоторых аспектах настоящее изобретение относится к антителу к В7-Н4 или его антигенсвязывающему фрагменту, или к фармацевтической композиции, представленной в настоящем документе, для использования в комбинации с антагонистом PD-1/PD-L1, таким как пембролизумаб

или его фармацевтической композиции в способе лечения рака, при котором от 0,1 мг/кг до 20 мг/кг (например, 0,1 мг/кг, 0,3 мг/кг, 1 мг/кг, 3 мг/кг, 10 мг/кг или 20 мг/кг) антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, и вводят 200 мг пембролизумаба, причем введения осуществляют последовательно или одновременно. В некоторых аспектах настоящее изобретение относится к антителу к B7-H4 или его антигенсвязывающему фрагменту, или к фармацевтической композиции, представленной в настоящем документе, для использования в комбинации с антагонистом PD-1/PD-L1, таким как пембролизумаб, в способе для лечения рака у субъекта, включающий введение субъекту от 0,1 мг/кг до 20 мг/кг (например, 0,1 мг/кг, 0,3 мг/кг, 1 мг/кг, 3 мг/кг, 10 мг/кг или 20 мг/кг) антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, или фармацевтической композиции, представленной в настоящем документе, и введение 200 мг пембролизумаба или фармацевтической композиции, представленной в настоящем документе, причем введения осуществляют последовательно или одновременно.

[0088] В определенных аспектах аминокислотная последовательность PD-1 человека представляет собой:

MQIPQAPWPVWVAVLQLGWRPGWFLDSPDRPWNPPTFSPALLVVTEGDNATFT
CSFSNTSESVLNWYRMSPSNQTDKLAAPEDRSQPGQDCRFRVTQLPNGRDFHMSVV
RARRNDSGTYLCGAISLAPKAQIKESLRAELRVTERRAEVPTAHPSPSPRPAGQFQTLVV
GVVGGLLGSLVLLVWVLAVICSRAARGTIGARRTGQPLKEDPSAVPVFSVDYGELDFQ
WREKTPEPPVPCVPEQTEYATIVFPSGMGTSSPARRGSADGPRSAQPLRPEDGHCSWPL
(SEQ ID NO:40).

[0089] В определенных аспектах аминокислотная последовательность PD-L1 человека представляет собой:

MRIFAVFIFMTYWHLLNAFTVTVPKDLYVVEYGSNMETIECKFPVEKQLDLAALIVYWE
MEDKNIIQFVHGEEDLKVQHSSYRQRARLLKDQLSLGNAALQITDVKLQDAGVYRCMI
SYGGADYKRITVKVNAPYNKINQRILVVDPTSEHELTCQAEGYPKAEVIWTSSDHQVL
SGKTTTTNSKREEKLFNVTSTLRINTTTNEIFYCTFRRLDPEENHTAELVIPPLAHPPNE
RTHLVILGAILLCLGVALTFIFRLRKGRMMDVKKCGIQDTNSKKQSDTHLEET (SEQ ID
NO:41).

4.3 Антитела к B7-H4 и их антигенсвязывающие фрагменты

[0090] В данном документе представлены способы лечения рака у человека, включающие введение субъекту антител (*например*, моноклональных антител, таких как химерные, гуманизированные антитела или антитела человека) и их антигенсвязывающих

фрагментов, которые специфически связываются с B7-H4 (*например*, B7-H4 человека) в сочетании с антагонистом PD-1/PD-L1, таким как пембролизумаб. Типовые антитела B7-H4 и их антигенсвязывающие фрагменты, которые можно использовать в способах, представленных в настоящем документе, известны в данной области техники. Аминокислотные последовательности B7-H4 человека, яванского макака, мыши и крысы известны в данной области техники и также представлены в настоящем документе, как представлено SEQ ID NO: 1-4 соответственно.

B7-H4 человека:

MASLGQILFWSIISIILAGAIALIIGFGISGRHSITVTTVASAGNIGEDGILSCTFEPDIKLS
 IVIQWLKEGVLGLVHEFKEGKDELSEQDEMFRGRTAVFADQVIVGNASRLKKNVQLTD
 AGTYKCYIITSKGKGKGNANLEYKTGAFSMPEVNVDYNASSETLRCEAPRWFPQPTVVWA
 SQVDQGANFSEVSNTSFELNSENVTMKVVSVLNVNTINNTYSCMIENDIAKATGDIKVT
 ESEIKRRSHLQLLNSKASLCVSSFFAISWALLPLSPYLMLK (SEQ ID NO:1)

B7-H4 яванского макака:

MASLGQILFWSIISIIFILAGAIALIIGFGISGRHSITVTTVASAGNIGEDGILSCTFEPDIKLS
 DIVIQWLKEGVIGLVHEFKEGKDELSEQDEMFRGRTAVFADQVIVGNASRLKKNVQLTD
 AGTYKCYIITSKGKGKGNANLEYKTGAFSMPEVNVDYNASSETLRCEAPRWFPQPTVVWA
 SQVDQGANFSEVSNTSFELNSENVTMKVVSVLNVNTINNTYSCMIENDIAKATGDIKVT
 ESEIKRRSHLQLLNSKASLCVSSFLAISWALLPLAPYLMLK (SEQ ID NO:2)

B7-H4 мыши

MASLGQIIFWSIINIILAGAIALIIGFGISGKHFITVTTFTSAGNIGEDGTLSCFEPDIKLNG
 IVIQWLKEGIKGLVHEFKEGKDDLSSQHEMFRGRTAVFADQVVVGNASRLKKNVQLTD
 AGTYTCYIRTSKGKGKGNANLEYKTGAFSMPEINVDYNASSESLRCEAPRWFPQPTVAWAS
 QVDQGANFSEVSNTSFELNSENVTMKVVSVLNVNTINNTYSCMIENDIAKATGDIKVT
 SEVKRRSQLQLLNSGSPCVFSSAFVAGWALLSLSCCLMLR (SEQ ID NO:3)

B7-H4 крысы

MASLGQIIFWSIINVIIILAGAIIVLIIGFGISGKHFITVTTFTSAGNIGEDGTLSCFEPDIKLN
 GIVIQWLKEGIKGLVHEFKEGKDDLSSQHEMFRGRTAVFADQVVVGNASRLKKNVQLT
 DAGTYTCYIHTSKGKGKGNANLEYKTGAFSMPEINVDYNASSESLRCEAPRWFPQPTVAW
 ASQVDQGANFSEVSNTSFELNSENVTMKVVSVLNVNTINNTYSCMIENDIAKATGDIKV
 TDSEVKRRSQLELLNSGSPCVSSVSAAGWALLSLSCCLMLR (SEQ ID NO:4)

[0091] В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент для использования в способах, описанных в настоящем документе, специфически связывается с B7-H4 человека. В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент для использования в способах, описанных в настоящем

документе, специфически связывается с В7-Н4 человека и яванского макака. В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент для использования в способах, описанных в настоящем документе, специфически связывается с В7-Н4 человека, мыши и крысы. В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент для использования в способах, описанных в настоящем документе, специфически связывается с В7-Н4 человека, яванского макака, мыши и крысы.

[0092] В7-Н4 содержит эктодомен IgC (аминокислоты 153-241 из SEQ ID NO: 1) и эктодомен IgV (аминокислоты 35-146 из SEQ ID NO: 1). В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент для использования в способах, описанных в настоящем документе, специфически связывается с доменом IgV В7-Н4 человека. Соответственно, в настоящем документе представлены способы введения антител и их антигенсвязывающих фрагментов, которые специфически связываются с полипептидом, состоящим из аминокислот 35-146 SEQ ID NO: 1.

[0093] В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент для использования в способах, описанных в настоящем документе, специфически связывается с В7-Н4 человека и содержит шесть CDR антитела 20502, перечисленных в Таблицах 1 и 2. «20502» относится у антителу 20502, описанному в данном документе.

Таблица 1. Аминокислотные последовательности VH CDR ¹

Антитело	VH CDR1 (SEQ ID NO:)	VH CDR2 (SEQ ID NO:)	VH CDR3 (SEQ ID NO:)
20502	GSIKSGSYWYG (SEQ ID NO:5)	NIYYSGSTYYNPSLRS (SEQ ID NO:6)	AREGSYPNQFDP (SEQ ID NO:7)

¹ VH CDR в Таблице 1 определены согласно Кабат.

Таблица 2. Аминокислотные последовательности VL CDR ²

Антитело	VL CDR1 (SEQ ID NO:)	VL CDR2 (SEQ ID NO:)	VL CDR3 (SEQ ID NO:)
20502	RASQSVSSNLA (SEQ ID NO:8)	GASTRAT (SEQ ID NO:9)	QQYHSFPFT (SEQ ID NO:10)

² VL CDR в Таблице 2 определены согласно Кабат.

[0094] В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент для использования в способах, описанных в настоящем документе, специфически связывается с В7-Н4 человека и содержит VH антитела 20502, указанного в Таблице 3.

Таблица 3: Аминокислотные последовательности варибельной тяжелой цепи (VH)

Антитело	Аминокислотная последовательность VH (SEQ ID NO)
20502	QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSIKSGSYWGWIRQPPGK GLEWIGNIYYSGSTYYNPSLRSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAAD TAVYYCAREGSYPNQFDPWGQGTLLTVSS (SEQ ID NO:11)

[0095] В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент для использования в способах, описанных в настоящем документе, специфически связывается с B7-H4 человека и содержит VL антитела 20502, указанного в Таблице 4.

Таблица 4: Аминокислотные последовательности вариабельной легкой цепи (VL)

Антитело	Аминокислотная последовательность VL (SEQ ID NO)
20502	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSNLAWYQQKPGQAPR LLIYGASTRATGIPARFSGSGSGTEFTLTISLQSEDFAVYYCQQY HSFPFTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:12)

[0096] В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент для использования в способах, описанных в настоящем документе, специфически связывается с B7-H4 человека и содержит VH и VL антитела 20502, перечисленных в Таблицах 3 и 4.

[0097] В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент для использования в способах, описанных в настоящем документе, специфически связывается с B7-H4 человека и содержит каркасные области VH антитела 20502, перечисленные в Таблице 5.

Таблица 5. Аминокислотные последовательности VH FR ³

Анти тело	VH FR1 (SEQ ID NO:)	VH FR2 (SEQ ID NO:)	VH FR3 (SEQ ID NO:)	VH FR4 (SEQ ID NO:)
20502	QLQLQESGPGLVK PSETLSLTCTVSG (SEQ ID NO:13)	WIRQPPGKGLE WIG (SEQ ID NO:14)	RVTISVDTSKNQFSL KLSSVTAADTAVYY C (SEQ ID NO:15)	WGQGTLLV TVSS (SEQ ID NO:16)

³Каркасные области VH, описанные в Таблице 5, определены на основе границ системы нумерации по Кабат для CDR. Соответственно, CDR VH определяются по Кабат, а каркасные области представляют собой аминокислотные остатки, окружающие CDR в вариабельной области в формате FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 и FR4.

[0098] В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент для использования в способах, описанных в настоящем документе, специфически связывается с B7-H4 человека и содержит каркасные области VL антитела 20502, перечисленные в Таблице 6.

Таблица 6. Аминокислотные последовательности VL FR ⁴

Антите ло	VL FR1 (SEQ ID NO:)	VL FR2 (SEQ ID NO:)	VL FR3 (SEQ ID NO:)	VL FR4 (SEQ ID NO:)
20502	EIVMTQSPATLSVS PGERATLSC (SEQ ID NO:17)	WYQQKPGQAP RLLIY (SEQ ID NO:18)	GIPARFSGSGSGT EFTLTISLQSEDF AVYYC (SEQ ID	FGGGTKV EIK (SEQ ID NO:20)

⁴Каркасные области VL, описанные в Таблице 6, определены на основе границ системы нумерации по Кабат для CDR. Соответственно, CDR VL определяются по Кабат, а каркасные области представляют собой аминокислотные остатки, окружающие CDR в варибельной области в формате FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 и FR4.

[0099] В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент для использования в способах, описанных в настоящем документе, специфически связывается с B7-H4 человека и содержит четыре каркасных области VH и четыре каркасных области VL антитела 20502, перечисленных в Таблицах 5 и 6.

[0100] В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент для использования в способах, описанных в настоящем документе, специфически связывается с B7-H4 человека и содержит последовательность тяжелой цепи антитела 20502, перечисленную в Таблице 7.

Таблица 7: Аминокислотные последовательности полноразмерной тяжелой цепи

Антитело	Аминокислотная последовательность полноразмерной тяжелой цепи (SEQ ID NO)
20502	QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSIKSGSYWGWIRQPPG KGLEWIGNIYYSGSTYYNPSLRSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVT AADTAVYYCAREGSYPNQFDPWGQGTLLTVSSASTKGPSVFP LAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKK VEPKSCDKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQP REPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ

	PENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:21)
--	--

[0101] В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент для использования в способах, описанных в настоящем документе, специфически связывается с В7-Н4 человека и содержит последовательность легкой цепи антитела 20502, перечисленную в Таблице 8.

Таблица 8: Аминокислотные последовательности полноразмерной легкой цепи

Антитело	Аминокислотная последовательность полноразмерной легкой цепи (SEQ ID NO)
20502	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSNLAWYQQKPGQA PRLLIYGASTRATGIPARFSGSGSGTEFTLTISSLQSEDFAVYYC QQYHSFPFTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV VCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDESTYS LSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:22)

[0102] В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент для использования в способах, описанных в настоящем документе, специфически связывается с В7-Н4 человека и содержит последовательность тяжелой цепи и последовательность легкой цепи антитела 20502, перечисленных в Таблицах 7 и 8.

[0103] В некоторых аспектах антитело или его антигенсвязывающий фрагмент для использования в способах, описанных в настоящем документе, описывается одним его доменом VL, или одним его доменом VH, или одной его CDR 3 VL, или одной его CDR 3 VH. См., например, публикацию Rader C *et al.*, (1998) PNAS 95: 8910-8915, которая полностью включена в настоящий документ посредством ссылки, описывающий гуманизацию мышинового антитела к $\alpha\beta 3$ путем идентификации комплементарной легкой цепи или тяжелой цепи, соответственно, из библиотеки легкой цепи или тяжелой цепи человека, что приводит к вариантам гуманизированного антитела, имеющие сродство выше или еще выше, чем сродство исходного антитела. См. также Clackson T *et al.*, (1991) Nature 352: 624-628, которая полностью включена в настоящий документ посредством ссылки и описывает способы получения антител, которые специфически связываются с конкретным антигеном, с использованием определенного домена VL (или домена VH) и скрининг библиотеки на дополнительный домен VH или (домен VL). Скрининг выявил 14 новых партнеров для определенного домена VH и 13 новых партнеров для определенного домена

VL, которые были сильными связующими, как определено с помощью ИФА. *См. также* Kim SJ & Hong HJ, (2007) J Microbiol 45: 572-577, которая полностью включен в настоящий документ посредством ссылки, описывающий способы получения антител, которые специфически связываются со специфическим антигеном, с использованием специфического домена VH и скрининга библиотеки (*например*, библиотеки VL человека) на предмет комплементарных доменов VL; выбранные домены VL, в свою очередь, можно использовать для выбора дополнительных комплементарных (*например*, человека) доменов VH.

[0104] В некоторых аспектах указанные CDR антитела или их антигенсвязывающего фрагмента могут быть определены в соответствии со схемой нумерации по Чотиа, 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 патент США № 7709226). Обычно при использовании системы нумерации по Кабата петля по Чотиа CDR-H1 присутствует на аминокислотах тяжелой цепи с 26 по 32, 33 или 34, петля по Чотиа CDR-H2 присутствует на аминокислотах тяжелой цепи с 52 по 56, и петля по Чотиа CDR-H3 присутствует в аминокислотах тяжелой цепи с 95 по 102, тогда как петля по Чотиа CDR-L1 присутствует в аминокислотах легкой цепи с 24 по 34, петля по Чотиа CDR-L2 присутствует в аминокислотах легкой цепи с 50 по 56 и петля по Чотиа CDR-L3 присутствует на аминокислотах легкой цепи с 89 по 97. Конец петли CDR-H1 по Чотиа при нумерации согласно системе нумерации по Кабат варьируется между H32 и H34 в зависимости от длины петли (это связано с тем, что в схеме нумерации по Кабат в H35A и H35B размещаются вставки; если ни 35A, ни 35B не присутствуют, петля заканчивается на 32; если присутствует только 35A, петля заканчивается на 33; если присутствуют оба 35A и 35B, петля заканчивается на 34).

[0105] В определенных аспектах в настоящем документе представлены способы введения антител и их антигенсвязывающих фрагментов, которые специфически связываются с B7-H4 (*например*, с B7-H4 человека) и содержат по Чотиа CDR VH и VL антитела 20502, перечисленные в Таблицах 3 и 4. В определенных вариантах осуществления в настоящем документе представлены способы введения антител или их антигенсвязывающих фрагментов, которые специфически связываются с B7-H4 (*например*, с B7-H4 человека) и содержат одну или более CDR, в которых CDR по Чотиа и Кабат имеют одинаковую аминокислотную последовательность. В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе представлены способы введения антител и их антигенсвязывающих фрагментов, которые специфически связываются с B7-H4 (*например*, с B7-H4 человека) и

содержат комбинации CDR по Кабат и CDR по Чотия.

[0106] В некоторых аспектах CDR антитела или его антигенсвязывающего фрагмента могут быть определены в соответствии с системой нумерации IMGT, как описано в Lefranc M-P, (1999) *The 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, а VL-CDR3 находится в положениях с 89 по 97. В конкретном варианте осуществления в настоящем документе представлены способы введения антител и их антигенсвязывающих фрагментов, которые специфически связываются с B7-H4 (*например*, с B7-H4 человека) и содержат по IMGT CDR VH и VL антитела 20502, перечисленные в Таблицах 3 и 4, *например*, как описано в Lefranc M-P (1999) *выше* и Lefranc M-P *et al.*, (1999) *выше*).

[0107] В некоторых аспектах CDR антитела или его антигенсвязывающего фрагмента могут быть определены согласно 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," in *Antibody Engineering*, Kontermann and Dübel, eds., Chapter 31, pp. 422-439, Springer-Verlag, Berlin (2001). В конкретном варианте осуществления в настоящем документе представлены способы введения антител или их антигенсвязывающих фрагментов, которые специфически связываются с B7-H4 (*например*, с B7-H4 человека) и содержат CDR VH и VL антитела 20502, перечисленные в Таблицах 3 и 4, как определено методом в MacCallum RM *et al.*

[0108] В определенных аспектах CDR антитела или его антигенсвязывающего фрагмента могут быть определены в соответствии со схемой нумерации AbM, которая относится к гипервариабельным областям по AbM, которые представляют собой компромиссный вариант между CDR по Кабат и структурными петлями по Чотия, и используются в программном обеспечении для моделирования антител Oxford Molecular's AbM (Oxford Molecular Group, Inc.). В конкретном варианте осуществления в настоящем документе представлены способы введения антител или их антигенсвязывающих фрагментов, которые специфически связываются с B7-H4 (*например*, с B7-H4 человека) и содержат CDR VH и VL антитела 20502, перечисленные в Таблицах 3 и 4, как определяется схемой нумерации по AbM.

[0109] В конкретных аспектах в настоящем документе представлены способы введения антител, которые содержат тяжелую цепь и легкую цепь.

[0110] Что касается легкой цепи, в конкретном варианте осуществления легкая цепь

антитела, описанного в данном документе, представляет собой легкую каппа-цепь. Константная область легкой каппа-цепи человека может содержать следующую аминокислотную последовательность:

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ
DSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:23).

[0111] Константная область легкой каппа-цепи человека может кодироваться следующей нуклеотидной последовательностью:

CGGACCGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAA
TCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAA
GTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTCAC
AGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCA
AAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTG
AGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT (SEQ ID NO:24).

[0112] В конкретном варианте осуществления антитело, которое иммуноспецифически связывается с полипептидом В7-Н4 (*например*, В7-Н4 человека) для использования в способах, описанных в настоящем документе, содержит легкую цепь, в которой аминокислотная последовательность домена VL содержит последовательность, изложенную в Таблица 4, где константная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность константной области легкой каппа-цепи человека.

[0113] В конкретном варианте осуществления антитело, которое иммуноспецифически связывается с В7-Н4 (*например*, с В7-Н4 человека) для использования в способах, описанных в настоящем документе, содержит тяжелую цепь, в которой аминокислотная последовательность домена VH содержит аминокислотную последовательность, указанную в Таблица 3, где константная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность константной области гамма (γ) тяжелой цепи человека.

[0114] Константная область тяжелой цепи IgG₁ человека может содержать следующую аминокислотную последовательность:

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTQSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS
GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG
PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY
NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR
DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK
SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:25).

[0115] Константная область тяжелой цепи IgG₁ человека может кодироваться следующей нуклеотидной последовательностью:

GCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCT
 GGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGAC
 GGTGTTCGTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCT
 ACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTT
 GGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGG
 ACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCCA
 GCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAGCAACCAAGGAC
 ACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCAC
 GAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGC
 CAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGGGTGGTCAGCGTC
 CTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTC
 CAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGC
 CCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAAC
 CAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAG
 TGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACCTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGA
 CTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCA
 GCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACAC
 GCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA. (SEQ ID NO:26)

[0116] В конкретном варианте осуществления антитело, которое иммуноспецифически связывается с В7-Н4 (*например*, В7-Н4 человека) для использования в способах, описанных в настоящем документе, содержит домен VH и домен VL, содержащий аминокислотную последовательность любого домена VH и VL, описанного в настоящем документе, и где константные области содержат аминокислотные последовательности константных областей молекулы иммуноглобулина IgG (*например*, IgG человека). В другом конкретном варианте осуществления антитело, которое иммуноспецифически связывается с В7-Н4 (*например*, В7-Н4 человека) для использования в способах, описанных в настоящем документе, содержат домен VH и домен VL, содержащий аминокислотную последовательность любого домена VH и VL, описанного в настоящем документе, и где константные области содержат аминокислотные последовательности константных областей молекулы иммуноглобулина IgG₁ (*например*, IgG₁ человека).

[0117] Сообщалось, что антитела с пониженным содержанием фукозы обладают повышенным сродством к рецепторам Fc, таким как, *например*, FcγRIIIA. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент для использования в способах, описанных в данном документе, имеет пониженное содержание фукозы или не имеет фукозы (т.е., является «афукозилированным»). Такие

антитела или антигенсвязывающие фрагменты можно получить с использованием методик, известных специалистам в данной области техники. Например, они могут экспрессироваться в клетках, дефицитных или лишенных способности к фукозилированию. В конкретном примере клеточные линии с нокаутом обоих аллелей гена $\alpha 1,6$ -фукозилтрансферазы (FUT8) можно использовать для получения антител или их антигенсвязывающих фрагментов с пониженным содержанием фукозы. Система Potelligent® (Lonza) является примером такой системы, которую можно использовать для получения антител и их антигенсвязывающих фрагментов с пониженным содержанием фукозы. Альтернативно, антитела или их антигенсвязывающие фрагменты с пониженным содержанием фукозы или без содержания фукозы могут быть получены, *например*: (i) культивированием клеток в условиях, которые предотвращают или снижают фукозилирование; (ii) посттрансляционным удалением фукозы (*например*, ферментом фукозидазой); (iii) посттрансляционным добавлением желаемого углевода, *например*, после рекомбинантной экспрессии негликозилированного гликопротеина; или (iv) очисткой гликопротеина для 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 антител без содержания фукозы или с пониженным содержанием фукозы.

[0118] В некоторых вариантах осуществления афукозилированное антитело B7-H4 или его антигенсвязывающий фрагмент обладает повышенной активностью ADCC *in vitro* по сравнению с фукозилированными антителами B7-H4 или их антигенсвязывающими фрагментами, имеющими такую же аминокислотную последовательность. В некоторых вариантах осуществления афукозилированные антитела B7-H4 или их антигенсвязывающие фрагменты вызывают специфический лизис, который составляет по меньшей мере 10, по меньшей мере 15, по меньшей мере 20, по меньшей мере 25, по меньшей мере 30, по меньшей мере 35, по меньшей мере 40, по меньшей мере 45, по меньшей мере 50, по меньшей мере 60, по меньшей мере 65, по меньшей мере 70 или по меньшей мере 75 процентных пунктов выше, чем специфический лизис фукозилированными антителами B7-H4. Специфический лизис можно определить, как описано в Примере 2 в данном документе.

[0119] В некоторых вариантах осуществления антитело B7-H4 или его антигенсвязывающий фрагмент обладает повышенной аффинностью к Fc гамма RIIIA по сравнению с фукозилированными антителами B7-H4 или их антигенсвязывающими фрагментами, имеющими такую же аминокислотную последовательность. В некоторых

вариантах осуществления афукозилированные антитела В7-Н4 или их антигенсвязывающие фрагменты связываются с Fc гамма RIIIА по меньшей мере в 2 раза, по меньшей мере в 3 раза, по меньшей мере в 4 раза, по меньшей мере в 5 раз, по меньшей мере в 7 раз, по меньшей мере в 10 раз, по меньшей мере в 12 раз, по меньшей мере в 15 раз, по меньшей мере в 17 раз или по меньшей мере в 20 раз большую аффинность, чем фукозилированные антитела В7-Н4 или их антигенсвязывающие фрагменты. В некоторых вариантах осуществления сродство к Fc гамма RIIIА определяют с использованием поверхностного плазмонного резонанса. В некоторых вариантах осуществления Fc гамма RIIIА выбран из Fc гамма RIIIА (V158) и Fc гамма RIIIА (F158). В некоторых вариантах осуществления Fc гамма RIIIА представляет собой Fc гамма RIIIА (V158).

[0120] В некоторых вариантах осуществления присутствие фукозы можно определить способом, включающим высокоэффективную жидкостную хроматографию (ВЭЖХ), капиллярный электрофорез или масс-спектрометрию MALDI-TOF.

[0121] В конкретных вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (i) содержит последовательности CDR 20502, последовательности VH и VL 20502 или последовательности тяжелой и легкой цепей 20502 и (ii) является афукозилированным.

[0122] В конкретных вариантах осуществления композиция содержит антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые (i) содержат последовательности CDR 20502, последовательности VH и VL 20502 или последовательности тяжелой и легкой цепей 20502 и (ii) являются афукозилированы, например, где по меньшей мере 95% антител в композиции афукозилированы или где фукозилирование не обнаруживается в композиции.

[0123] Сконструированные гликоформы могут быть полезны для множества целей, включая, помимо прочего, усиление или снижение эффекторной функции. Способы создания сконструированных гликоформ в антителе или его антигенсвязывающем фрагменте, описанные в данном документе, включают, но не ограничиваются ими, способы, раскрытые, *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; патентах США №№ 6602684; 6946292; и 7214775; патентных публикациях США №№ 2007/0248600; 2007/0178551; 2008/0060092; и 2006/0253928; публикациях Международных заявок на патент WO 00/61739; WO 01/292246; WO 02/311140; и WO 02/30954; технологии Potillegent™ (Biowa, Inc. Princeton, N.J.); и инженерная технология гликозилирования GlycoMAb® (Glycart biotechnology AG, Цюрих, Швейцария). *См., также, например*, Ferrara C *et al.*, (2006) Biotechnol Bioeng 93: 851-861;

международные публикации №№ WO 07/039818; WO 12/130831; WO 99/054342; WO 03/011878; и WO 04/065540.

[0124] В некоторых вариантах осуществления любая из мутаций или модификаций константной области, описанных в данном документе, может быть введена в одну или обе константные области тяжелой цепи антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, описанного в данном документе, имеющего две константные области тяжелой цепи.

[0125] В другом конкретном варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в настоящем документе, которые иммуноспецифически связываются с B7-H4 (*например*, с B7-H4 человека), содержит тяжелую цепь и легкую цепь, где (i) тяжелая цепь содержит домен VH, содержащий аминокислотные последовательности VH CDR1, VL CDR2 и VL CDR3 антитела 20502, перечисленные в Таблице 1 (SEQ ID NO: 5, 6 и 7 соответственно); (ii) легкая цепь содержит домен VL, содержащий аминокислотные последовательности VL CDR1, VH CDR2 и VH CDR3 антитела 20502, перечисленные в Таблице 2 (SEQ ID NO: 8, 9 и 10 соответственно); (iii) тяжелая цепь дополнительно содержит константный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность константного домена тяжелой цепи IgG₁ человека; и (iv) легкая цепь дополнительно содержит константный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность константного домена легкой каппа-цепи человека.

[0126] В другом конкретном варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в настоящем документе, которые иммуноспецифически связываются с B7-H4 (*например*, с B7-H4 человека), содержит тяжелую цепь и легкую цепь, где (i) тяжелая цепь содержит домен VH, содержащий аминокислотную последовательность домена VH антитела 20502, перечисленную в Таблице 3 (SEQ ID NO: 11); (ii) легкая цепь содержит домен VL, содержащий аминокислотную последовательность домена VL антитела 20502, перечисленную в Таблице 4 (SEQ ID NO: 12); (iii) тяжелая цепь дополнительно содержит константный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность константного домена тяжелой цепи IgG₁ человека; и (iv) легкая цепь дополнительно содержит константный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность константного домена легкой каппа-цепи человека.

[0127] В конкретных вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в настоящем документе, которые иммуноспецифически связываются с B7-H4 (*например*, с B7-H4 человека), проявляет активность блокады контрольных точек Т-клеток. В конкретных вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в настоящем документе, которые иммуноспецифически связываются

с В7-Н4 (*например*, с В7-Н4 человека), увеличивает выработку интерферона-гамма (IFN γ) в Т-клетках. В конкретных вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в настоящем документе, которые иммуноспецифически связываются с В7-Н4 (*например*, с В7-Н4 человека), увеличивает пролиферацию Т-клеток. В конкретных вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в настоящем документе, которые иммуноспецифически связываются с В7-Н4 (*например*, с В7-Н4 человека), увеличивает пролиферацию CD4⁺ Т-клеток. В конкретных вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в настоящем документе, которые иммуноспецифически связываются с В7-Н4 (*например*, с В7-Н4 человека), увеличивает пролиферацию CD8⁺ Т-клеток.

[0128] В конкретных вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в настоящем документе, которые иммуноспецифически связываются с В7-Н4 (*например*, с В7-Н4 человека), проявляет антитело-зависимую клеточную цитотоксичность (АЗКЦ). В конкретных вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в настоящем документе, которые иммуноспецифически связываются с В7-Н4 (*например*, с В7-Н4 человека), проявляет антитело-зависимую клеточную цитотоксичность (АЗКЦ) в клеточных линиях, содержащих по меньшей мере 300000 В7-Н4 молекул на их клеточной поверхности (*например*, клетки SK-BR-3). В конкретных вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в настоящем документе, которые иммуноспецифически связываются с В7-Н4 (*например*, с В7-Н4 человека), проявляет антитело-зависимую клеточную цитотоксичность (АЗКЦ) в клеточных линиях, содержащих по меньшей мере 100000 В7-Н4 молекул на их клеточной поверхности (*например*, клетки HCC1569). В конкретных вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в настоящем документе, которые иммуноспецифически связываются с В7-Н4 (*например*, с В7-Н4 человека), проявляет антитело-зависимую клеточную цитотоксичность (АЗКЦ) в клеточных линиях, содержащих по меньшей мере 50000 В7-Н4 молекул на их клеточной поверхности (*например*, клетки ZR-75-1). В конкретных вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в настоящем документе, которые иммуноспецифически связываются с В7-Н4 (*например*, с В7-Н4 человека), проявляет антитело-зависимую клеточную цитотоксичность (АЗКЦ) в клеточных линиях, содержащих по меньшей мере 30000 В7-Н4 молекул на их клеточной поверхности (*например*, клетки MDA-MB-468). В конкретных вариантах осуществления антитело или

его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в настоящем документе, которые иммуноспецифически связываются с В7-Н4 (*например*, с В7-Н4 человека), проявляет антитело-зависимую клеточную цитотоксичность (АЗКЦ) в клеточных линиях, содержащих по меньшей мере 15000 В7-Н4 молекул на их клеточной поверхности (*например*, клетки НСС1964).

[0129] В конкретном аспекте описанный в настоящем документе антигенсвязывающий фрагмент, который иммуноспецифически связывается с В7-Н4 (*например*, с В7-Н4 человека), выбран из группы, состоящей из Fab, Fab', F(ab')₂ и scFv, где указанный Fab, Fab', F(ab')₂ или scFv содержит последовательность вариабельной области тяжелой цепи и последовательность вариабельной области легкой цепи антитела к В7-Н4 или его антигенсвязывающего фрагмента, как описано в настоящем документе. Fab, Fab', F(ab')₂ или scFv можно получить любым способом, известным специалистам в данной области техники. В некоторых вариантах осуществления указанный Fab, Fab', F(ab')₂ или scFv дополнительно содержат фрагмент, который увеличивает период полувыведения антитела *in vivo*. Указанный фрагмент также называют «фрагмент, увеличивающий период полувыведения». Может использоваться любой фрагмент, известный специалистам в данной области техники для увеличения периода полувыведения Fab, Fab', F(ab')₂ или scFv *in vivo*. Например, фрагмент, увеличивающий период полувыведения, может включать Fc-область, полимер, альбумин или связывающий альбумин белок или соединение. Указанный полимер может включать природный или синтетический, необязательно замещенный полиалкилен с линейной или разветвленной цепью, полиалкенилен, полиоксисалкилен, полисахарид, полиэтиленгликоль, полипропиленгликоль, поливиниловый спирт, метоксиполиэтиленгликоль, лактозу, амилозу, декстран, гликоген или их производные. Заместители могут включать одну или более гидроксильных, метильных или метоксигрупп. В некоторых вариантах осуществления указанный Fab, Fab', F(ab')₂ или scFv можно модифицировать добавлением одной или более C-концевых аминокислот для присоединения фрагмента, увеличивающего период полувыведения. В некоторых вариантах осуществления указанный фрагмент, увеличивающий период полувыведения, представляет собой полиэтиленгликоль или сывороточный альбумин человека. В некоторых вариантах осуществления указанный Fab, Fab', F(ab')₂ или scFv слиты с Fc-областью.

4.4 Фармацевтические композиции

[0130] В настоящем документе предложены способы введения композиций, содержащих антитело к В7-Н4 или его антигенсвязывающий фрагмент, имеющий

желаемую степень чистоты в физиологически приемлемом носителе, вспомогательном веществе или стабилизаторе (Remington's Pharmaceutical Sciences (1990) Mack Publishing Co., Easton, PA). Приемлемые носители, вспомогательные вещества или стабилизаторы нетоксичны для реципиентов в используемых дозах и концентрациях. (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)). Композиции, используемые для введения *in vivo*, могут быть стерильными. Данное условие легко достижимо посредством фильтрования через, например, мембраны для стерильного фильтрования.

[0131] В некоторых вариантах осуществления предложены способы введения фармацевтической композиции, в которых указанная фармацевтическая композиция содержит афукозилированные антитела к В7-Н4 или их антигенсвязывающие фрагменты и фармацевтически приемлемый носитель. В конкретных вариантах осуществления предложены способы введения фармацевтической композиции, в которых указанная фармацевтическая композиция содержит афукозилированные антитела к В7-Н4 или их антигенсвязывающие фрагменты, например, в которых по меньшей мере 80% указанных антител в указанной композиции являются афукозилированными. В конкретных вариантах осуществления предложены способы введения фармацевтической композиции, в которых указанная фармацевтическая композиция содержит афукозилированные антитела к В7-Н4 или их антигенсвязывающие фрагменты, например, в которых по меньшей мере 85% указанных антител в указанной композиции являются афукозилированными. В конкретных вариантах осуществления предложены способы введения фармацевтической композиции, в которых указанная фармацевтическая композиция содержит афукозилированные антитела к В7-Н4 или их антигенсвязывающие фрагменты, например, в которых по меньшей мере 90% указанных антител в указанной композиции являются афукозилированными. В конкретных вариантах осуществления предложены способы введения фармацевтической композиции, в которых указанная фармацевтическая композиция содержит афукозилированные антитела к В7-Н4 или их антигенсвязывающие фрагменты, например, в которых по меньшей мере 95% указанных антител в указанной композиции являются афукозилированными. В конкретных вариантах осуществления предложены способы введения фармацевтической композиции, в которых указанная фармацевтическая композиция содержит афукозилированные антитела к В7-Н4 или их антигенсвязывающие фрагменты, например, в которых по меньшей мере 96% указанных антител в указанной композиции являются афукозилированными. В конкретных вариантах

осуществления предложены способы введения фармацевтической композиции, в которых указанная фармацевтическая композиция содержит афукозилированные антитела к В7-Н4 или их антигенсвязывающие фрагменты, например, в которых по меньшей мере 97% указанных антител в указанной композиции являются афукозилированными. В конкретных вариантах осуществления предложены способы введения фармацевтической композиции, в которых указанная фармацевтическая композиция содержит афукозилированные антитела к В7-Н4 или их антигенсвязывающие фрагменты, например, в которых по меньшей мере 98% указанных антител в указанной композиции являются афукозилированными. В конкретных вариантах осуществления предложены способы введения фармацевтической композиции, в которых указанная фармацевтическая композиция содержит афукозилированные антитела к В7-Н4 или их антигенсвязывающие фрагменты, например, в которых по меньшей мере 99% указанных антител в указанной композиции являются афукозилированными. В конкретных вариантах осуществления предложены способы введения фармацевтической композиции, в которых указанная фармацевтическая композиция содержит афукозилированные антитела к В7-Н4 или их антигенсвязывающие фрагменты, например, в которых фукоза является неопределяемой в указанной композиции.

[0132] В некоторых вариантах осуществления предложены способы введения фармацевтической композиции, в которых указанная фармацевтическая композиция содержит (i) выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое специфически связывается с В7-Н4 человека, содержащее (а) определяющую комплементарность область (CDR) вариабельной области тяжелой цепи (VH) 1, VH CDR2, VH CDR3 и последовательности вариабельной области легкой цепи (VL) CDR1, CDR2 и CDR3 SEQ ID NO: 5-10, соответственно, (b) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 11 и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 12, или (c) тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 21, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 22, и (ii) фармацевтически приемлемый наполнитель.

[0133] В настоящем документе также предлагается способ введения фармацевтической композиции, в которой фармацевтическая композиция содержит (i) антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связываются с В7-Н4 человека и содержат определяющую комплементарность область (CDR) вариабельной области тяжелой цепи (VH) 1, VH CDR2, VH CDR3 и последовательности CDR1, CDR2 и CDR3

вариабельной области легкой цепи (VL) SEQ ID NO: 5-10, соответственно, и (ii) фармацевтически приемлемый наполнитель, причем по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% антител или их антигенсвязывающих фрагментов в композиции являются афукозилированными. В одном варианте осуществления (i) антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 11, и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 12 или (ii) антитело содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 21, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 22.

[0134] В настоящем документе также предлагается способ введения дополнительной фармацевтической композиции в дополнение к фармацевтической композиции, содержащей антитело к В7-Н4 или его антигенсвязывающий фрагмент. В таких вариантах осуществления указанная дополнительная фармацевтическая композиция содержит антагонист PD-1/PD-L1, такой как пембролизумаб. В таких вариантах осуществления указанная дополнительная фармацевтическая композиция, содержащая пембролизумаб, предоставляется в виде 50 мг лиофилизированного порошка в ампуле с однократной дозой для восстановления или в виде раствора 100 мг/4 мл (25 мг/мл) в ампуле с однократной дозой. В таких вариантах осуществления предоставлено количество дополнительной фармацевтической композиции для введения 200 мг пембролизумаба указанному пациенту при данном введении. Дополнительную фармацевтическую композицию можно вводить одновременно или последовательно с фармацевтической композицией, содержащей антитело к В7-Н4 или его антигенсвязывающий фрагмент.

4.5 Производство антител и полинуклеотиды

[0135] Антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые иммуноспецифически связываются с В7-Н4 (*например*, с В7-Н4 человека), могут быть получены любым способом, известным в данной области техники, для синтеза антител и их антигенсвязывающих фрагментов, например, путем химического синтеза или методами рекомбинантной экспрессии. В описанных в данном документе способах используются, если не указано иное, обычные методы молекулярной биологии, микробиологии, генетического анализа, рекомбинантной ДНК, органической химии, биохимии, ПЦР, синтеза и модификации олигонуклеотидов, гибридизации нуклеиновых кислот и смежных областей, которые

известны специалистам в данной области техники. Эти методы 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.

[0136] В определенных аспектах в настоящем документе предложены способы введения антитела к B7-H4 или его антигенсвязывающего фрагмента или фармацевтической композиции, содержащей такие антитела или фрагменты, в которых антитела или фрагменты получают путем рекомбинантной экспрессии полинуклеотида, содержащего нуклеотидную последовательность, в клетке-хозяине.

[0137] В некоторых аспектах антитело к B7-H4 или антигенсвязывающий фрагмент, вводимый в соответствии со способами, предложенными в настоящем документе, включает переменную область тяжелой цепи, кодируемую полинуклеотидом, содержащим нуклеотидную последовательность, представленную в Таблице 9 (т.е. SEQ ID NO: 27). В некоторых аспектах антитело к B7-H4 или антигенсвязывающий фрагмент, вводимый в соответствии со способами, предложенными в настоящем документе, включает переменную область тяжелой цепи, кодируемую полинуклеотидом, содержащим нуклеотидную последовательность, представленную в Таблице 9 (т.е. SEQ ID NO: 27) и нуклеотидную последовательность, кодирующую константную область тяжелой цепи гамма (γ) человека. В некоторых аспектах антитело к B7-H4 или антигенсвязывающий фрагмент, вводимый в соответствии со способами, предложенными в настоящем документе, включает переменную область тяжелой цепи, кодируемую полинуклеотидом, содержащим нуклеотидную последовательность, представленную в Таблице 9 (т.е. SEQ ID NO: 27) и константный домен тяжелой цепи, кодируемый полинуклеотидом, содержащим нуклеотидную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 26.

Таблица 9. Полинуклеотидные последовательности, кодирующие переменную область тяжелой цепи

Антитело	Полинуклеотидная последовательность, кодирующая переменную область тяжелой цепи (SEQ ID NO)
20502	CAGCTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCCAGGACTGGTGAAGCCTTCGG

	AGACCCTGTCCCTCACCTGCACTGTCTCTGGTGGCTCCATCAAAAGT GGTAGTTACTACTGGGGCTGGATCCGCCAGCCCCCAGGGAAGGGGC TGGAGTGGATTGGGAACATCTATTATAGTGGGAGCACCTACTACAA CCCGTCCCTCAGAAGTCGAGTCACCATATCCGTAGACACGTCCAAG AACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGTTCTGTGACCGCCGCAGACACGG CGGTGTACTACTGCGCCAGAGAAGGATCTTACCCCAATCAGTTTGA TCCATGGGGACAGGGTACATTGGTCAACCGTCTCCTCA (SEQ ID NO:27)
--	---

[0138] В некоторых аспектах антитело к B7-H4 или антигенсвязывающий фрагмент, вводимый в соответствии со способами, предложенными в настоящем документе, включает переменную область легкой цепи, кодируемую полинуклеотидом, содержащим нуклеотидную последовательность, представленную в Таблице 10 (т.е. SEQ ID NO: 28). В некоторых аспектах антитело к B7-H4 или антигенсвязывающий фрагмент, вводимый в соответствии со способами, предложенными в настоящем документе, включает переменную область легкой цепи, кодируемую полинуклеотидом, содержащим нуклеотидную последовательность, представленную в Таблице 10 (т.е. SEQ ID NO: 28) и нуклеотидную последовательность, кодирующую константную область легкой цепи человека. В некоторых аспектах антитело к B7-H4 или антигенсвязывающий фрагмент, вводимый в соответствии со способами, предложенными в настоящем документе, включает переменную область легкой цепи, кодируемую полинуклеотидом, содержащим нуклеотидную последовательность, представленную в Таблице 10 (т.е. SEQ ID NO: 28) и константный домен легкой цепи, кодируемый полинуклеотидом, содержащим нуклеотидную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 24.

Таблица 10. Полинуклеотидные последовательности, кодирующие переменную область легкой цепи

Антитело	Полинуклеотидная последовательность, кодирующая переменную область легкой цепи (SEQ ID NO)
20502	GAAATAGTGATGACGCAGTCTCCAGCCACCCTGTCTGTGTCTCCAGG GGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGC AACTTAGCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCT CATCTATGGTGCATCCACCAGGGCCACTGGTATCCCAGCCAGGTTCA GTGGCAGTGGGTCTGGGACAGAGTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTG CAGTCTGAAGATTTTGCAGTTTATTACTGTCAGCAGTACCACTCCTTC

	CCTTTCACTTTTGGCGGAGGGACCAAGGTTGAGATCAAA (SEQ ID NO:28)
--	--

[0139] В некоторых аспектах указанное антитело к B7-H4 или антигенсвязывающий фрагмент, вводимый в соответствии со способами, предложенными в настоящем документе, включает переменную область тяжелой цепи, кодируемую полинуклеотидом, содержащим нуклеотидную последовательность, кодирующую переменную область тяжелой цепи, представленную в Таблице 9 (т.е. SEQ ID NO: 27) и переменную область легкой цепи, кодируемую полинуклеотидом, содержащим нуклеотидную последовательность, кодирующую переменную область легкой цепи, представленную в Таблице 10 (т.е., SEQ ID NO:28).

[0140] В некоторых аспектах указанное антитело к B7-H4 или антигенсвязывающий фрагмент, вводимый в соответствии со способами, предложенными в настоящем документе, содержит (i) тяжелую цепь, кодируемую полинуклеотидом, содержащим нуклеотидную последовательность, кодирующую переменную область тяжелой цепи, представленную в Таблице 9 (т.е. SEQ ID NO: 27) и нуклеотидную последовательность, кодирующую константную область тяжелой цепи гамма (γ) человека и (ii) легкую цепь, кодируемую полинуклеотидом, содержащим нуклеотидную последовательность, кодирующую переменную область легкой цепи, представленную в Таблице 10 (т.е., SEQ ID NO:28) и нуклеотидную последовательность, кодирующую константную область легкой цепи лямбда человека.

[0141] В некоторых аспектах указанное антитело к B7-H4 или антигенсвязывающий фрагмент, вводимый в соответствии со способами, предложенными в настоящем документе, содержит (i) тяжелую цепь, кодируемую полинуклеотидом, содержащим нуклеотидную последовательность, кодирующую переменную область тяжелой цепи, представленную в Таблице 9 (т.е. SEQ ID NO: 27) и нуклеотидную последовательность, кодирующую константный домен, указанной тяжелой цепи, SEQ ID NO:26, и (ii) легкую цепь, кодируемую полинуклеотидом, содержащим нуклеотидную последовательность, кодирующую переменную область легкой цепи, представленную в Таблице 10 (т.е., SEQ ID NO:28) и нуклеотидную последовательность, кодирующую константный домен, указанной легкой цепи, SEQ ID NO:24.

[0142] В некоторых аспектах указанное антитело к B7-H4 или антигенсвязывающие фрагменты, вводимые в соответствии со способами, представленными в настоящем документе, кодируются полинуклеотидами, кодирующими антитело к B7-H4 или их антигенсвязывающие фрагменты или их домены, которые оптимизированы, например,

оптимизацией кодонов/РНК, заменой гетерологичными сигнальными последовательностями и устранением элементов нестабильности мРНК. Способы создания оптимизированных нуклеиновых кислот, кодирующих антитело к В7-Н4 или его антигенсвязывающий фрагмент или его домен (*например*, тяжелую цепь, легкую цепь, домен VH или домен VL), для рекомбинантной экспрессии путем внесения изменений в кодоны (например, изменение кодона, кодирующего ту же аминокислоту из-за вырожденности генетического кода) и/или устранение ингибирующих областей в мРНК может быть выполнено путем адаптации методов оптимизации, описанных, *например*, в патентах США № 5965726; 6174666; 6291664; 6414132; и 6794498, соответственно.

[0143] Полинуклеотиды могут быть, например, в форме РНК или в форме ДНК. ДНК включает кДНК, геномную ДНК и синтетическую ДНК. ДНК может быть двухцепочечной или одноцепочечной. Если ДНК одноцепочечная, она может быть кодирующей или не кодирующей (антисмысловой) цепью. В некоторых вариантах осуществления указанный полинуклеотид представляет собой кДНК или ДНК, лишенную одного или более интронов. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид представляет собой не встречающийся в природе полинуклеотид. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид получают рекомбинантно. В определенных вариантах осуществления указанные полинуклеотиды выделяют. В определенных вариантах осуществления указанные полинуклеотиды являются по существу чистыми. В определенных вариантах осуществления полинуклеотиды выделяют из природных компонентов.

[0144] В некоторых аспектах векторы (*например*, векторы экспрессии) содержат нуклеотидные последовательности, кодирующие антитела к В7-Н4 и их антигенсвязывающие фрагменты или их домен для рекомбинантной экспрессии в клетках-хозяевах, предпочтительно в клетках млекопитающих. В некоторых аспектах клетки, например клетки-хозяева, содержат такие векторы для рекомбинантной экспрессии антител к В7-Н4 или их антигенсвязывающих фрагментов, описанных в настоящем документе (*например*, антитела человека или гуманизированные антитела или их антигенсвязывающие фрагменты). Таким образом, описанный в настоящем документе способ получения антитела или его антигенсвязывающего фрагмента может включать экспрессию такого антитела или его антигенсвязывающего фрагмента в клетке-хозяине.

[0145] Вектор экспрессии может быть перенесен в клетку (*например*, клетку-хозяина) обычными методами, и полученные клетки могут быть затем культивированы обычными методами для получения антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, описанного в настоящем документе (*например*, антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, содержащего указанные шесть CDR, указанный VH, указанный VL, указанный VH и

указанный VL, указанный тяжелую цепь, указанный легкую цепь или указанные тяжелую и легкую цепи 20502) или их домен (*например*, указанный VH, указанный VL, указанный VH и указанный VL, указанную тяжелую цепь или указанную легкую цепь 20502).

[0146] В некоторых вариантах осуществления антитела к B7-H4 или их антигенсвязывающие фрагменты (*например*, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащий CDR 20502), вводимые в соответствии со способами, предложенными в настоящем документе, вырабатываются в клетках Potelligent® CHOK1SV.

[0147] В некоторых вариантах осуществления антитела к B7-H4 или их антигенсвязывающие фрагменты (*например*, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащий CDR 20502), вводимые в соответствии со способами, предложенными в настоящем документе, вырабатываются в клетке-хозяине, в которой отсутствует функциональный ген альфа-1,6-фукозилтрансферазы (FUT8). В некоторых вариантах осуществления указанная клетка-хозяин представляет собой клетку CHO.

[0148] В конкретных вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, вводимые в соответствии со способами, предложенными в настоящем документе, выделяют или очищают. Как правило, выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляет собой антитело, которое по существу не содержит других антител или их антигенсвязывающих фрагментов с другой антигенной специфичностью, чем выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент. Например, в конкретном варианте осуществления состав антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, описанный в настоящем документе, по существу не содержит клеточного материала и/или химических предшественников.

[0149] Следующие примеры приведены с целью иллюстрации, а не с целью ограничения.

5. ПРИМЕРЫ

[0150] Примеры в этом Разделе предложены в качестве иллюстрации, а не с целью ограничения.

5.1 Пример 1: Оценка распространенности экспрессии B7-H4 при нескольких показаниях

[0151] Моноклональное антитело B7-H4 A57.1 мыши (номер в каталоге ATCC PTA-5180) использовали для обнаружения присутствия B7-H4 в архивных образцах, смеси цельных срезов и микрочипах опухолей. Образцы обрабатывали указанным первичным

антителом и детектировали с помощью системы обнаружения полимеров, присоединенной к DAB (Ventana Medical Systems).

[0152] В7-Н4 легко обнаруживали в мембране и цитозоле опухолевых тканей, собранных у различных онкологических больных, включая инвазивную протоковую карциному, тройной негативный рак груди, рак яичников, немелкоклеточный рак легкого и рак эндометрия. Более того, частота экспрессии также была высокой при показаниях, перечисленных в Таблице 11.

Таблица 11: Обнаружение В7-Н4 в опухолях

Тип опухоли	#Всего	#Положительны й	Процент положительного
Тройной негативный рак груди	74	58	78%
Инвазивная протоковая карцинома	51	38	74,50%
Эндометриальная карцинома	77	54	70%
Рак яичников	141	85	60%
Немелкоклеточный рак легких (плоскоклеточный)	47	19	40%

[0153] В7-Н4 экспрессируется при других видах онкологических заболеваний, таких как рак груди, рак почки (например, почечно-клеточная карцинома), рак мочевого пузыря (например, уротелиально-клеточная карцинома), 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) и Liu, W., *et al.*, *Oncology Letters* 8: 2527-2534 (2014).

5.2 Пример 2: Афукозилированные и фукозилированные антитела 20502

[0154] Антитела с Fc областями, имеющие пониженное содержание фукозы в фрагментах гликанов могут проявлять более высокую АЗКЦ по сравнению с полностью фукозилированным антителом (Niwa R *et al.*, *Clinical Cancer Research* 11(6):2327-36 (2005)).

Антитела В7-Н4 получали в клетках CHO-х (Yamane-Ohnuki N, *et al. Biotechnology and Bioengineering* 87(5): 614-22 (2004)) для получения нормально фукозилированных антител и в клеточной линии CHO, сконструированной для получения афукозилированных антител (клетки CHO-y) (*id.*).

[0155] Фукозилированные и афукозилированные антитела 20502 характеризовали поверхностным плазмонным резонансом (SPR). Вкратце, антитела к Fab человека иммобилизовали на поверхности SPR чипа, дериватизированного карбоксильными группами, и антитела к В7-Н4 были захвачены на полученной поверхности при 5 мкг/мл в течение 30 секунд. В7-Н4 IgV-huIgG1 при различных концентрациях (0 нМ, 3,7 нМ, 11,1 нМ, 33,3 нМ, 100 нМ и 300 нМ) затем пропускали через поверхность и оставляли для связывания с антителами к В7-Н4 во время фазы ассоциации с последующей промывкой буфером во время фазы диссоциации.

В7-Н4 IgV-huIgG1:

MASLGQILFWSIISIIILAGAIALIIIGFGISGRHSITVTTVASAGNIGEDGILSCTFEPDIKLS
 IVIQWLKEGVLGLVHEFKEGKDELSEQDEMFRGRTAVFADQVIVGNASRLRLKNVQLTD
 AGTYKCYIITSKGKGNANLEYKTGA FSGSEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKP
 KDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS
 VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQV
 SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV
 FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:29)

[0156] Данные анализировали с использованием модели связывания 1:1, и фукозилированное и афукозилированное 20502 показали сходное связывание с белком В7-Н4 человека. Таким образом, гликозилирование не влияет на связывание.

[0157] Аффинности связывания областей Fc фукозилированного 20502 (Ab-F) и афукозилированного 20502 (Ab-A) с FcγRIIIa (V158) также характеризовали поверхностным плазмонным резонансом (SPR). Вкратце, белок А ковалентно присоединяли к декстрановому чипу с использованием набора для сочетания аминов, содержащего 100 мМ этилендиамина в 100 мМ натрий-боратном буфере, pH 8,0 в качестве блокирующего реагента. Ab-A или Ab-F захватывали при 2 плотностях на отдельных проточных ячейках, и поток, дериватизированного белка А, служил в качестве контроля. Fc gamma 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 связывания Ab-A рассчитывали с использованием модели связывания Biacore T200 Evaluation Software 1:1. Константу аффинности для связывания Ab-A и Ab-F определяли с использованием модели

аффинности в равновесном состоянии Biacore T200 Evaluation Software. Афукозилированное антитело В7-Н4 имело аффинность к Fc-гамма-рецептору IIIa (V158) в 140 раз выше, чем такое же антитело с фукозилированным Fc (Ab-F) (Таблица 12).

Таблица 12: Связывание аллеля V158 рецептора Fcγ IIIa (FcγRIIIa)

	ka (1/мсек)	kd (1/сек)	K _D (нМ)
Ab-A	6,46E+05	9,54E-10	15
Ab-F	н/о	н/о	210

[0158] Также характеризовали активность по отношению к блокаде Т-клеточной контрольной точки фукозилированными и афукозилированными антителами 20502. В этих экспериментах первичные Т-клетки человека обогащали из МКПК с использованием набора для обогащения Т-клеток человека EasySep™ в соответствии с инструкциями производителя. Обогащенные Т-клетки инкубировали при концентрации 2×10^5 клеток/мл с анти-CD3/анти-CD28 Dynabeads, при соотношении одна бусина на клетку, при 37°C. Через шесть дней бусины удаляли с помощью магнита, Т-клетки промывали и инкубировали при концентрации 1×10^6 клеток/мл с 10 ед./мл IL-2 при 37°C. Через четыре дня Т-клетки промывали и инкубировали при концентрации 1×10^6 клеток/мл вместе с искусственными антигенпредставляющими клетками (aAPC) при концентрации 2×10^6 клеток/мл при 37°C при титровании дозы антитела В7-Н4. aAPC обрабатывали митомицином С в течение одного часа при 37°C, а затем тщательно промывали перед добавлением к совместной культуре Т-клеток. Через 72 часа после совместного культивирования Т-клеток, aAPCs и В7-Н4 антител, планшеты центрифугировали и супернатанты собирали и оценивали уровень выработки IFNγ с помощью ИФА. Уровень выработки IFNγ наносили на график относительно концентрации антитела и EC50 активность рассчитывали с использованием нелинейной модели построения кривой (GraphPad Prism)

[0159] Антитела к В7-Н4 продемонстрировали сильную активность по отношению к блокаде контрольных точек Т-клеток, что измерялось по увеличению выработки IFNγ. Более того, не было очевидной разницы в эффективности между афукозилированными и фукозилированными антителами (Таблица 13).

Таблица 13: Эффективность блокады контрольных точек Т-лимфоцитов

		Анализ aAPC (EC50 +/- СОС; нМ)	
Антитело	ВН	Афукозилированное	Фукозилированное
20502	3	0,89 +/-0,44	0,74 +/-0,39

[0160] В дополнительных экспериментах АЗКЦ активность фукозилированных и

афукозилированных антител 20502 также была охарактеризована относительно В7-Н4-экспрессирующей линии клеток-мишени. В частности, первичные МКПК человека активировали цитокином при 1×10^6 клеток/мл с 200 МЕ/мл IL-2 при 37°C. На следующий день клетки промывали и инкубировали при соотношении эффектор: мишень 40:1 с клетками-мишенями SK-BR-3, которые были помечены кальцеином-АМ. Через 4 часа после инкубации, лизис клеток-мишеней определяли количественно с помощью флуориметра. Образец, обработанный Triton/X, служил в качестве контрольного образца для максимального лизиса, тогда как образец, обработанный только средой, служил в качестве контрольного образца для фонового лизиса. Процент (%) специфического лизиса рассчитывали следующим образом: $[1 - ((\text{образец} - \text{контроль среды}) / (\text{максимальный лизис} - \text{контроль среды}))] \times 100$. Процент (%) специфического лизиса наносили на график относительно концентрации антитела и EC50 активность рассчитывали с использованием нелинейной модели построения кривой (GraphPad Prism)

[0161] Антитела к В7-Н4 продемонстрировали сильную дозозависимую АЗКЦ активность против эндогенноэкспрессирующей В7-Н4 линии клеток молочной железы SK-BR-3. Более того, афукозилированные антитела продемонстрировали значительно более сильную АЗКЦ активность по сравнению с фукозилированными антителами (Таблица 14).

Таблица 14: активность АЗКЦ

Антитело	BIN	Анализ АЗКЦ (EC50 +/- СОС; нМ)	
		Афукозилированное	Фукозилированное
20502	3	0,0007 +/-1,1x10E-3	0,0370 +/-6,2E-2

5.3 Пример 3: Корреляция АЗКЦ активности с плотностью рецепторов

[0162] Плотность В7-Н4 определяли количественно на клеточной поверхности SK-BR-3, HCC1569, ZR-75-1, MDA-MB-48 и HCC1964 с помощью FACS в соответствии со спецификациями производителя. В частности, 1×10^5 клеток инкубировали с 15 мкг/мл антитела к В7-Н4 на льду в течение 25 минут. Параллельно одну каплю QuantumTM Simply Cellular (QSC) микросфер (предварительно покрытых увеличивающимися концентрациями захватывающих антимышинных антител IgG) также инкубировали с 15 мкг/мл антитела к В7-Н4 на льду в течение 25 минут. После инкубации клетки и микросферы QSC осаждали и промывали, а образцы собирали на проточном цитометре. Данные анализировали с использованием программного обеспечения FlowJo. Рассчитывали среднюю интенсивность флуоресценции (MFI) и вносили ее в электронную таблицу QuickCal®.

Регрессия, связывающая значение канала флуоресценции каждой бусины с заранее заданным значением способности связывания антитела (ABC), будет рассчитана автоматически. Значение ABC было присвоено после того, как значения MFI для помеченных ячеек также были добавлены в шаблон).

[0163] Антитела к B7-H4 оценивали на АЗКЦ активность по отношению к линиям клеток-мишеней, экспрессирующим B7-H4, с различными уровнями плотности B7-H4 на клеточной поверхности. В частности, 1×10^4 SK-BR-3, HCC1569, ZR-75-1, MDA-MB-468, или HCC1964 клетки - мишени совместно инкубировали с титрованием дозы антитела к B7-H4 при 4°C. 25 минут спустя, один из флаконов с репортерными клетками Jurkat-huCD16 от Promega оттаивали и $7,5 \times 10^4$ клеток добавляли к смеси клетки-мишени/антитела к B7-H4 и инкубировали при 37°C. Через 24 часа образцы нагревали до комнатной температуры (КТ) и инкубировали с буфером Bio-Glo. Субстрат и люминесценцию определяли количественно на мульти-меточном ридере EnVision. Данные наносили на график в виде зависимости люминесценции относительно концентрации антитела и EC50 активность рассчитывали с использованием нелинейной модели построения кривой (GraphPad Prism)

[0164] АЗКЦ активность антитела к B7-H4 зависела от плотности B7-H4 на клеточной поверхности: когда количество молекул на клеточной поверхности уменьшалось, уровень максимальной АЗКЦ активности также уменьшался. Более того, афукозилированные антитела продемонстрировали улучшенную АЗКЦ активность по сравнению с фукозилированными антителами, особенно по отношению к клеткам-мишеням с более низкими уровнями плотности B7-H4 на клеточной поверхности (Фиг. 1).

5.4 Пример 4: Противоопухолевая эффективность *In vivo* в комбинации с антителом к PD-1

[0165] **Способы:** Восемь недельные самки мышей BALB/c были приобретены в лабораториях Чарльз Ривер (Холлистер, Калифорния) и были акклиматизированы в течение двух недель перед началом исследования. Клеточная линия 4T1 карциномы молочной железы мыши была сконструирована для экспрессии химерного белка, содержащего внеклеточный домен B7-H4 мыши и трансмембранный домен B7H3 мыши. Опухолевые клетки имплантировали ортотопически в жировую подушку молочной железы мышей в количестве $0,5 \times 10^5$ клеток/50 мкл/мышь. Перед введением клетки культивировали до не более чем третьего пассажа в среде RPMI 1640, дополненной 10 % фетальной бычьей сывороткой (ФБС), инактивированной нагреванием. Клетки выращивали при 37°C в увлажненной атмосфере с 5 % CO₂. При достижении 80-85% слияния клетки собирали и

ресуспендировали в бессывороточной среде RPMI 1640, и вводили в жировую подушку молочной железы на вентральном боку каждой мыши.

[0166] После имплантации клеток, мышей проверяли два раза в неделю предмет на роста опухоли. Длину и ширину каждой опухоли измеряли штангенциркулем, а объем рассчитывали по формуле: $\text{Объем опухоли (мм}^3\text{)} = (\text{ширина (мм)} \times \text{длина (мм)}^2) / 2$. В день начала введения, опухоли были измерены, выбросы были исключены, и мышей случайным образом распределяли по группам введения. Для введения антитела к B7-H4 использовали суррогат мыши 20502, названный 20502-msIgG2a-F, который содержит варибельную область 20502, слитую 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 дня после имплантации клеток. Антитело к PD-1 (модифицированная версия RMP1-14 (Bio X Cell), содержащая молчащий Fc домен msIgG2a) вводили трижды посредством внутрибрюшинной (в/б) инъекции дважды в неделю, начиная с 11 дня после имплантации клеток. Опухоли продолжали измерять не реже двух раз в неделю до тех пор, пока объем опухоли не превысил 10% массы тела животного, или около 2000 мм³.

[0167] **Результаты:** Изменение размера опухоли, изменение среднего объема опухоли и процент выживаемости показаны на Фиг. 1A, 1B и 1C соответственно. Введение 20502-msIgG2a-F или антитела к PD-1 значительно снижало рост опухоли по сравнению с контролем msIgG2a ($p < 0,05$). Совместное введение 20502-msIgG2a-F и антитела к PD-1 значительно усиливало ингибирование роста опухоли по сравнению с любой из монотерапий ($p < 0,05$). Более того, комбинированная терапия привела к полной регрессии опухоли у 5 из 12 мышей. Р-значения были рассчитаны с использованием однофакторного анализа ANOVA рассчитанных объемов опухолей в каждый день исследования с множественными сравнениями между каждой группой.

[0168] В дополнительных экспериментах, 20502-msIgG2a-F продемонстрировало дозозависимую противоопухолевую активность в виде монотерапии в сконструированной модели 4T1 при таких низких дозах, как 1 и 3 мг/кг (Фиг. 2). Комбинация 20502-msIgG2a-F в дозах 0,3 мг/кг, 3 мг/кг или 30 мг/кг с антителом к PD-1 (5 мг/кг) привела к синергетической противоопухолевой активности в обеих сконструированной модели 4T1 и аналогичным образом сконструированной модели B16 (меланома) почти при всех испытанных дозах 20502-msIgG2a-F (Фиг. 3). (Антитело к PD-1 вводили в модели 4T1 три раза в те же дни, что и первые три дозы 20502-msIgG2a-F, и в модели B16 два раза в те же дни, что и вторую и четвертую дозы 20502-msIgG2a-F.) Этот синергетический эффект был особенно неожиданным для дозы 0,3 мг/кг, учитывая, что введение только 20502-msIgG2a-

F в этой дозе не оказало значительного влияния на объем опухоли (Фиг. 2). Более того, эффективность (процент выживаемости), наблюдаемая при дозе 0,3 мг/кг 20502-msIgG2a-F в сочетании с антителом к PD1, была неожиданно сопоставима или даже превосходила эффективность, наблюдаемую при дозе 3 мг/кг или 30 мг/кг в комбинации с антителом к PD1. Таким образом, эти результаты показывают, что антитела к PD1 синергетически сочетаются с антителом к B7-H4 в дозах последнего, которые неэффективны в качестве монотерапии, и это может иметь преимущества не только с точки зрения эффективности, но и безопасности.

5.5 Пример 5: Доклиническая фармакокинетика

[0169] Фармакокинетику (ФК) и токсикокинетику (ТК) афукозилированного 20502 оценивали после однократного и/или повторного еженедельного внутривенного (в/в) введения мышам, крысам и яванским макакам. Наблюдаемые ФК характеристики были одинаковыми во всех исследованиях. У всех видов, афуколизированное 20502 продемонстрировало линейную ФК и дозопропорциональное увеличение экспозиции (площадь под кривой концентрация в сыворотке-время [AUC]) с увеличением дозы. Еженедельное воздействие увеличилось в около 2 раза ($AUC_{0-7\text{дней}}$) после 4 еженедельных введений 20502 между первой и последней дозой; однако состояния равновесия достичь не удалось. Никаких существенных гендерных различий в профилях концентрации афукозилированного 20502 в сыворотке-время выявлено не было. У яванских макак (в двух различных исследованиях) период полувыведения, оцененный на выздоровевших животных, составлял от около 8,8 до около 12 дней, а уровни доз составляли от 1 до 100 мг/кг. Расчетный период полувыведения у крыс после однократного в/в вливания в дозе 40 мг/кг составил около 13,2 дня. ФК характеристики афукозилированного 20502 у животных поддерживают в/в вливание у людей со схемой введения один раз в 3 недели (Q3W).

5.6 Пример 6: Токсикология

[0170] Токсикологические исследования афукозилированного 20502 были выполнены на крысах и яванских макаках. Исследования включали пилотное исследование фармакокинетики (ФК)/переносимости однократной дозы на крысах, пилотное исследование токсичности повторных доз на яванских макаках и исследования токсичности повторных доз новых лекарственных препаратов (IND), обеспечивающие надлежащую лабораторную практику (НЛП), на крысах и яванских макаках, а также исследование с НЛП перекрестной реактивности ткани с тканями человека, крысы и яванского макака.

[0171] В пилотном исследовании переносимости однократной дозы на крысах, животные получали дозы до 40 мг/кг в виде 30-минутной внутривенной (в/в) инфузии. Афукозилированное 20502 не оказывало влияния на клинические наблюдения, массу тела, потребление пищи, оценку клинической патологии (химический или гематологический анализ сыворотки), общие наблюдения, массу органов или гистопатологическую оценку.

[0172] В пилотном токсикологическом исследовании с повторной дозой яванские макаки получали 4 еженедельных в/в дозы афукозилированного 20502 до 100 мг/кг в виде 30-минутной в/в инфузии. Все дозы хорошо переносились яванскими макаками. Во время оценки клинических наблюдений, массы тела, клинической патологии, вскрытия, массы органов или параметров гистопатологии не было зарегистрировано незапланированной смертности, связанной с исследуемым лекарственным средством, или изменений, связанных с введением афукозилированного 20502.

[0173] В НЛП токсикологических исследованиях с повторной дозой афукозилированное 20502 вводили в/в в дозах 1, 10 и 100 мг/кг/доза крысам и яванским макакам в течение 4 еженедельных доз. Обратимость токсичности оценивали в течение 6-недельного периода восстановления после последнего введения. Параметры для оценки включали офтальмологические осмотры, клинические наблюдения, изменения температуры тела, массы тела, наблюдения за потреблением пищи, гематологией, коагуляцией, клинической химией, общий анализ мочи, измерения массы органов, макроскопическое и микроскопическое исследование. В исследовании на яванских макаках также оценивались электрокардиограммы (ЭКГ) для оценки потенциальной сердечной токсичности.

[0174] Во время оценки исследования НЛП на крысах афукозилированное 20502 в целом хорошо переносилось, и не было никаких токсических эффектов, приписываемых афукозилированному 20502. Уровень отсутствия наблюдаемых побочных эффектов (NOAEL) у крыс Sprague Dawley считался равным 100 мг/кг/дозу.

[0175] В исследовании НЛП на яванских макаках афукозилированное 20502 в целом хорошо переносилось, и никаких нежелательных явлений (НЯ), связанных с афукозилированным 20502, не наблюдалось ни по одному из оцениваемых параметров. Во время исследования более высокая частота диареи наблюдалась в конце фазы дозирования в группах с более высокими дозами. Из-за более высокой частоты пораженных животных в средней и высокой дозе, а также из-за начала на более поздней стадии периода дозирования, возможна связь с воздействием афукозилированного 20502. Не было никаких микроскопических изменений в кишечном тракте у животных, получавших афукозилированное 20502, включая животных с диареей; таким образом, это наблюдение

было сочтено не нежелательным явлением, но, возможно, связанным с исследуемым лекарственным средством. В исследовании был зарегистрирован единичный смертельный исход. Одно животное в группе восстановления средней дозы было обнаружено мертвым на 35 день исследования, через 14 дней после последней дозы. Клинические наблюдения, макроскопическая и микроскопическая оценка соответствовали диагнозу заворот кишечника. Заворот кишечника иногда возникает у яванских макаков, и это считалось спонтанным заболеванием у этого животного, и не связанным с исследуемым лекарственным средством. NOAEL у яванских макаков составлял 100 мг/кг/дозу.

[0176] В дополнение к токсикологическим исследованиям *in vivo* было проведено исследование перекрестной реактивности НЛП-совместимых тканей для сравнения связывания афукозилированного 20502 с панелью из 36 тканей крысы, яванского макака и человека. Результаты показали, что характер связывания афукозилированного 20502 был сходным среди 3 видов и ограничивался эпителием молочной железы.

[0177] Таким образом, афукозилированное 20502 хорошо переносилось яванским макаком и крысой. NOAEL у обоих видов был признан равным 100 мг/кг/дозу, это самая высокая доза, которую испытывали в 4 еженедельных в/в дозах.

5.7 Пример 7: Фаза 1a увеличения дозы/вводная фаза для оценки безопасности и Фаза 1b увеличения дозы афукозилированного 20502 в комбинации с пембролизумабом

Для удобства афукозилированное 20502 в этом Примере обозначено как А-20502.

Название: Фаза 1a/1b исследования антитела к B7-H4 в комбинации с пембролизумабом (антителом к PD1) у пациентов с солидными опухолями на поздней стадии

Фаза 1a цели и конечные критерии оценки:

ЦЕЛИ	КОНЕЧНЫЕ КРИТЕРИИ ОЦЕНКИ
ПЕРВИЧНАЯ	
Безопасность	
А-20502 в комбинации с пембролизумабом	А-20502 в комбинации с пембролизумабом

ЦЕЛИ	КОНЕЧНЫЕ КРИТЕРИИ ОЦЕНКИ
- Оценить безопасность и переносимость А-20502 в комбинации с пембролизумабом у пациентов с солидными опухолями на поздней стадии. - Определить максимально переносимую дозу (МПД) и/или рекомендуемую дозу (РД) А-20502 в комбинации с пембролизумабом у пациентов с солидными опухолями на поздней стадии.	- Частота возникновения НЯ, отклонений от нормы в результатах клинико-лабораторных анализов, а также отклонений от нормы на электрокардиограмме (ЭКГ). - Частота НЯ 3 и 4 степени и отклонений от нормы в результатах клинико-лабораторных анализов, определяемых как DLT (ограничивающая дозу токсичность, ОДТ)
ВТОРИЧНАЯ	
Фармакокинетика	
А-20502 в комбинации с пембролизумабом Охарактеризовать ФК профиль А-20502 в комбинации с пембролизумабом у пациентов с солидными опухолями на поздней стадии.	А-20502 в комбинации с пембролизумабом Следующие параметры ФК будут получены из данных концентрация-время для А-20502 в комбинации с пембролизумабом, когда это необходимо и применимо: - AUC(площадь под кривой зависимости концентрации лекарственного средства в сыворотке-время) - C_{max} (максимальная концентрация лекарственного средства в сыворотке) - C_{остаточная} (остаточная концентрация лекарственного средства в сыворотке в конце интервала дозы) - CL (Клиренс)

ЦЕЛИ	КОНЕЧНЫЕ КРИТЕРИИ ОЦЕНКИ
	• $t_{1/2}$ (период полувыведения) • V_{ss} (объем распределения в устойчивом состоянии) • Другие параметры, такие как пропорциональность дозы, коэффициент накопления, достижение равновесного состояния, также будут рассчитаны для А-20502 при наличии данных. • При наличии данных можно рассчитать соотношение C_{max} и $C_{остаточная}$ для пембролизумаба.
Иммуногенность	
А-20502 в комбинации с пембролизумабом • Охарактеризовать иммуногенность А-20502 в комбинации с пембролизумабом у пациентов с солидными опухолями на поздней стадии.	А-20502 в комбинации с пембролизумабом • Иммунный ответ (ADA) на А-20502 • Иммунный ответ (ADA) на пембролизумаб
ПОИСКОВАЯ	
Эффективность	
А-20502 в комбинации с пембролизумабом Оценить клиническую пользу А-20502 в сочетании с пембролизумабом.	А-20502 в комбинации с пембролизумабом • Частота объективного ответа (ЧОО) определяется как общее количество пациентов с подтвержденным ответом как ПО, так и ЧО, согласно RECIST v1.1, деленное на общее количество пациентов, у которых можно оценить ответ.

ЦЕЛИ	КОНЕЧНЫЕ КРИТЕРИИ ОЦЕНКИ
	• Продолжительность ответа (DOR), определяемая как время от начала ответа (ПО или ЧО), который впоследствии подтверждается, до первого наблюдения прогрессирующего заболевания или смерти по любой причине • Выживаемость без прогрессирования (ВБП), определяемая как время от первой дозы пациента до первого наблюдения прогрессирующего заболевания или смерти по любой причине
Фармакодинамические маркеры	
А-20502 в комбинации с пембролизумабом • Охарактеризовать фармакодинамический профиль А-20502 в комбинации с пембролизумабом посредством анализа инфильтрата иммунных клеток при биопсиях опухоли до лечения и во время лечения. • Охарактеризовать фармакодинамический профиль А-20502 в комбинации с пембролизумабом посредством оценки исследовательских биомаркеров в образцах периферической крови.	А-20502 в комбинации с пембролизумабом • Изменения маркеров иммунного инфильтрата опухолей (например, могут включать естественные клетки-киллеры (NK), CD4, CD8 и/или другие избранные иммунные биомаркеры) по данным ИГХ и/или анализа РНК у пациентов, получавших А-20502 в сочетании с пембролизумабом • Изменения уровней цитокинов (например, могут включать IL-2, IL-6, IL-10, TNF, IFNγ), определенные с помощью мультиплексного анализа, у пациентов, получавших А-20502 в сочетании с пембролизумабом • Изменения отдельных дополнительных фармакодинамических маркеров периферической крови у пациентов,

ЦЕЛИ	КОНЕЧНЫЕ КРИТЕРИИ ОЦЕНКИ
	получавших А-20502 в комбинации с пембролизумабом

Фаза 1в цели и конечные критерии оценки:

ЦЕЛИ	КОНЕЧНЫЕ КРИТЕРИИ ОЦЕНКИ
ПЕРВИЧНАЯ	
Безопасность	
А-20502 в комбинации с пембролизумабом Оценить безопасность и переносимость А-20502 в комбинации с пембролизумабом у выбранных пациентов с солидными опухолями В7-	А-20502 в комбинации с пембролизумабом

ЦЕЛИ	КОНЕЧНЫЕ КРИТЕРИИ ОЦЕНКИ
Н4+ на поздней стадии, получавших лечение при МПД и/или РД	• Частота возникновения НЯ, отклонений от нормы в результатах клинико-лабораторных анализов, а также отклонений от нормы на электрокардиограмме ЭКГ у пациентов, получавших А-20502 в комбинации с пембролизумабом
ВТОРИЧНАЯ	
Эффективность	
А-20502 в комбинации с пембролизумабом • Оценить клиническую пользу А-20502 в комбинации с пембролизумабом у выбранных пациентов с солидными опухолями В7-Н4+ на поздней стадии, получавших лечение при МПД и/или РД	А-20502 в комбинации с пембролизумабом • ЧОО определяется как общее количество пациентов с подтвержденным ответом как ПО, так и ЧО, согласно RECIST v1.1, деленное на общее количество пациентов, у которых можно оценить ответ на А-20502 в комбинации с пембролизумабом. • DOR определяется как время от начала ответа (ПО или ЧО), который впоследствии подтверждается, до первого наблюдения прогрессирующего заболевания или смерти по любой причине из-за введения А-20502 в комбинации с пембролизумабом • ВВП определяется как время от первой дозы пациента до первого наблюдения прогрессирующего заболевания или смерти по любой причине из-за введения А-20502 в комбинации с пембролизумабом.
Фармакокинетика	

ЦЕЛИ	КОНЕЧНЫЕ КРИТЕРИИ ОЦЕНКИ
А-20502 в комбинации с пембролизумабом - Оценить профиль ФК А-20502 в комбинации с пембролизумабом у пациентов с солидными опухолями В7-Н4+ на поздней стадии, получавших лечение при МПД и/или РД - Охарактеризовать ФК профиль пембролизумаба в комбинации с А-20502 у пациентов с солидными опухолями на поздней стадии.	А-20502 в комбинации с пембролизумабом - Следующие параметры ФК будут получены из данных концентрация-время для А-20502 в комбинации с пембролизумабом, когда это необходимо и применимо: - AUC $C_{\max}$ $C_{\text{остаточная}}$ - CL $t_{1/2}$ V_{ss} - Другие параметры, такие как коэффициент накопления, достижение равновесного состояния, также будут рассчитаны при наличии пациентов, получавших лечение А-20502 в комбинации с пембролизумабом. $C_{\max}$ и $C_{\text{остаточная}}$, а также соотношение накопления $C_{\max}$ и $C_{\text{остаточная}}$ для пембролизумаба могут быть рассчитаны, при наличии данных.
Иммуногенность	
А-20502 в комбинации с пембролизумабом Охарактеризовать иммуногенность А-20502 в комбинации с пембролизумабом у выбранных пациентов с солидными опухолями В7-	А-20502 в комбинации с пембролизумабом - Иммунный ответ (ADA) на А-20502 - Иммунный ответ (ADA) на пембролизумаб

ЦЕЛИ	КОНЕЧНЫЕ КРИТЕРИИ ОЦЕНКИ
Н4+ на поздней стадии, получавших лечение при МПД и/или РД Охарактеризовать иммуногенность пембролизумаба в комбинации с А-20502 у пациентов с солидными опухолями В7-Н4+ на поздней стадии, получавших лечение при МПД и/или РД	
ПОИСКОВАЯ	
Фармакодинамические маркеры	
А-20502 в комбинации с пембролизумабом - Охарактеризовать фармакодинамический профиль А-20502 в комбинации с пембролизумабом посредством анализа инфильтрата иммунных клеток при биопсиях опухоли до лечения и во время лечения. - Охарактеризовать фармакодинамический профиль FP150 в комбинации с пембролизумабом посредством оценки исследовательских биомаркеров в образцах периферической крови.	А-20502 в комбинации с пембролизумабом - Изменения маркеров иммунного инфильтрата опухолей (например, могут включать естественные клетки-киллеры (NK), CD4, CD8 и/или другие избранные иммунные биомаркеры) по данным ИГХ и/или анализа РНК у пациентов, получавших А-20502 в комбинации с пембролизумабом - Изменения уровней цитокинов (например, могут включать IL-2, IL-6, IL-10, TNF, IFNγ), определенные с помощью мультиплексного анализа, у пациентов, получавших А-20502 в комбинации с пембролизумабом - Изменения отдельных дополнительных фармакодинамических биомаркеров в образцах периферической крови пациентов, получавших А-20502 в комбинации с пембролизумабом

ЦЕЛИ	КОНЕЧНЫЕ КРИТЕРИИ ОЦЕНКИ
Эффективность	
А-20502 в комбинации с пембролизумабом Оценить клиническую пользу А-20502 в комбинации с пембролизумабом у выбранных пациентов с солидными опухолями В7-Н4+ на поздней стадии, получавших лечение при МПД и/или РД	А-20502 в комбинации с пембролизумабом Общая выживаемость (ОВ), определяемая как время от первой дозы пациента до смерти по любой причине для пациентов, получавших А-20502 в комбинации с пембролизумабом

[0178] В некоторых вариантах осуществления пембролизумаб для инъекций поставляется в виде стерильного, не содержащего консервантов лиофилизированного порошка от белого до желтоватого цвета во флаконах для однократной дозы. Каждый флакон можно восстановить и разбавить для внутривенной инфузии. Каждые 2 мл такого восстановленного раствора содержат 50 мг пембролизумаба и включают L-гистидин (3,1 мг), полисорбат 80 (0,4 мг) и сахарозу (140 мг). Может содержать хлористоводородную кислоту/гидроксид натрия для доведения pH до 5,5. Лиофилизированный порошок восстанавливали путем добавления 2,3 мл стерильной воды для инъекций, USP, путем впрыскивания воды вдоль стенок флакона, а не непосредственно на лиофилизированный порошок (конечная концентрация 25 мг/мл). Флакон медленно перемешивали (без встряхивания) и ждали до 5 минут, чтобы пузырьки исчезли.

[0179] В других вариантах осуществления пембролизумаб доступен для инъекций в виде раствора 100 мг/4 мл (25 мг/мл) во флаконе для одноразового использования. Инъекция представляет собой стерильный, не содержащий консервантов, прозрачный или слегка опалесцирующий раствор, от бесцветного до слегка желтоватого цвета, который требует разбавления для внутривенной инфузии. Каждый флакон содержит 100 мг пембролизумаба в 4 мл раствора. Каждый 1 мл раствора содержит 25 мг пембролизумаба и составлен в: L-гистидин (1,55 мг), полисорбат 80 (0,2 мг), сахарозу (70 мг) и воду для инъекций, USP.

Дизайн исследования: Это Фаза 1a/1b открытого, многоцентрового, исследования с целью оценки дозирования, безопасности, переносимости, фармакокинетики (ФК),

фармакодинамики и предварительной эффективности А-20502 в комбинации с пембролизумабом в солидных опухолях на поздней стадии.

[0180] Это исследование включает в себя стадию повышения дозы/вводную фазу для оценки безопасности в Фазе 1a (Фаза 1a повышение дозы) и стадию применения ранее установленной максимальной переносимой дозы в расширенной популяции в Фазе 1b (Фаза 1b применение ранее установленной максимальной переносимой дозы в расширенной популяции) для А-20502 в комбинации с пембролизумабом.

[0181] Архивная опухолевая ткань (или свежая биопсия, полученная, если архивная ткань недоступна) может быть предварительно проверена на уровне экспрессии В7-Н4 (трансмембранный белок семейства В7, также известный как В7S1, В7х или VTCN1) с помощью иммуногистохимии (ИГХ) в центральной лаборатории для пациентов в фазе 1a определения дозы и фазе 1b применения ранее установленной максимальной переносимой дозы в расширенной популяции и для анализа биомаркеров.

[0182] В некоторых вариантах осуществления архивные опухолевые ткани и/или свежие биопсии предоставляются следующим образом:

Фаза 1a повышение дозы:

- Предоставление архивной опухолевой ткани (или свежей биопсии, полученной, если архивная ткань недоступна) для ретроспективного анализа биомаркеров для пациентов.

Фаза 1a определение дозы:

- Архивная опухолевая ткань для оценки уровней экспрессии В7-Н4 с помощью испытаний ИГХ, проведенных в центральной лаборатории для предварительного отбора и анализа биомаркеров; Свежая ткань биопсии будет использоваться для этого теста, если архивная ткань недоступна.
- Свежие биопсии будут использоваться во время скрининга и после лечения.

Фаза 1b применение ранее установленной максимальной переносимой дозы в расширенной популяции:

- Архивная опухолевая ткань для оценки уровня экспрессии В7-Н4 с помощью испытаний ИГХ, проведенных в центральной лаборатории для предварительного отбора и анализа биомаркеров; Свежую ткань биопсии использовали для этого теста, если архивная ткань недоступна.

- Свежие биопсии будут использоваться для подгруппы пациентов (например, не менее 10 пациентов на группу из 30 пациентов) во время скрининга и после лечения для расширенного фармакодинамического анализа.

[0183] Дополнительные сведения приведены ниже по каждой фазе исследования в разделах «Фаза 1a повышение дозы» и «Фаза 1b применение ранее установленной максимальной переносимой дозы в расширенной популяции» настоящего краткого содержания.

Фаза 1a вводная фаза для оценки безопасности (A-20502 в комбинации с пембролизумабом): По меньшей мере 3 пациента будут включены при максимальной переносимой дозе (МПД) и/или рекомендованной дозе (РД) A-20502 в качестве монотерапии в комбинации с 200 мг пембролизумаба Q3W и оценены на предмет ограничивающей дозу токсичности (ОДТ). Дополнительные пациенты, в общей сложности до 10 пациентов, могут проходить курс лечения с РД A-20502 и пембролизумаба. При необходимости доза A-20502 может быть уменьшена в соответствии с алгоритмом уменьшения дозы, описанным ниже. Предлагаемые уровни доз:

- 1aC1: A-20502 (РД) + пембролизумаб 200 мг в/в Q3W
- 1aC2: A-20502 (10 мг/кг) + пембролизумаб 200 мг в/в Q3W
- 1aC3: A-20502 (3 мг/кг) + пембролизумаб 200 мг в/в Q3W

Сокращения: в/в = внутривенно; Q3W = один раз в 3 недели; РД = рекомендуемая доза.

[0184] В некоторых вариантах осуществления указанная РД составляет 20 мг/кг. В исследовании монотерапии фазы 1a/1b у пациентов с солидными опухолями на поздней стадии, A-20502 хорошо переносился в дозах до 20 мг/кг без ограничивающей дозу токсичности. На основании фармакокинетических исследований пациентов в этом исследовании монотерапии фазы 1a/1b прогнозируется, что наблюдаемая минимальная концентрация A-20502 при РД 20 мг/кг достигнет $\geq 95\%$ насыщения рецепторов как для В7-Н4, так и для Fc γ Ша на основе аффинностей. A-20502 достигало дозозависимого воздействия при дозах $\geq 0,3$ мг/кг и имело период полувыведения 1-2 недели. Концентрация A-20502 в сыворотке при дозе 20 мг/кг была одинаковой во времени для разных типов опухолей (груди, яичников и эндометрия) и с пембролизумабом или без него.

[0185] В комбинированном исследовании могут использоваться другие уровни доз (например, 0,1, 0,3, 1 или 20 мг/кг), например, на основе безопасности, переносимости, объективного ответа, ФК и фармакодинамики, а также оценок эффективных воздействий, экстраполированных из доклинических данных. Например, можно использовать более низкие или промежуточные уровни доз А-20502 на основании данных о безопасности. Критерии ОДТ для комбинации А-20502 и пембролизумаба будут следующим:

[0186] ОДТ во время фазы 1а повышения дозы определяется как любое из следующих событий, независимо от их происхождения (за исключением событий, явно вызванных основным заболеванием или посторонними причинами):

- Любая негематологическая токсичность 3 степени или выше (за исключением тошноты, рвоты и диареи 3 степени), возникающая в течение 21 дня лечения.
- Тошнота, рвота, диарея 3 степени, длящиеся > 72 часов, несмотря на оптимальную поддерживающую терапию, возникающие в течение первых 21 дня лечения.
- Фебрильная нейтропения и/или задокументированная инфекция с абсолютным числом нейтрофилов (АЧК) $< 1,0 \times 10^9$ на л, нейтропения 4 степени, продолжающаяся более 7 дней, тромбоцитопения 4 степени ($< 25,0 \times 10^9$ на л) или тромбоцитопения 3 степени ($< 50,0 - 25,0 \times 10^9$ на л) с кровотечением в течение первых 21 дня лечения
- Аспартатаминотрансфераза/аланинтрансаминаза (АСТ/АЛТ) $> 3 \times$ верхняя граница нормы (ВГН) и одновременно общий билирубин $> 2 \times$ ВГН, не связанный с вовлечением печени в онкологическое заболевание
- Любой лабораторный показатель 4 степени независимо от клинических последствий
- Другие лабораторные показатели 3 степени, не имеющие клинического значения в соответствии с соглашением исследователя и спонсора, которые не исчезают в течение 72 часов.

Особые рекомендации по ОДТ для комбинации А-20502 и пембролизумаба

- Поскольку пембролизумаб является известным ингибитором иммунных контрольных точек и одним из предполагаемых механизмов действия А-20502 является блокада иммунных контрольных точек, при использовании этой комбинации ожидаются иммунные нежелательные явления (ИНЯ). ИНЯ определяется как клинически значимое НЯ, связанное с воздействием исследуемого лекарственного средства, неясной этиологии и соответствующее иммуноопосредованному механизму. Исходя

из этого, первое появление следующих ИНЯ не будет считаться ОДТ, потому что они ожидаются при иммунотерапии:

- Обострение опухоли 3 степени (определяется как местная боль, раздражение или сыпь, локализованные на участках известной или предполагаемой опухоли),
- Сыпь 3 степени
- Иммунное нежелательное явление 3 степени (ИНЯ), которое разрешилось до 1 степени или менее в течение 14 дней.
- Преходящее (разрешающееся в течение 6 часов от начала) НЯ 3 степени, связанное с инфузией

[0187] Повторное появление этих событий (за исключением обострения опухоли 3 степени) у одного и того же или у другого пациента будет считаться ОДТ.

[0188] Интервал оценки ОДТ начинается в первый день лечения после начала инфузии и продолжается в течение 21 дня. Алгоритм, описанный в таблице ниже, будет применяться для принятия решения о дозировке. Доза А-20502 может быть снижена по мере необходимости в ответ на ОДТ. МПД и/или РД А-20502 в комбинации с пембролизумабом будут дозой, при которой $\leq 1/3$ -6 пациентов сталкиваются с ОДТ.

Алгоритм принятия решений о снижении дозы для вводной фазы для оценки безопасности А-20502 в комбинации с пембролизумабом в фазе 1a:

Количество пациентов с ОДТ при заданном уровне дозы	Правило принятия решения о дозировке
0/3	Продолжите регистрацию до 10 пациентов на этом уровне дозы для дополнительной оценки безопасности
1/3	Включите 3 дополнительных пациента с текущим уровнем дозы (текущая когорта)
$\geq 2/3$	Прекратите регистрацию в текущей когорте и снизите дозу А-20502 на один уровень ниже текущей дозы
1/6	Продолжите регистрацию до 10 пациентов на этом уровне дозы.

$\geq 2/6$	Прекратите регистрацию в текущей когорте и снизите дозу А-20502 на один уровень ниже текущей дозы
------------	---

Фаза 1b расширение когорты комбинации:

[0189] Фаза 1b может состоять из когорт, проспективно идентифицированных как имеющих экспрессию В7-Н4 с помощью ИГХ. В некоторых вариантах осуществления будет две когорты А-20502 в комбинации с пембролизумабом в следующих выбранных типах опухолей:

- **Когорта 1bC1:** TNBC (А-20502 в комбинации с пембролизумабом)
- **Когорта 1bC2:** Рак яичников (А-20502 в комбинации с пембролизумабом)

В другом варианте осуществления комбинация фазы 1b имеет одну исходную когорту, и другие когорты, такие как TNBC, могут быть впоследствии включены в исследование фазы 1b:

- **Когорта 1bC1:** рак яичников (А-20502 в комбинации с пембролизумабом)

[0190] В некоторых вариантах осуществления может быть добавлено до 3 дополнительных когорт комбинации.

[0191] На основании появляющихся доступных клинических и трансляционных данных из исследования, когорты для дополнительных типов опухолей, подлежащих лечению с помощью А-20502 в комбинации с пембролизумабом, могут быть открыты во время исследования (например, 30 пациентов или меньше в любой отдельной когорте).

Дозировка: В определенных вариантах осуществления А-20502 будет вводиться в виде единственного агента в виде 60-минутной (± 5 минут) в/в инфузии Q3W в 1 день каждого 21-дневного цикла. Доза А-20502 будет зависеть от массы тела в 1 день 1 цикла (C1D1). После 1 цикла доза А-20502 будет пересчитываться при каждом посещении для инфузии, только если масса пациента изменилась на $> 10\%$ по сравнению с 1 циклом 1 дня.

[0192] Пембролизумаб будет вводиться после завершения внутривенной инфузии А-20502 в дозе 200 мг путем внутривенной инфузии в течение 30 минут (± 5 минут), начиная с 1 цикла 1 дня и повторяя Q3W в 1 день каждого 21-дневного цикла.

[0193] Не существует заранее определенного максимального количества доз А-20502 в комбинации с пембролизумабом. Пациенты могут продолжать получать оба

лекарственных средства в комбинации в соответствии с их когортой/дозой, указанной в исследовании, до тех пор, пока исследователь не оценит прогрессирование заболевания или пока пациент не будет соответствовать любому из других критериев отмены, определенных протоколом. Если пациент прекращает прием одного из двух лекарственных средств, он может продолжать принимать только другое лекарство.

[0194] Лечение после прогрессирования заболевания может быть разрешено пациентам с прогрессирующим заболеванием в соответствии с критериями оценки ответа на солидные опухоли версии 1.1 (RECIST v1.1), если оценка пользы/риска способствует продолжению назначения исследуемого лечения (например, если пациенты продолжают испытывать клинические проявления пользы по оценке исследователя и переносимость лечения).

Продолжительность лечения: Продолжительность исследования для отдельного пациента включает скрининг (до 28 дней), лечение и период последующего наблюдения в конце лечения (КЛ), который будет включать посещения через около 28 ($\pm$ 7) дней и 100 ($\pm$ 7) дней. после последней дозы. Поскольку все пациенты имеют право на лечение до прогрессирования заболевания, фактическая продолжительность лечения для каждого отдельного пациента будет варьироваться в зависимости от ожидаемого времени до прогрессирования для соответствующего типа опухоли.

[0195] Кроме того, пациенты, включенные в Фазу 1b увеличения дозы, будут отслеживаться на предмет выживаемости (LTFU, включая сканирование и статус выживаемости Q12W) в течение до 2 лет.

Количество пациентов: Количество пациентов, запланированных для этого исследования, оценивается следующим образом, но это количество может быть скорректировано при необходимости.

[0196] В Фазу 1a могут быть включены от 6 до 22 пациентов или от 10 до 22 пациентов, которые получают А-20502 в комбинации с пембролизумабом в рамках вводной фазы для оценки безопасности. Одна или две дополнительные когорты, оценивающие А-20502 в комбинации с пембролизумабом, будут включены, например, с 30 пациентами или меньше.

Критерии включения:

Критерии включения: Фаза 1a критерии включения

[0197] Критерии включения пациентов в **Фазу 1a** следующие:

- 1) Гистологически подтвержденные солидные опухоли, за исключением опухолей первичной центральной нервной системы (ЦНС).

- 2) Неоперабельное, местнораспространенное или метастатическое заболевание.
- 3) Способность понимать и подписывать форму информированного согласия (ФИС), одобренную институциональным контрольным советом/независимым этическим комитетом (IRB/IEC), до проведения любой оценки конкретного исследования.
- 4) Пациенты должны быть невосприимчивыми или не могущими переносить существующую терапию(и), которая, как известно, приносит клиническую пользу для их состояния.
- 5) Все пациенты должны иметь по крайней мере одно поддающееся измерению поражение на исходном уровне в соответствии с RECIST v1.1; участки опухоли, расположенные в ранее облученной области или в области, подвергнутой другой локорегиональной терапии, не считаются измеряемыми, если не было продемонстрировано прогрессирование поражения.
- 6) Адекватная стадия вымывания для предшествующей противораковой терапии (т.е. ≥ 5 периодов полувыведения или 4 недели с момента последней дозы, в зависимости от того, что короче).
- 7) Наличие архивной опухолевой ткани и согласие на предоставление архивной опухоли для ретроспективного анализа биомаркеров, или пациенту необходимо пройти свежую биопсию опухоли во время скрининга, если архивная ткань недоступна (биопсия требуется для пациентов в части определения дозы Фазы 1a).
- 8) Возраст ≥ 18 лет на момент подписания ФИС.
- 9) Статус по шкале Восточной совместной онкологической группы (ECOG) 0 или 1.
- 10) Ожидаемая продолжительность жизни не менее 3 месяцев по мнению исследователя.
- 11) Готовы и способны соблюдать все процедуры исследования.
- 12) Предварительная лучевая терапия должна быть завершена как минимум за 2 недели до первой дозы исследуемого лекарственного средства.
- 13) Прием предыдущих радиофармацевтических лекарственных средств (например, стронций, самарий) должен быть завершен как минимум за 8 недель до первой дозы исследуемого лекарственного средства.

- 14) Предшествующая операция, требующая общей анестезии, должна быть завершена как минимум за 1 неделю до введения первой дозы исследуемого лекарственного средства. Операция, требующая местной/эпидуральной анестезии, должна быть завершена как минимум за 72 часа до введения первой дозы исследуемого лекарственного средства. Пациенты должны восстановиться после любой операции.
- 15) Значения скрининговых лабораторий анализов должны соответствовать следующим критериям:

Гематологические

- a. Нейтрофилы ≥ 1200 клеток/мкл
- b. Тромбоциты $\geq 75 \times 10^3$ /мкл
- c. Гемоглобин (Hb) $\geq 9,0$ г/дл

Почечные:

Сывороточный креатинин $< 1,5 \times \text{ВГН}$ или клиренс креатинина (CrCl) от ≥ 40 мл/мин (с использованием Формулы Коккрофта/Голта)

Женский	$(140 - \text{возраст в годах}) \times (\text{масса в кг}) \times 0,85$
CrCl	$\frac{72 \times (\text{креатинин сыворотки в мг/дл})}{72 \times (\text{креатинин сыворотки в мг/дл})}$
Мужской	$(140 - \text{возраст в годах}) \times (\text{масса в кг})$
CrCl	$\frac{72 \times (\text{креатинин сыворотки в мг/дл})}{72 \times (\text{креатинин сыворотки в мг/дл})}$

Печеночные:

- d. АСТ и АЛТ $\leq 3 \times \text{ВГН}$ (разрешены АСТ и АЛТ $< 5 \times \text{ВГН}$ у пациентов с метастазами в печени)
 - e. Билирубин $< 1,5 \times \text{ВГН}$ (за исключением пациентов с синдромом Жильбера, у которых общий билирубин должен быть < 3 мг/дл)
- 16) Отрицательный результат теста на беременность на β -хорионический гонадотропин человека (β -ХГЧ) в сыворотке крови ≤ 96 часов до лечения в 1 цикле 1 дне (только для женщин детородного возраста).

17) У сексуально активных пациентов (женщины детородного возраста и мужчины) готовность использовать 2 эффективных метода контрацепции, из которых 1 должен быть методом физического барьера (презерватив, диафрагма или шейный/сводчатый колпачок) в течение 6 месяцев после последней дозы А-20502. Другие эффективные формы контрацепции включают в себя:

- ◆ Постоянная стерилизация (гистерэктомия и/или двусторонняя овариэктомия, двусторонняя перевязка маточных труб с хирургическим вмешательством или вазэктомия) не менее чем за 6 месяцев до скрининга.
- ◆ Женщины детородного возраста, которые получают стабильную пероральную контрацептивную терапию, внутриматочную спираль или имплантат не менее 90 дней до исследования или воздерживаются от половых сношений как образа жизни.

Критерии включения в фазу 1b следующие:

- 18) Все критерии включения для фазы 1a (исключение: Критерий включения №1).
- 19) Положительный результат на экспрессию В7-Н4 в архивном или свежем образце опухоли, что было оценено сопровождающим валидированным ИГХ анализом в центральной лаборатории.
- 20) Допускается наличие в анамнезе других злокачественных новообразований при условии, что они прошли окончательное лечение без признаков рецидива в течение последних 2 лет (исключение: разрешено окончательное лечение немеланомного рака кожи, лобулярного рака in situ и рака шейки матки in situ в течение 2 лет).

Дополнительные критерии включения для конкретных когорт для фазы 1b

Когорта 1bC1 рак яичников:

- Гистологически или цитологически подтвержденный диагноз рецидивирующей карциномы эпителия яичников, карциномы первичной брюшины или карциномы маточной трубы, не поддающейся лечению существующей терапией(ями), которая, как известно, обеспечивает клиническую пользу
- Прогрессирующее заболевание на фоне или после как минимум двух предшествующих схем лечения, включая как минимум одну платиносодержащую схему, или непереносимость дополнительной химиотерапии

- Отсутствие предшествующей терапии лекарственными средствами, направленными против PD1 или PD-L1.

Когорта 1bC2 TNBC:

- Гистологически или цитологически подтвержденный метастатическое TNBC
- По меньшей мере, две предыдущие линии системной химиотерапии, по меньшей мере, одна из которых применялась при метастатическом состоянии
- Отсутствие предшествующей терапии лекарственными средствами, направленными против PD1 или PD-L1.

Критерии включения: Критерии исключения (Фаза 1a и Фаза 1b)

[0198] Пациенты, соответствующие любому из следующих критериев, могут быть исключены:

- 1) Иммуносупрессивные дозы системных лекарственных средств, такие как стероиды или абсорбированные топические стероиды (дозы ≥ 10 мг /день преднизона или его эквиваленты ежедневно) должны быть прекращены по меньшей мере за 2 недели до первой дозы исследуемого лекарственного средства. Разрешены короткие курсы высоких доз стероидов, непрерывные низкие дозы (преднизон <10 мг/день), ингаляционные, интраназальные, внутриглазные и совместные инъекции стероидов.
- 2) Снижение сердечной функции по шкале Нью-Йоркской кардиологической ассоциацией (NYHA) до > 2 класса при скрининге.
- 3) Неконтролируемое или серьезное заболевание сердца, такое как нестабильная стенокардия.
- 4) Интервал QT с поправкой на частоту сердечных сокращений (QTc) согласно руководящим принципам учреждения > 450 мс для мужчин или > 470 мс для женщин при скрининге.
- 5) История наличия антител к лекарственным препаратам (ADA), тяжелой аллергической, анафилактической или другой реакции, связанной с инфузией, на предыдущий биологический агент.
- 6) Известная гиперчувствительность к любому компоненту композиции исследуемого продукта (ИП) и/или к пембролизумабу.

- 7) Вакцины (например, вакцина против вируса папилломы человека [ВПЧ]) в течение 4 недель до первой дозы исследуемого лекарственного средства. Инактивированная вакцина против сезонного гриппа может вводиться пациентам до лечения и во время лечения без ограничений. Вакцины против гриппа, содержащие живой вирус, или другие вакцины против инфекционных заболеваний (например, пневмовакс, ветряная оспа и т. д.) по клиническим показаниям могут быть разрешены, но должны быть согласованы с медицинским наблюдателем спонсора и могут потребовать периода вымывания исследуемого лекарственного средства до и после введения вакцины.
- 8) Текущая неразрешенная инфекция или история хронической, активной, клинически значимой инфекции (вирусной, бактериальной, грибковой или другой), которая, по мнению исследователя, может препятствовать контакту пациента с биологическим агентом или может представлять риск для безопасности пациента.
- 9) Пациенты с аномальными химическими показателями сыворотки, которые, по мнению исследователя, считаются клинически значимыми. Сюда входят пациенты, у которых проявляются клинические признаки и симптомы, связанные с аномальными химическими показателями сыворотки, а также пациенты, у которых химические показатели сыворотки бессимптомные, но клинически значимые, по мнению исследователя (например, гипокалиемия или гипонатриемия).
- 10) Любое неконтролируемое заболевание или психическое расстройство, которое, по мнению исследователя, может представлять риск для безопасности пациента или мешать участию в исследовании или интерпретации результатов отдельных пациентов.
- 11) Беременные или кормящие грудью.
- 12) Активное, известное или подозреваемое аутоиммунное заболевание, требующее лечения в последние 2 года. К участию допускаются пациенты с сахарным диабетом I типа, гипотиреозом, требующим только заместительной гормональной терапии, кожными заболеваниями (такими как витилиго, псориаз или алопеция), не требующими системного лечения, или состояниями, повторение которых не ожидается при отсутствии внешнего триггера.
- 13) Известная история положительных результатов тестирования на вирус иммунодефицита человека (ВИЧ) 1 или 2 или известный синдром приобретенного иммунодефицита (СПИД).

- 14) Положительный результат тестирования на вирус гепатита В с тестом на поверхностный антиген вируса гепатита В (HBsAg) или обнаружение рибонуклеиновой кислоты вируса гепатита С (РНК HCV) указывающие на острую или хроническую инфекцию.
- 15) Продолжающиеся нежелательные явления от предшествующего лечения > 1 степени (за исключением алопеции 2 степени или периферической невропатии) на основании общих терминологических критериев нежелательных явлений (CTCAE) Национального института рака (NCI).
- 16) Симптоматическое интерстициальное заболевание легких или воспалительный пневмонит.
- 17) Не леченые или активные ЦНС или лептоменингеальные метастазы. Пациенты имеют право на участие в исследовании, если метастазы были излечены, и пациенты неврологически вернулись к исходному уровню или неврологически стабильны (за исключением остаточных признаков или симптомов, связанных с лечением ЦНС), по меньшей мере, за 2 недели до первой дозы исследуемого лекарственного средства.
- 18) Признаки коагулопатии или кровоточащего диатеза. Допускаются пациенты, получающие стабильные терапевтические дозы антикоагулянтов.
- 19) Переливание крови или тромбоцитов завершено за 72 часа до первой дозы исследуемого лекарственного средства.
- 20) Любое неконтролируемое воспалительное заболевание ЖКТ, включая болезнь Крона и язвенный колит.

Испытания и наблюдения: Оценка безопасности включает оценку показателей жизненно важных функций, массу тела, физический осмотр, оценку ECOG, лабораторные тесты (гематология, химический анализ сыворотки и анализ мочи), электрокардиограммы (ЭКГ) и мониторинг нежелательных явлений (НЯ) и сопутствующих лекарств.

[0199] Архивная опухолевая ткань и согласие предоставить архивную опухоль (или готовность пройти свежую биопсию опухоли во время скрининга) будут собраны для анализа биомаркеров, чтобы изучить взаимосвязь между исходными уровнями мишени, иммунным фенотипом опухоли и фармакодинамическим ответом.

[0200] Опухолевая ткань до и после лечения может быть собрана у всех пациентов в Фазе 1a определение дозы и у подгруппы пациентов (до 15 пациентов на когорту из 30

пациентов) в Фазе 1b применение ранее установленной максимальной переносимой дозы в расширенной популяции для расширенного фармакодинамического анализа.

[0201] Оценка эффективности может состоять из рентгенографии, выполняемой каждые 6 недель. Ответы будут оцениваться согласно RECIST v1.1.

Статистические методы:

Анализ эффективности

[0202] ЧОО может быть суммировано по частотам и процентам с 90% доверительным интервалом (ДИ) для каждой дозы/когорты. Продолжительность ответа (DOR) для пациентов с полным ответом (ПО) и частичным ответом (ЧО) может быть суммирована с числом ответивших, числом и процентом событий/цензурованных данных, а также оценкой медианы DOR по Каплану-Мейеру с 95% ДИ. Выживаемость без прогрессирования (ВБП) для пролеченных пациентов можно суммировать с числом и процентом пациентов с ВБП по каждой дозе/когорте. ВБП также можно суммировать с использованием метода Каплана-Мейера с 95% ДИ. ЧОО, DOR и ВБП можно определить с помощью RECIST v1.1.

Фармакокинетический анализ

[0203] Индивидуальные и средние ($\pm$ СОС) данные концентрация А-20502 в сыворотке-время могут быть сведены в таблицу и нанесены на график по уровню дозы/когорте. Параметры ФК могут быть сведены в таблицу и суммированы по уровню дозы/когорте, когда это необходимо и применимо. Влияние иммуногенности на воздействие А-20502 может быть оценено, сведено в таблицу и суммировано по уровню дозы/когорте, если позволяют данные. Индивидуальные и средние ($\pm$ СОС) $C_{\max}$ и $C_{\text{остаточная}}$ данные концентрация пембролизумаба в сыворотке-время могут быть сведены в таблицу и нанесены на график по когорте. Параметры ФК, такие как коэффициент накопления и достижение равновесного состояния, могут быть сведены в таблицу и суммированы по уровню дозы/когорте, если данные доступны.

Анализ иммуногенности

[0204] Исходный ADA-положительный субъект определяется как субъект, у которого на исходном уровне присутствует ADA-положительный образец. ADA-положительный субъект представляет собой субъекта с по меньшей мере одним ADA-положительным образцом относительно исходного уровня после начала лечения. Распределение частот исходных ADA-положительных субъектов и ADA-положительных субъектов после начала лечения можно суммировать для А-20502 и пембролизумаба, соответственно.

Фармакодинамический анализ

[0205] Выбранные фармакодинамические биомаркеры будут оцениваться на предмет значимых изменений между образцами опухоли и периферической крови до и после лечения.

* * *

[0206] Объем настоящего изобретения не ограничивается описанными в данном документе конкретными вариантами осуществления. Действительно, различные модификации настоящего изобретения в дополнение к описанным будут очевидны специалистам в данной области техники из вышеуказанного описания и сопроводительных фигур. Подразумевается, что такие модификации входят в объем прилагаемой формулы изобретения.

[0207] Все ссылки (*например*, публикации, патенты или патентные заявки), процитированные в настоящем документе, включены в настоящий документ в качестве ссылки во всей своей полноте и для всех целей в той же степени, как если бы каждая отдельная ссылка (*например*, публикация, патент или заявка на патент) была конкретно и индивидуально указана, как должная быть включенной в качестве ссылки во всей своей полноте для всех целей.

[0208] Другие варианты осуществления находятся в пределах следующих пунктов формулы изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ лечения солидной опухоли у субъекта-человека, включающий введение субъекту (i) от около 0,1 до около 20 мг/кг антитела к B7-H4 или его антигенсвязывающего фрагмента, которое специфически связывается с B7-H4 и содержит определяющую комплементарность область (CDR) 1 вариабельной области тяжелой цепи (VH), содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 5, VH CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 6, VH CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 7, CDR1 вариабельной области легкой цепи (VL), содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 8, VL CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 9, и VL CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 10; и (ii) около 200 мг антитела к PD-1 или его антигенсвязывающего фрагмента, содержащего VH CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 34, VH CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 35, VH CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 36, VL CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 37, VL CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 38, и VL CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 39.

2. Способ лечения солидной опухоли у субъекта-человека, включающий введение субъекту
 - (a) фармацевтической композиции, содержащей (i) антитела к B7-H4 или их антигенсвязывающие фрагменты, причем антитела к B7-H4 или их антигенсвязывающие фрагменты специфически связываются с B7-H4 человека и содержат VH CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 5, VH CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 6, VH CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 7, VL CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 8,

VL CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 9, и VL CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 10, и (ii) фармацевтически приемлемый наполнитель,

при этом по меньшей мере 95% антител к B7-H4 или их антигенсвязывающих фрагментов в композиции являются афукозилированными, и

при этом вводят от около 0,1 до около 20 мг/кг антител или их антигенсвязывающих фрагментов; и

(b) фармацевтической композиции, содержащей антитело к PD-1 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее VH CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 34, VH CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 35, VH CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 36, VL CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 37, VL CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 38 и VL CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 39, и фармацевтически приемлемый наполнитель, при этом вводят около 200 мг антитела или антигенсвязывающего фрагмента.

3. Способ по пп. 1 или 2, в котором субъекту вводят около 20 мг/кг антитела к B7-H4 или его антигенсвязывающего фрагмента.
4. Способ по пп. 1 или 2, в котором субъекту вводят около 10 мг/кг антитела к B7-H4 или его антигенсвязывающего фрагмента.
5. Способ по пп. 1 или 2, в котором субъекту вводят около 3 мг/кг антитела к B7-H4 или его антигенсвязывающего фрагмента.
6. Способ по пп. 1 или 2, в котором субъекту вводят около 1 мг/кг антитела к B7-H4 или его антигенсвязывающего фрагмента.
7. Способ по пп. 1 или 2, в котором субъекту вводят около 0,3 мг/кг антитела к B7-H4 или его антигенсвязывающего фрагмента.
8. Способ по пп. 1 или 2, в котором субъекту вводят около 0,1 мг/кг антитела к B7-H4

или его антигенсвязывающего фрагмента.

9. Способ по любому из пп. 1-8, в котором антитело к B7-H4 или его антигенсвязывающий фрагмент, и антитело к PD-1 или его антигенсвязывающий фрагмент вводят одновременно.
10. Способ по п. 9, в котором антитело к B7-H4 или его антигенсвязывающий фрагмент, и антитело к PD-1 или его антигенсвязывающий фрагмент вводят в виде отдельных составов в один и тот же день.
11. Способ по любому из пп. 1-8, в котором антитело к B7-H4 или его антигенсвязывающий фрагмент, и антитело к PD-1 или его антигенсвязывающий фрагмент вводят последовательно.
12. Способ по п. 8, в котором антитело к PD-1 или его антигенсвязывающий фрагмент вводят после антитела к B7-H4 или его антигенсвязывающего фрагмента.
13. Способ по любому из пп. 1-12, в котором антитело к B7-H4 или его антигенсвязывающий фрагмент вводят приблизительно один раз в три недели.
14. Способ по любому из пп. 1-12, в котором антитело к PD-1 или его антигенсвязывающий фрагмент вводят приблизительно один раз в три недели.
15. Способ по любому из пп. 1-12, в котором антитело к B7-H4 или его антигенсвязывающий фрагмент, и антитело к PD-1 или его антигенсвязывающий фрагмент, каждый, вводят приблизительно один раз в три недели.
16. Способ по любому из пп. 1-15, в котором антитело к B7-H4 или его антигенсвязывающий фрагмент вводят внутривенно.
17. Способ по любому из пп. 1-16, в котором антитело к PD-1 или его антигенсвязывающий фрагмент вводят внутривенно.
18. Способ по любому из пп. 1-17, в котором B7-H4 был обнаружен в солидной опухоли с использованием иммуногистохимии (ИГХ) до введения.

19. Способ по любому из пп. 1-18, в котором антитело к B7-H4 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит VH, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 11, и/или VL, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 12.
20. Способ по любому из пп. 1-19, в котором антитело к B7-H4 или антигенсвязывающий фрагмент содержит константную область тяжелой цепи и/или константную область легкой цепи.
21. Способ по п. 20, в котором константная область тяжелой цепи представляет собой константную область тяжелой цепи иммуноглобулина IgG₁ человека и/или при этом константная область легкой цепи представляет собой константную область легкой цепи иммуноглобулина IgG_k человека.
22. Способ по любому из пп. 1-21, в котором антитело к B7-H4 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит константную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 25, и/или константную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 23.
23. Способ по любому из пп. 1-22, в котором антитело к B7-H4 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 21, и/или легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 22.
24. Способ по любому из пп. 1-23, в котором антитело к B7-H4 или его антигенсвязывающий фрагмент представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент.
25. Способ по любому из пп. 1 и 3-24, в котором антитело к B7-H4 или его антигенсвязывающий фрагмент является афукозилированным.
26. Способ по любому из пп. 1-25, в котором антитело к B7-H4 или его

антигенсвязывающий фрагмент представляет собой полноразмерное антитело.

27. Способ по любому из пп. 1-25, в котором антитело к B7-H4 или его антигенсвязывающий фрагмент представляет собой антигенсвязывающий фрагмент.
28. Способ по п. 27, в котором антигенсвязывающий фрагмент содержит Fab, Fab', F(ab')₂, одноцепочечный Fv (scFv), дисульфидносвязанный Fv, домен V-NAR, IgNar, интратело, IgGΔCH2, минитело, F(ab')₃, тетратело, триатело, диатело, однодоменное антитело, DVD-Ig, Fcab, mAb², (scFv)₂ или scFv-Fc.
29. Способ по любому из пп. 2-29, в котором уровень фукозилирования антитела к B7-H4 или его антигенсвязывающего фрагмента не поддается определению в композиции.
30. Способ по любому из пп. 1-29, в котором антитело к PD-1 или антигенсвязывающий фрагмент содержит VH, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 32, и VL, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 33.
31. Способ по любому из пп. 1-30, в котором антитело к PD-1 или его антигенсвязывающий фрагмент представляет собой пембролизумаб.
32. Способ по п. 31, в котором способ включает введение 200 мг пембролизумаба.
33. Способ по любому из пп. 1-32, включающий введение субъекту (i) 3, 10 или 20 мг/кг антитела к B7-H4 или его антигенсвязывающего фрагмента, которое специфически связывается с B7-H4 человека и содержит VH, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 11, и VL, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 12, причем уровень фукозилирования антитела к B7-H4 или антигенсвязывающего фрагмента не поддается определению; и (ii) 200 мг пембролизумаба; при этом (i) и (ii) вводят внутривенно в виде отдельных составов в один и тот же день.
34. Способ по п. 33, в котором антитело к B7-H4 содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 21, и легкую цепь,

содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 22.

35. Способ по любому из пп. 1–34, в котором солидная опухоль экспрессирует B7-H4.
36. Способ по любому пп. 1-35, в котором солидная опухоль является неоперабельной, локально-распространенной или метастатической.
37. Способ по любому из пп. 1-36, в котором солидная опухоль выбрана из группы, состоящей из рака молочной железы, протоковой карциномы, карциномы эндометрия, рака яичников, уротелиального рака, немелкоклеточного рака легкого, рака поджелудочной железы, рака щитовидной железы, рака почки и рака мочевого пузыря.
38. Способ по п. 37, в котором солидная опухоль представляет собой рак молочной железы или рак яичников.
39. Способ по п. 38, в котором солидная опухоль представляет собой рак молочной железы.
40. Способ по п. 39, в котором солидная опухоль представляет собой распространенный рак молочной железы.
41. Способ по любому из пп. 38-40, в котором рак молочной железы представляет собой трижды негативный рак молочной железы.
42. Способ по любому из пп. 38-40, в котором рак молочной железы представляет собой рак молочной железы, положительный в отношении рецепторов гормонов (HR).
43. Способ по п. 37, в котором немелкоклеточный рак легкого представляет собой плоскоклеточный рак.
44. Способ по любому из пп. 1–43, в котором пациент ранее не получал терапию антагонистом PD-1/PD-L1.
45. Способ по любому из пп. 1-44, в котором способ дополнительно включает

осуществление мониторинга за числом иммунных клеток в опухоли.

46. Способ по любому из пп. 1-44, в котором способ дополнительно осуществление мониторинга за числом естественных клеток-киллеров (NK), клеток CD4⁺ и/или клеток CD8⁺ в опухоли.
47. Способ по любому из пп. 1-47, в котором способ дополнительно включает осуществление мониторинга за уровнями цитокинов у субъекта.
48. Способ по любому из пп. 1-47, в котором способ дополнительно включает осуществление мониторинга за уровнями IL-2, IL-6, IL-10, TNF и/или гамма-интерферона (IFN γ) у субъекта.
49. Способ лечения солидной опухоли у субъекта-человека, включающий введение субъекту (i) около 20 мг/кг антитела к B7-H4, которое специфически связывается с B7-H4 человека и содержит VH, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 11 и VL, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 12; и (ii) около 200 мг антитела к PD-1, содержащего VH, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 32, и VL, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 33, причем антитело к B7-H4 и антитело к PD-1 вводят внутривенно приблизительно один раз в три недели.
50. Способ лечения солидной опухоли у субъекта-человека, включающий введение субъекту

(a) фармацевтической композиции, содержащей (i) антитела к B7-H4, которые специфически связываются с B7-H4 человека и содержат VH, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 11, и VL, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 12 и (ii) фармацевтически приемлемый наполнитель,

причем по меньшей мере 95% антител к B7-H4 в композиции являются афукозилированными, и

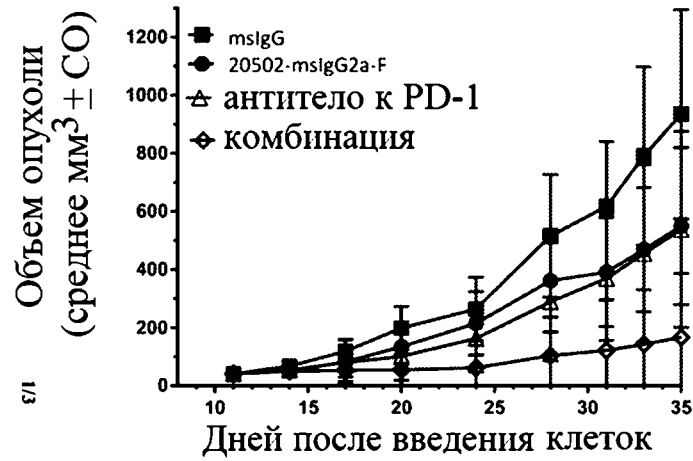
при этом вводят около 20 мг/кг антител; и

(b) фармацевтической композиции, содержащей антитело к PD-1 или его

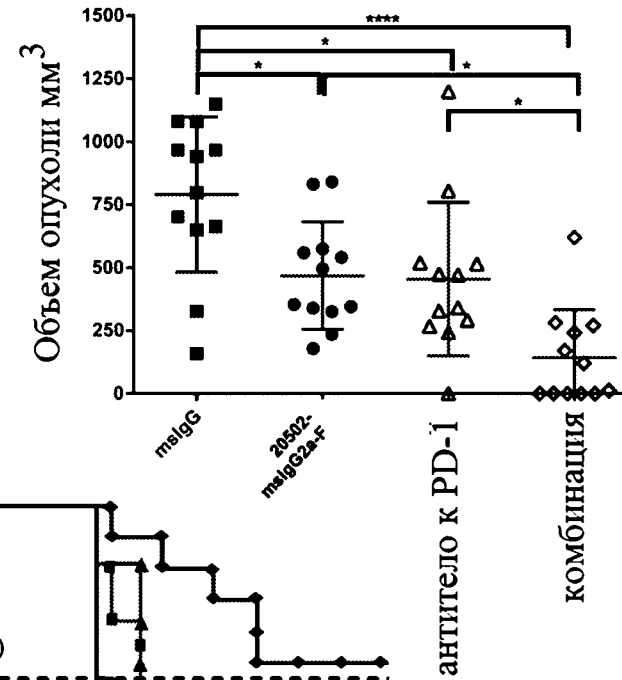
антигенсвязывающий фрагмент, содержащий VH, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 32, и VL, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 33 и фармацевтически приемлемый наполнитель, причем вводят около 200 мг антитела или антигенсвязывающего фрагмента, при этом антитело к B7-H4 и антитело к PD-1 вводят внутривенно около одного раза в три недели.

51. Способ по пп. 49 или 50, в котором антитело к B7-H4 содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 21, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 22.
52. Способ по любому из пп. 49-51, в котором антитело к PD-1 содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 30, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 31.
53. Способ по любому из пп. 49-53, в котором солидная опухоль представляет собой рак молочной железы, необязательно, при этом рак молочной железы представляет собой трижды негативный рак молочной железы или рак яичников.

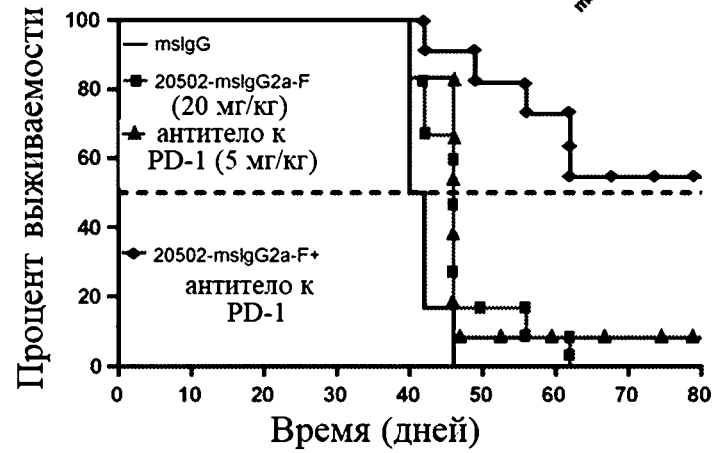
Фиг. 1А Рост опухоли 4Т1-моВ7Н4/Н3

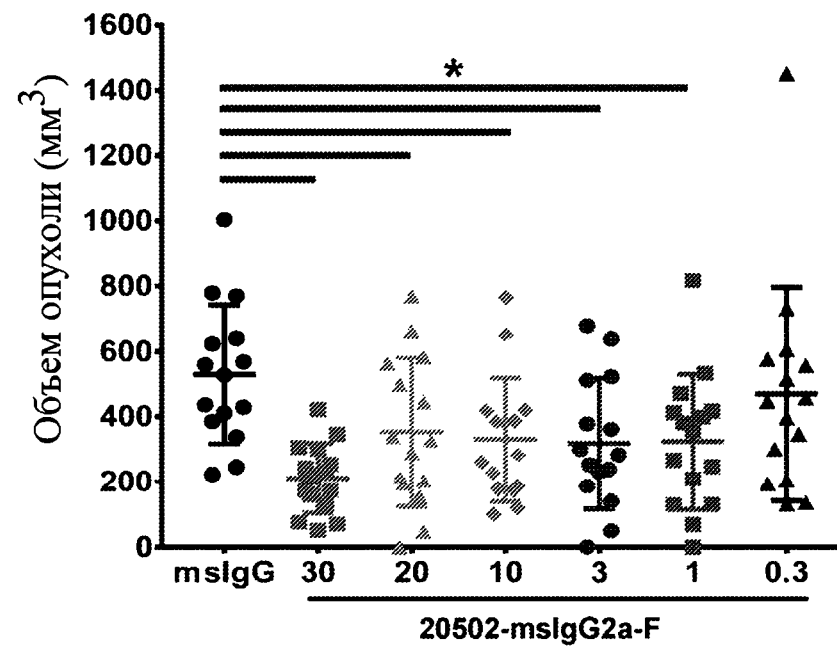


Фиг. 1В Объемы опухолей 33 день

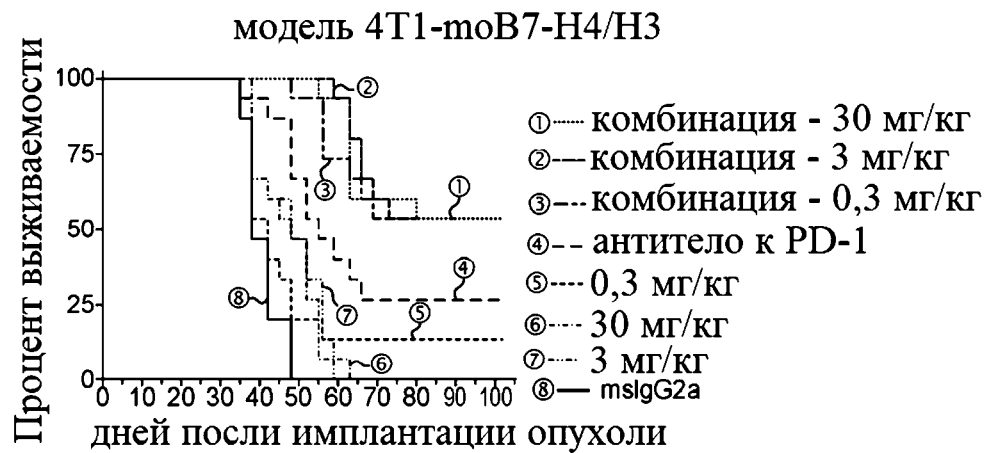
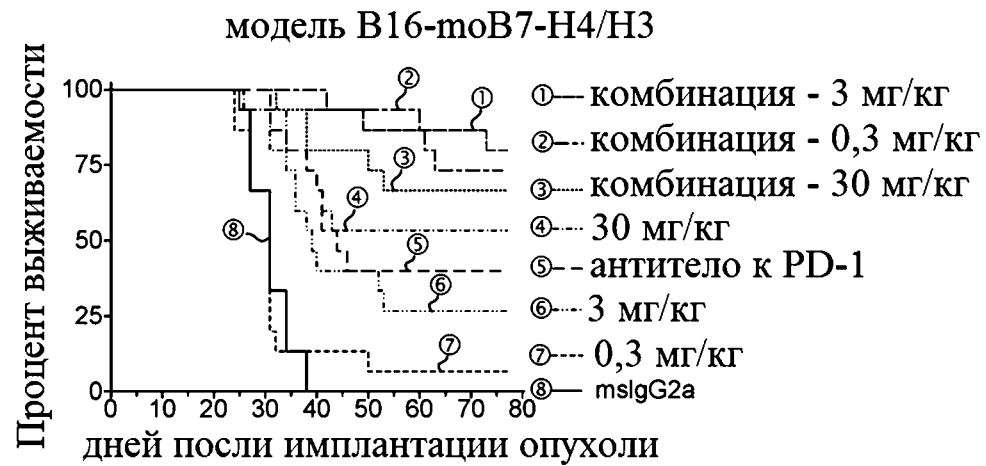


Фиг. 1С





Фиг. 2



Фиг. 3