

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **043376**

(13) **B1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.05.22

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

(21) Номер заявки
202091747

(22) Дата подачи заявки
2019.02.21

(54) **СОСТАВЫ АНТИТЕЛА В7-Н4**

(31) **62/633,537**

(32) **2018.02.21**

(33) **US**

(43) **2021.02.10**

(86) **PCT/US2019/018965**

(87) **WO 2019/165077 2019.08.29**

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

(72) Изобретатель:
**Цюань Юн, Хуан Чин-Йи, Ганда
Харджит Сингх (US)**

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

(56) **WO-A1-2016040724**

US-A1-2006088523

CHRIS CHUMSAE ET AL.: "Discovery of a Chemical Modification by Citric Acid in a Recombinant Monoclonal Antibody", ANALYTICAL CHEMISTRY, vol. 86, no. 18, 27 August 2014 (2014-08-27), pages 8932-8936, XP55591805, US ISSN: 0003-2700, DOI: 10.1021/ac502179m page 8935 abstract

(57) В настоящем изобретении предложены фармацевтические композиции, содержащие антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связываются с В7-Н4 человека (и, необязательно, В7-Н4 яванского макака, мыши и/или крысы). В настоящем изобретении также предложены способы лечения расстройств, таких как рак, путем введения таких фармацевтических композиций.

B1

043376

043376

B1

1. Область техники

В настоящем документе предлагаются фармацевтические композиции, содержащие антитела к B7-N4, и способы применения таких составов.

2. Уровень техники

B7-N4 (также известный как B7х, B7-S1 и VTCN1) представляет собой иммунорегулирующую молекулу, которая разделяет гомологию с другими членами семейства B7, включая PD-L1. Это трансмембранный белок типа I, состоящий из эктодоменов как IgV, так и IgC. В то время как экспрессия B7-N4 в здоровых тканях относительно ограничена на уровне белка, B7-N4 экспрессируется в нескольких солидных опухолях, таких как гинекологические карциномы молочной железы, яичника и эндометрия. Экспрессия B7-N4 в опухолях имеет тенденцию к корреляции с неблагоприятным прогнозом. Рецептор B7-N4 неизвестен, но считается, что он экспрессируется на поверхности Т-клеток. Считается, что B7-N4 непосредственно ингибирует активность Т-клеток.

Учитывая экспрессию и функцию B7-N4, антител, которые специфически связываются с B7-N4, разрабатываются для терапии, включающей модуляцию B7-N4, например, для лечения рака. Соответственно, существует необходимость в фармацевтических композициях, содержащих антитела к B7-N4 и их антигенсвязывающие фрагменты, для введения в таких способах лечения.

3. Сущность изобретения

В настоящем документе предлагаются фармацевтические композиции, содержащие антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который специфически связывается с B7-N4 человека.

В определенных аспектах фармацевтическая композиция состоящая из (i) антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, который специфически связывается с B7-N4 человека, (ii) буфер, выбранный из группы, состоящей из ацетатного или цитратного буфера, и (iii) сахар, при этом pH композиции составляет от около 4,5 до около 6 или от 4,5 до 6.

В определенных аспектах антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит CDR 20502.

В определенных аспектах фармацевтическая композиция содержит (i) антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который специфически связывается с B7-N4 человека и содержит CDR 20502, (ii) буфер и (iii) pH композиции составляет от около 4,5 до около 6 или от 4,5 до 6.

В определенных аспектах CDR 20502 представляют собой CDR, определенные по Кабату, CDR, определенные по Чотиа, или CDR, определенные по АбМ. В определенных аспектах антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат последовательности области, определяющей комплементарность (CDR) 1, варибельной области тяжелой цепи (VH), CDR2 VH, CDR3 VH и CDR1, CDR2 и CDR3 варибельной области легкой цепи (VL) SEQ ID NO: 5-10 соответственно.

В определенных аспектах фармацевтическая композиция содержит антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который специфически связывается с B7-N4 человека, причем композиция содержит не более чем 45% кислых вариантов антитела или его антигенсвязывающего фрагмента через 6 месяцев хранения при 5°C. В определенных аспектах фармацевтическая композиция содержит антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который специфически связывается с B7-N4 человека, причем композиция содержит не более чем 40% кислых вариантов антитела или его антигенсвязывающего фрагмента через 6 месяцев хранения при 5°C. В определенных аспектах фармацевтическая композиция содержит антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который специфически связывается с B7-N4 человека, причем композиция содержит от около 35% до около 45% кислых вариантов антитела или его антигенсвязывающего фрагмента через 6 месяцев хранения при 5°C. В определенных аспектах фармацевтическая композиция содержит антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который специфически связывается с B7-N4 человека, причем композиция содержит от 35% до 45% кислых вариантов антитела или его антигенсвязывающего фрагмента через 6 месяцев хранения при 5°C. В определенных аспектах фармацевтическая композиция содержит антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который специфически связывается с B7-N4 человека, причем композиция содержит не более чем 20% основных вариантов антитела или его антигенсвязывающего фрагмента через 6 месяцев хранения при 5°C.

В определенных аспектах фармацевтическая композиция содержит антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который специфически связывается с B7-N4 человека, причем композиция содержит не более чем 20% основных вариантов антитела или его антигенсвязывающего фрагмента через 6 месяцев хранения при 5°C. В определенных аспектах фармацевтическая композиция содержит антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который специфически связывается с B7-N4 человека, причем композиция содержит от около 9% до около 18% основных вариантов антитела или его антигенсвязывающего фрагмента через 6 месяцев хранения при 5°C. В определенных аспектах фармацевтическая композиция содержит антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который специфически связывается с B7-N4 человека, причем композиция содержит от 9% до 18% основных вариантов антитела или его антигенсвязывающего фрагмента через 6 месяцев хранения при 5°C. В определенных аспектах композиция содержит не более чем 45% кислых вариантов антитела или его антигенсвязывающего фрагмента через 6 месяцев хранения при 5°C. В определенных аспектах композиция содержит не более чем 40% кислых вариантов антитела или его антигенсвязывающего фрагмента через 6 месяцев хранения при 5°C.

В определенных аспектах фармацевтическая композиция содержит антитело или его антигенсвязывающий

вающий фрагмент, который специфически связывается с B7-H4 человека, причем композиция содержит не более чем 60% кислых и основных вариантов антитела или его антигенсвязывающего фрагмента через 6 месяцев хранения при 5°C. В определенных аспектах композиция содержит не более чем 55% кислых и основных вариантов антитела или его антигенсвязывающего фрагмента через 6 месяцев хранения при 5°C. В определенных аспектах композиция содержит не более чем 45% кислых вариантов антитела или его антигенсвязывающего фрагмента через 6 месяцев хранения при 5°C. В определенных аспектах композиция содержит не более чем 40% кислых вариантов антитела или его антигенсвязывающего фрагмента через 6 месяцев хранения при 5°C. В определенных аспектах композиция содержит не более чем 20% основных вариантов антитела или его антигенсвязывающего фрагмента через 6 месяцев хранения при 5°C.

В определенных аспектах фармацевтическая композиция содержит от около 30% до около 40% кислых вариантов антитела или его антигенсвязывающего фрагмента через 6 месяцев хранения при 5°C. В определенных аспектах фармацевтическая композиция содержит от 30% до 40% кислых вариантов антитела или его антигенсвязывающего фрагмента через 6 месяцев хранения при 5°C. В определенных аспектах фармацевтическая композиция содержит от около 35% до около 40% кислых вариантов антитела или его антигенсвязывающего фрагмента через 6 месяцев хранения при 5°C. В определенных аспектах фармацевтическая композиция содержит от 35% до 40% кислых вариантов антитела или его антигенсвязывающего фрагмента через 6 месяцев хранения при 5°C. В определенных аспектах фармацевтическая композиция содержит от около 10% до около 17% основных вариантов антитела или его антигенсвязывающего фрагмента через 6 месяцев хранения при 5°C.

В определенных аспектах фармацевтическая композиция содержит от 10% до 17% основных вариантов антитела или его антигенсвязывающего фрагмента через 6 месяцев хранения при 5°C. В определенных аспектах фармацевтическая композиция содержит от около 11% до около 16% основных вариантов антитела или его антигенсвязывающего фрагмента через 6 месяцев хранения при 5°C. В определенных аспектах фармацевтическая композиция содержит от 11% до 16% основных вариантов антитела или его антигенсвязывающего фрагмента через 6 месяцев хранения при 5°C.

В определенных аспектах композиция содержит не более чем 55% кислых и основных вариантов антитела или его антигенсвязывающего фрагмента через 6 месяцев хранения при 5°C.

В определенных аспектах антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит CDR 20502. В определенных аспектах CDR 20502 представляют собой CDR, определенные по Кабату, CDR, определенные по Чотиа, или CDR, определенные по АбМ. В определенных аспектах антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат последовательности области, определяющей комплементарность (CDR) 1, вариательной области тяжелой цепи (VH), CDR2 VH, CDR3 VH и CDR1, CDR2 и CDR3 вариательной области легкой цепи (VL) SEQ ID NO: 5-10 соответственно.

В определенных аспектах рН композиции составляет от около 4,5 до около 6 или от 4,5 до 6.

В определенных аспектах композиция содержит буфер. В определенных аспектах буфер представляет собой ацетатный или цитратный буфер.

В определенных аспектах композиция дополнительно содержит сахар. В определенных аспектах сахар выбран из группы, состоящей из сахарозы, сорбита и трегалозы.

В определенных аспектах концентрация буфера составляет от около 15 мМ до около 25 мМ. В определенных аспектах концентрация буфера составляет от 15 до 25 мМ. В определенных аспектах концентрация буфера составляет от около 18 мМ до около 22 мМ. В определенных аспектах концентрация буфера составляет от 18 мМ до 22 мМ. В определенных аспектах концентрация буфера составляет около 20 мМ. В определенных аспектах концентрация буфера составляет 20 мМ.

В определенных аспектах концентрация сахара составляет от около 225 мМ до около 300 мМ. В определенных аспектах концентрация сахара составляет от 225 мМ до 300 мМ. В определенных аспектах концентрация сахара составляет от около 250 мМ до около 290 мМ. В определенных аспектах концентрация сахара составляет от 250 мМ до 290 мМ. В определенных аспектах концентрация сахара составляет около 270 мМ. В определенных аспектах концентрация сахара составляет 270 мМ.

В определенных аспектах концентрация сахара в от около 10 до около 15 раз превышает концентрацию буфера. В определенных аспектах концентрация сахара в от 10 до 15 раз превышает концентрацию буфера. В определенных аспектах концентрация сахара в около 13,5 раз превышает концентрацию буфера. В определенных аспектах концентрация сахара в 13,5 раз превышает концентрацию буфера.

В определенных аспектах композиция дополнительно содержит поверхностно-активное вещество. В определенных аспектах поверхностно-активное вещество представляет собой полисорбат. В определенных аспектах полисорбат представляет собой полисорбат 20. В определенных аспектах концентрация полисорбата составляет от около 0,025% до около 0,075% масса/объем (мас./об.). В определенных аспектах композиция дополнительно содержит поверхностно-активное вещество. В определенных аспектах поверхностно-активное вещество представляет собой полисорбат. В определенных аспектах полисорбат представляет собой полисорбат 20. В определенных аспектах концентрация полисорбата составляет от 0,025% до 0,075% масса/объем (мас./об.). В определенных аспектах концентрация полисорбата составляет от около 0,035% до около 0,065% масса/объем (мас./об.). В определенных аспектах концентрация полисорбата составляет от 0,035% до 0,065% масса/объем (мас./об.). В определенных аспектах концентрация

ция полисорбата составляет около 0,005% масса/объем (мас./об.). В определенных аспектах концентрация полисорбата составляет 0,005% масса/объем (мас./об.).

В определенных аспектах концентрация антитела или его антигенсвязывающего фрагмента (включая его кислые и основные варианты) составляет от около 5 мг/мл до около 30 мг/мл. В определенных аспектах концентрация антитела или его антигенсвязывающего фрагмента (включая его кислые и основные варианты) составляет от 5 мг/мл до 30 мг/мл. В определенных аспектах концентрация антитела или его антигенсвязывающего фрагмента (включая его кислые и основные варианты) составляет от около 10 до около 25 мг/мл. В определенных аспектах концентрация антитела или его антигенсвязывающего фрагмента (включая его кислые и основные варианты) составляет от 10 до 25 мг/мл. В определенных аспектах концентрация антитела или его антигенсвязывающего фрагмента (включая его кислые и основные варианты) составляет около 20 мг/мл. В определенных аспектах концентрация антитела или его антигенсвязывающего фрагмента (включая его кислые и основные варианты) составляет 20 мг/мл.

В определенных аспектах pH композиции составляет от около 5,0 до около 6,0. В определенных аспектах pH композиции составляет около 5. В определенных аспектах pH композиции составляет 5. В определенных аспектах pH композиции составляет около 5,5. В определенных аспектах pH композиции составляет 5,5.

В определенных аспектах композиция представляет собой жидкость. В определенных аспектах композиция предназначена для парентерального введения. В определенных аспектах композиция предназначена для внутривенного введения. В определенных аспектах буфер представляет собой ацетатный буфер, а вспомогательное вещество представляет собой сахарозу. В определенных аспектах композиция содержит около 20 мМ ацетата, около 270 мМ сахарозы, около 20 мг/мл антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, и около 0,05% полисорбата 20, причем pH композиции составляет около 5,0. В определенных аспектах композиция содержит концентрацию сахарозы, которая около в 13,5 раза превышает концентрацию ацетата, около 20 мг/мл антитела или его антигенсвязывающего фрагмента и около 0,05% полисорбата 20, причем pH композиции составляет около 5,0. В определенных аспектах композиция содержит 20 мМ ацетата, 270 мМ сахарозы, 20 мг/мл антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, и 0,05% полисорбата 20, причем pH композиции составляет 5,0. В определенных аспектах композиция содержит концентрацию сахарозы, которая в 13,5 раза превышает концентрацию ацетата, 20 мг/мл антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, и 0,05% полисорбата 20, причем pH композиции составляет 5,0.

В определенных аспектах буфер представляет собой цитратный буфер, а вспомогательное вещество представляет собой сахарозу. В определенных аспектах композиция содержит около 20 мМ цитрата, около 270 мМ сахарозы, около 20 мг/мл антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, и около 0,05% полисорбата 20, причем pH композиции составляет около 5,5. В определенных аспектах композиция содержит концентрацию сахарозы, которая в около 13,5 раза превышает концентрацию цитрата, около 20 мг/мл антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, и около 0,05% полисорбата 20, причем pH композиции составляет около 5,5. В определенных аспектах композиция содержит 20 мМ цитрата, 270 мМ сахарозы, 20 мг/мл антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, и 0,05% полисорбата 20, причем pH композиции составляет 5,5. В определенных аспектах композиция содержит концентрацию сахарозы, которая в 13,5 раза превышает концентрацию цитрата, 20 мг/мл антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, и 0,05% полисорбата 20, причем pH композиции составляет 5,5.

В определенных аспектах антитело содержит VH, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 11, и/или VL, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 12. В определенных аспектах антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 21, и/или легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 22.

В определенных аспектах по меньшей мере 95% антител или их антигенсвязывающих фрагментов в композиции являются афукозилированными. В определенных аспектах фукозилирование в композиции является необнаруживаемым.

В определенных аспектах композиция содержит полноразмерное антитело.

В определенных аспектах композиция содержит антигенсвязывающий фрагмент. В определенных аспектах антигенсвязывающий фрагмент содержит Fab, Fab', F(ab')₂, одноцепочечный Fv (scFv), дисульфидносвязанный Fv, V-NAR домен, IgNar, интратело, IgGACH2, миниантитело, F(ab')₃, тетратело, триатело, диатело, однодоменное антитело, DVD-Ig, Fcab, mAb², (scFv)₂ или scFv-Fc.

В определенных аспектах антитело или его антигенсвязывающий фрагмент специфически связывается с B7-H4 яванского макака. В определенных аспектах антитело или его антигенсвязывающий фрагмент специфически связывается с B7-H4 крысы. В определенных аспектах антитело или его антигенсвязывающий фрагмент специфически связывается с B7-H4 мыши.

В определенных аспектах антитело или его антигенсвязывающий фрагмент специфически связывается с IgV доменом B7-H4 человека.

В определенных аспектах pI антитела или его антигенсвязывающего фрагмента составляет около

8.2. В определенных аспектах рI антителя или его антигенсвязывающего фрагмента составляет 8,2.

В определенных аспектах фармацевтическая композиция состоит из (i) антителя, содержащего тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 21, и/или легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 22, (ii) около 20 мМ ацетата, (iii) около 270 мМ сахарозы и (iv) около 0,05% масса/объем полисорбата 20, причем рН композиции составляет около 5,0. В определенных аспектах фармацевтическая композиция состоит из (i) антителя, содержащего тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 21, и/или легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 22, (ii) 20 мМ ацетата, (iii) 270 мМ сахарозы и (iv) 0,05% масса/объем полисорбата 20, причем рН композиции составляет 5,0.

В определенных аспектах фармацевтическая композиция состоит из (i) антителя, содержащего тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 21, и/или легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 22, (ii) около 20 мМ цитрата, (iii) около 270 мМ сахарозы и (iv) около 0,05% масса/объем полисорбата 20, причем рН композиции составляет около 5,5. В определенных аспектах фармацевтическая композиция состоит из (i) антителя, содержащего тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 21, и/или легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 22, (ii) 20 мМ цитрата, (iii) 270 мМ сахарозы и (iv) 0,05% масса/объем полисорбата 20, причем рН композиции составляет 5,5.

В определенных аспектах шприц или флакон содержит фармацевтическую композицию, представленную в настоящем документе.

В определенных аспектах способ лечения рака, экспрессирующего В7-Н4 у субъекта, включает введение субъекту фармацевтической композиции, представленной в настоящем документе. В определенных аспектах рак представляет собой солидную опухоль. В определенных аспектах рак выбран из группы, состоящей из рака молочной железы, протоковой карциномы, рака эндометрия, рака яичников, немелкоклеточного рака легких, рака поджелудочной железы, рака щитовидной железы, рака почки и рака мочевого пузыря. В определенных аспектах рак молочной железы представляет собой трижды негативный рак молочной железы или положительный на рецептор гормона рак молочной железы. В определенных аспектах немелкоклеточный рак легких представляет собой плоскоклеточную карциному.

В определенных аспектах субъект представляет собой человека.

В определенных аспектах фармацевтическая композиция вводится парентерально. В определенных аспектах фармацевтическая композиция вводится внутривенно.

4. Краткое описание графических материалов

На фиг. 1 представлена температура разворачивания (T_{m1}) В7-Н4 антителя "20502" (афукозилированное) при различных условиях рН, измеренных с помощью системы UNit. (См. пример 3.)

На фиг. 2 представлено влияние рН буфера на образование агрегатов антителя к В7-Н4 "20502" (афукозилированное) при 40°C, как определено с помощью эксклюзионной высокоэффективной жидкостной хроматографии (эксклюзионная ВЭЖХ). Состав для каждого значения рН приведен в табл. 13. Процент высокомолекулярных частиц (ВММ) составлял около 0 при T₀ для всех протестированных значений рН. (См. пример 3.)

На фиг. 3 представлено влияние рН буфера на образование фрагмента при 40°C, как определено с помощью эксклюзионной ВЭЖХ. Состав для каждого значения рН приведен в табл. 13. Процент низкомолекулярных частиц (НММ) составлял около 0 при T₀ для всех протестированных рН. (См. пример 3.)

На фиг. 4 представлено влияние рН буфера на образование агрегатов (как определено с помощью эксклюзионной ВЭЖХ) при 40°C в составах, содержащих 20 мМ цитрата, 270 мМ сахарозы и 0,05% полисорбата 20 (PS20). (См. пример 4.)

На фиг. 5 представлено влияние рН буфера на образование фрагмента (как определено с помощью эксклюзионной ВЭЖХ) при 40°C в составах, содержащих 20 мМ цитрата, 270 мМ сахарозы и 0,05% PS20. Процент НММ составлял около 0 при T₀ для всех протестированных рН. (См. пример 4.)

На фиг. 6 представлено влияние рН буфера на кислотные варианты (как определено с помощью изоэлектрического фокусирования под визуализационным контролем (iCE)) при 40°C. (См. пример 4.)

На фиг. 7 представлено влияние типов буферов на образование агрегатов (как определено с помощью эксклюзионной ВЭЖХ) при 40°C. (См. пример 5.)

На фиг. 8 представлено влияние типов буферов на образование фрагментов (как определено с помощью эксклюзионной ВЭЖХ) при 40°C. (См. пример 5.)

На фиг. 9 представлено влияние типов буферов на образование кислых вариантов (как определено с помощью iCE) при 40°C. (См. пример 5.)

На фиг. 10 представлено влияние типов буферов на образование основных вариантов (как определено с помощью iCE) при 40°C. (См. пример 5.)

На фиг. 11 представлено влияние вспомогательных веществ на образование агрегатов (как определено с помощью эксклюзионной ВЭЖХ) при 40°C. (См. пример 6.)

На фиг. 12 представлено влияние вспомогательных веществ на образование фрагментов (как опре-

делено с помощью эксклюзионной ВЭЖХ) при 40°C. (См. пример 6.)

На фиг. 13 представлено влияние вспомогательных веществ на кислотные варианты (как определено с помощью iCE) при 40°C. (См. пример 6.)

На фиг. 14 представлено влияние вспомогательных веществ на основные варианты (как определено с помощью iCE) при 40°C. (См. пример 6.)

На фиг. 15 представлен профиль дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК) 20502 (афукозилированное) в выбранном составе. (См. пример 6.)

5. Подробное описание сущности изобретения

В настоящем документе предлагаются фармацевтические композиции, содержащие антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с В7-Н4 человека. Фармацевтические композиции могут быть стабильными, например, в условиях длительного хранения, при повторяющихся циклах замораживания-оттаивания (например, по меньшей мере 5 циклов) и/или при перемешивания. Как указано в настоящем документе, фармацевтическая композиция, содержащая антитело к В7-Н4 или его антигенсвязывающий фрагмент, может иметь рН от около 4,5 до около 6, антитело к В7-Н4 или его антигенсвязывающий фрагмент (например, в концентрации от около 5 до около 25 мг/мл), буфер (включая, но не ограничиваясь этим, ацетат или цитрат), вспомогательное вещество (включая, но не ограничиваясь этим, сахарозу, трегалозу и сорбит) и/или поверхностно-активное вещество (включая, но не ограничиваясь этим, полисорбат, например, полисорбат 20 (PS20)).

В конкретном варианте осуществления в настоящем документе предлагается жидкая водная фармацевтическая композиция, содержащая 20 мг/мл антитела к В7-Н4 (например, афукозилированное антитело 20502) в 20 mM ацетата, 270 mM сахарозы и 0,05% PS20 с рН 5,0. В другом варианте осуществления в настоящем документе предлагается жидкая водная фармацевтическая композиция, содержащая 20 мг/мл антитела к В7-Н4 (например, афукозилированное антитело 20502) в 20 mM цитрата, 270 mM сахарозы и 0,05% PS20 с рН 5,5.

Фармацевтические композиции, представленные в настоящем документе, могут быть полезны для лечения состояний, таких как рак.

1. Терминология.

Термин "В7-Н4", в контексте настоящего документа, относится к полипептидам В7-Н4 млекопитающих, включая, но не ограничиваясь этим, нативные полипептиды В7-Н4 и изоформы полипептидов В7-Н4. "В7-Н4" охватывает полноразмерные непроцессированные полипептиды В7-Н4, а также формы полипептидов В7-Н4, которые возникают в результате процессинга внутри клетки. "Полинуклеотид В7-Н4", "нуклеотид В7-Н4" или "нуклеиновая кислота В7-Н4" относится к полинуклеотиду, кодирующему В7-Н4.

Термин "антитело" означает молекулу иммуноглобулина, которая распознает и специфически связывается с мишенью, такой как белок, полипептид, пептид, углевод, полинуклеотид, липид или комбинации вышеуказанного по меньшей мере через один сайт распознавания антигена в варибельной области молекулы иммуноглобулина. Термин "антитело", в контексте настоящего 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 относиться к 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, эпсилон, гамма и мю соответственно. Различные классы иммуноглобулинов имеют отличные и хорошо известные структуры субъединиц, и трехмерные конфигурации. Антитела могут быть "голыми" или конъюгированы с другими молекулами, такими как токсины, радиоизотопы и т.д.

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

Термины "антитело к В7-Н4" и "антитело, которое связывается с В7-Н4" относятся к антителу, которое способно специфически связываться с В7-Н4 с достаточной аффинностью, так что антитело может быть использовано как диагностический и/или терапевтический агент для нацеливания на В7-Н4. Термины "специфически связывающий", "иммуноспецифически связывающий", "иммуноспецифически распознающий" и "специфически распознающий", в контексте настоящего документа, являются аналогичными терминами в контексте антител или их антигенсвязывающих фрагментов. Эти термины указывают, что антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с эпитопом через его антигенсвязывающий

домен и что связывание влечет за собой некоторую комплементарность между антигенсвязывающим доменом и эпитопом. Соответственно, антитело, которое "специфически связывается" с B7-H4 человека (SEQ ID NO: 1), может также связываться с B7-H4 из других видов (например, B7-H4 яванского макака, мыши и/или крысы) и/или B7-H4 белком, продуцируемые из других аллелей человека, но степень связывания с несвязанным белком, не относящимся к B7-H4 (например, другими членами семейства белков B7, такими как PD-L1), составляет менее чем около 10% связывания антитела с B7-H4, как измерено, например, радиоиммуноанализом (RIA). В конкретном варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент для применения в составе, представленном в настоящем документе, специфически связывается с B7-H4 человека, яванского макака, мыши и крысы.

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

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

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

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

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 цепи антитела, или его антигенсвязывающего фрагмента. В определенных 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, NTH Publication No. 91-3242). Используя систему нумерации по Кабат, CDR в молекуле тяжелой цепи антитела обычно присутствуют в положениях аминокислот от 31 до 35, которые необязательно могут включать одну или две дополнительные аминокислоты, следующие за 35 (упоминается в схеме нумерации по Кабат как 35A и 35B) (CDR1), положения аминокислот от 50 до 65 (CDR2) и положения аминокислот от 95 до 102 (CDR3). Используя систему нумерации по Кабат, CDR в молекуле легкой цепи антитела обычно присутствуют в положениях аминокислот 24-34 (CDR1), положениях аминокислот 50-56 (CDR2) и положениях аминокислот 89-97 (CDR3). В конкретном варианте осуществления CDR антител, описанных в настоящем документе, были определены в соответствии со схемой нумерации по Кабат.

Система нумерации Чотиа ссылается вместо этого на расположение структурных петель (Chothia and Lesk, *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987)). Конец петли CDR-H1 по Чотиа при нумерации согласно системе нумерации по Кабату варьируется между H32 и H34 в зависимости от длины петли (это связано с тем, что в схеме нумерации по 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 AbM представляют собой компромисс между CDR по Кабат и структурными петлями по Чотиа, и используются программным обеспечением Oxford Molecular для моделирования антител AbM.

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

Термин "константная область" и "константный домен", в контексте настоящего документа, являются взаимозаменяемыми и имеют общие значения в данной области техники. Константная область представляет собой часть антитела, например, карбоксильную концевую часть легкой и/или тяжелой цепи, которая не участвует непосредственно в связывании антитела с антигеном, но которая может проявлять различные эффекторные функции, такие как взаимодействие с Fc-рецептором. Константная область молекулы иммуноглобулина обычно имеет более консервативную аминокислотную последовательность относительно варибельного домена иммуноглобулина. В определенных аспектах антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит константную область или ее часть, достаточную для антителозависимой клеточноопосредованной цитотоксичности (ADCC).

Термин "тяжелая цепь", в контексте настоящего документа, при использовании в отношении антитела может относиться к любому отдельному типу, например, альфа (α), дельта (δ), эpsilon (ϵ), гамма (γ) и мю (μ), на основе аминокислотной последовательности константного домена, которая приводит к классам антител IgA, IgD, IgE, IgG и IgM соответственно, включая подклассы IgG, например, IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4. Аминокислотные последовательности тяжелой цепи хорошо известны в данной области техники. В конкретных вариантах осуществления тяжелая цепь представляет собой тяжелую цепь человека.

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

Термин "химерные" антитела или их антигенсвязывающие фрагменты относятся к антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, причем аминокислотная последовательность происходит от двух или более видов. Как правило, варибельная область как легкой, так и тяжелой цепей соответствует варибельной области антител или их антигенсвязывающих фрагментов, полученных от одного вида млекопитающих (например, мыши, крысы, кролика и т. д.) с желаемой специфичностью, аффинностью и способностью, в то время как константные области гомологичны последовательностям антител или их антигенсвязывающих фрагментов, полученных от другого (обычно человека), чтобы избежать вызывания иммунного ответа у этого вида.

Термин "гуманизованное" антитело или его антигенсвязывающий фрагмент относится к формам нечеловеческих (например, мышинных) антител или антигенсвязывающих фрагментов, которые представляют собой специфические цепи иммуноглобулинов, химерные иммуноглобулины или их фрагменты, которые содержат минимальное количество нечеловеческой последовательности (например, мыши). Как правило, гуманизированные антитела или их антигенсвязывающие фрагменты представляют собой иммуноглобулины человека, в которых остатки из комплементарной определяющей области (CDR) заменены остатками из CDR нечеловеческого вида (например, мыши, крысы, кролика, хомяка), которые имеют желаемую специфичность, аффинность и способность ("привитые CDR") (Jones et al., Nature 321:522-525 (1986); Riechmann et al., Nature 332:323-327 (1988); Verhoeven et al., Science 239:1534-1536 (1988)). В некоторых случаях определенные остатки каркасной области Fv (FR) иммуноглобулина человека заменяются соответствующими остатками в антителе или фрагменте вида, не принадлежащему к человеку, который обладает желаемой специфичностью, аффинностью и способностью. Гуманизованное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент могут быть дополнительно модифицированы путем замены дополнительных остатков либо в каркасной области Fv, и/или в остатках CDR нечеловеческого происхождения для уточнения и оптимизации специфичности антитела, его антигенсвязывающего фрагмента, аффинности и/или способности. В общем, гуманизованное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент будет содержать варибельные домены, содержащие все или по существу все области CDR, которые соответствуют иммуноглобулину, не относящемуся к человеку, тогда как все или по су-

шеству все области FR являются таковыми из консенсусной последовательности иммуноглобулина человека. Гуманизированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент также могут содержать по меньшей мере часть константной области или домена иммуноглобулина (Fc), обычно иммуноглобулина человека. Примеры способов, используемые для получения гуманизированных антител, описаны в патенте США № 5225539; Roguska et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 91(3):969-973 (1994), и Roguska et al., Protein Eng. 9(10):895-904 (1996). В некоторых вариантах осуществления "гуманизированное антитело" представляет собой антитело с измененной поверхностью.

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

"Афукозилированное" антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, или антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, "лишенные фукозы", относится к антителу изотипа IgG1 или IgG3, или его антигенсвязывающему фрагменту, в котором отсутствует гликозилирование константной области фукозы. Гликозилирование IgG1 или IgG3 человека происходит по Asn297 в виде гликозилирования олигосахаридным диантеннарным комплексом фукозы, оканчивающимся после 2 остатков Gal. В некоторых вариантах осуществления афукозилированное антитело лишено фукозы по Asn297. Эти структуры обозначены как остатки гликана G0, G1 (a 1,6 или 1,3) или G2 в зависимости от количества концевых остатков Gal. См., например, Raju, T. S., BioProcess Int. 1: 44-53 (2003). Гликозилирование типа CHO антитела Fc описано, например, в Routier, F. FL, Glycoconjugate J. 14: 201-207 (1997).

Способы измерения количества фукозы включают любые способы, известные в данной области техники. Для целей настоящего изобретения фукозу обнаруживают способом, описанным в Примере 1 WO 2015/017600, который полностью включен в настоящее описание посредством ссылки. Вкратце, анализ гликанов осуществляют путем высвобождения гликанов из антитела (например, путем ферментативного высвобождения), маркировки гликанов антраниловой кислотой (2-AA), а затем очистки меченых гликанов. Для разделения гликанов и измерения относительного количества каждого гликана в антителе используют ВЭЖХ с нормальной фазой с флуоресцентным детектированием. Гликаны могут быть положительно идентифицированы с отсутствием или включением фукозы с помощью масс-спектрометрии. В некоторых вариантах осуществления фукоза является необнаруживаемой в композиции, содержащей множество афукозилированных антител или их антигенсвязывающих фрагментов. В некоторых вариантах осуществления афукозилированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент обладает повышенной активностью ADCC, что может быть измерено с помощью анализа, приведенного в Примере 12 в настоящем документе. 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). Сродство к Fc-гамма RIIIА или его аллелям можно измерить с помощью анализа, приведенного в Примере 10 в настоящем документе.

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

Термин "эпитоп", в контексте настоящего документа, является термином в данной области техники и относится к локализованной области антигена, с которой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент могут специфически связываться. Эпитоп может представлять собой, например, смежные аминокислоты полипептида (линейный или непрерывный эпитоп) или эпитоп, например, может объединяться из двух или более несмежных областей полипептида или полипептидов (конформационных, нелинейных, прерывистых или несмежных эпитопов). В некоторых вариантах осуществления эпитоп, с которым специфически связывается антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, может быть определен, напри-

мер, с помощью ЯМР-спектроскопии, исследований рентгеновской дифракционной кристаллографии, анализов ИФА, обмена водород/дейтерий в сочетании с масс-спектрометрией (например, жидкостной хроматографии с масс-спектрометрией с электрораспылением), анализов на основе олигопептидного сканирования и/или мутагенезного картирования (например, картирование сайт-направленного мутагенеза). Для рентгеновской кристаллографии, кристаллизация может быть выполнена с использованием любого из известных в данной области техники 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). Кристаллы антитела/его антигенсвязывающий фрагмент: антиген могут быть изучены с использованием хорошо известных способов дифракции рентгеновских лучей и могут быть уточнены с использованием компьютерного программного обеспечения, такого как X-PLOR (Yale University, 1992, распространяется Molecular Simulations, Inc.; см., например, *Meth Enzymol* (1985) 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 мутагенезного картирования могут быть выполнены с использованием любого способа, известного специалисту в данной области техники. См., например, Champe M et al., (1995) *J Biol Chem* 270: 1388-1394 и Cunningham BC & Wells JA (1989) *Science* 244: 1081-1085 для описания способов мутагенеза, включая способы аланин-сканирующего мутагенеза.

Полипептид, антитело, полинуклеотид, вектор, клетка или композиция, которые "выделены", представляет собой полипептид, антитело, полинуклеотид, вектор, клетку или композицию, которая находится в форме, не встречающейся в природе. Выделенные полипептиды, антитела, полинуклеотиды, векторы, клетка или композиции включают те, которые были очищены до такой степени, что они больше не присутствуют в той форме, в которой они находятся в природе. В некоторых вариантах осуществления выделенные антитело, полинуклеотид, вектор, клетка или композиция являются по существу чистой. Термин "по существу чистый", в контексте настоящего документа, относится к материалу, который имеет чистоту по меньшей мере 50% (т.е., не содержит загрязнений), чистоту по меньшей мере 90%, чистоту по меньшей мере 95%, чистоту по меньшей мере 98% или чистоту по меньшей мере 99%.

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

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

Термин "фармацевтический состав" или "фармацевтическая композиция" относится к препарату, который находится в такой форме, которая позволяет биологической активности активного ингредиента быть эффективной, и который не содержит дополнительных компонентов, которые являются неприемлемо токсичными для субъекта, которому будет вводиться состав. Состав может быть стерильным.

Термин "лекарственное средство" относится к готовой лекарственной форме, например, к жидкому составу, содержащему действующее вещество, как правило, но не обязательно, в сочетании с одним или более другими ингредиентами.

Термин "действующее вещество" относится к активному ингредиенту, например антителу к В7-Н4 или его антигенсвязывающему фрагменту (например, афукозилированному антителу 20502), который предназначен для обеспечения фармакологической или биологической активности или другого прямого эффекта в диагностике, излечении, смягчении, лечении или профилактики заболевания, но не включает промежуточные соединения, используемые при синтезе такого ингредиента.

Термин "буфер", в контексте настоящего документа, относится к компоненту в растворе, который позволяет раствору противостоять изменениям pH. Буферы включают, например, ацетатный, цитратный, сукцинатный и гистидиновый буферы.

"Стабильный" состав представляет собой состав, в котором активный ингредиент (например, антитело к В7-Н4 или его антигенсвязывающий фрагмент) по существу сохраняет свою физическую стой-

кость и/или химическую стабильность, и/или биологическую активность при хранении. Стабильность может быть измерена при выбранных условиях (например, при температуре) в течение выбранного периода времени. Составы, представленные в настоящем документе, могут быть стабильными при комнатной температуре (около 25°C) в течение по меньшей мере 6 месяцев и/или стабильными при около 2-8°C в течение по меньшей мере 1 года. Составы, представленные в настоящем документе, также могут быть стабильными после замораживания (например, до -70°C) и оттаивания состава, далее называемых "цикл замораживания/оттаивания". Составы, представленные в настоящем документе, также могут быть стабильными после перемешивания.

Термины "вводить", "вводимый", "введение" и тому подобное, используемые в настоящем 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). Способ введения, которые можно применять с агентами и способами, описанными в настоящем документе, можно найти, например, в Goodman and Gilman, *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, current edition, Pergamon; и Remington's, *Pharmaceutical Sciences*, current edition, Mack Publishing Co., Easton, Pa.

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

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 рака 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 до некоторой степени один или более симптомов, связанных с раком; и/или приводят к благоприятному ответу, такому как увеличение выживаемости без прогрессирования заболевания (PFS), выживаемости без заболевания (DFS), общей выживаемости (OS), полного ответа (CR), частичного ответа (PR) или в некоторых случаях стабильное заболевание (SD), уменьшение прогрессирующего заболевания (PD), уменьшение времени до прогрессирования (TTP) или любая их комбинация. В той степени, в которой лекарственное средство может предотвращать рост и/или убивать существующие раковые клетки, оно может быть цитостатическим и/или цитотоксическим.

Такие термины, как "лечение", "лечащий", "лечить", "облегчающий" и "облегчение" относятся к терапевтическим мерам, которые лечат, замедляют, уменьшают симптомы и/или останавливают прогрессирование патологического состояния или расстройства. Таким образом, те, кто нуждается в лечении, включают тех, кто уже имеет диагноз или подозрение на заболевание. В определенных вариантах осуществления субъект успешно "лечится" от рака в соответствии со способами по настоящему изобретению, если пациент демонстрирует одно или более из следующего: уменьшение количества или полное отсутствие раковых клеток; уменьшение размера опухоли; ингибирование или отсутствие проникновения раковых клеток в периферические органы, включая, например, распространение рака в мягкие ткани и кости; торможение или отсутствие метастазирования опухоли; торможение или отсутствие роста опухоли; облегчение одного или более симптомов, связанных с конкретным раком; снижение заболеваемости и смертности; улучшение качества жизни; уменьшение онкогенности, онкогенной частоты или онкогенной способности опухоли; уменьшение количества или частоты раковых стволовых клеток в опухоли; дифференцировка онкогенных клеток в неопухоловое состояние; увеличение выживаемости без прогрессирования (PFS), выживаемость без заболевания (DFS), общая выживаемость (OS), полный ответ (CR), частичный ответ (PR), стабильное заболевание (SD), уменьшение прогрессирующего заболевания (PD), уменьшенное время до прогрессирования (TTP) или любая их комбинация.

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

"Рефрактерный" рак представляет собой рак, который прогрессирует, даже если противоопухолевое лечение, такое как химиотерапия, применяют к больному раком.

"Рецидивирующий" рак представляет собой рак, который повторно развивается, или на начальном

участке или в отдаленном месте, после ответа на начальную терапию.

Пациент "с рецидивом" представляет собой пациента, который имеет признаки или симптомы рака после ремиссии. Необязательно пациент имеет рецидив после адьювантной или неоадьювантной терапии.

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

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

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

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

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

5.2 Фармацевтические композиции, содержащие антитела к В7-Н4.

В настоящем документе предлагаются фармацевтические композиции (например, водные фармацевтические композиции), содержащие антитело к В7-Н4 или его антигенсвязывающий фрагмент (например, как описано в разделе 5.3 ниже).

В определенных вариантах осуществления фармацевтическая композиция, представленная в настоящем документе, является устойчивой к множественным циклам замораживания-оттаивания. Цикл замораживания-оттаивания может включать замораживание фармацевтической композиции (например, при температуре около -70°C), а затем оттаивание фармацевтической композиции (например, при комнатной температуре). Фармацевтическая композиция может быть стабильной в течение по меньшей мере пяти циклов замораживания-оттаивания. Циклы замораживания-оттаивания (например, по меньшей мере пять циклов замораживания-оттаивания) могут не приводить к изменению внешнего вида, растворимым агрегатам или невидимым невооруженным глазом твердым частицам.

В определенных вариантах осуществления фармацевтическая композиция, представленная в настоящем документе, является стабильной при перемешивании. Перемешивание может включать встряхивание (например, при 300 оборотах в минуту на орбитальном шейкере) в течение около трех дней при комнатной температуре. Перемешивание может не привести к изменению внешнего вида, растворимым агрегатам, вариантам, отличающимся зарядами или невидимым невооруженным глазом твердым частицам.

В определенных вариантах осуществления фармацевтическая композиция, представленная в настоящем документе, является стабильной в условиях длительного хранения. Условия длительного хранения могут включать хранение при температуре около 5°C (например, от около 2°C до около 8°C) в течение около 6 месяцев или около 1 года. Условия длительного хранения могут включать хранение при температуре около 25°C в течение около 6 месяцев или около 1 года. Условия длительного хранения могут включать хранение при температуре около 40°C в течение около 3 месяцев, около 6 месяцев или около 1 года.

В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция, представленная в настоящем документе, является устойчивой к множественным (например, по меньшей мере пяти) циклам замораживания-оттаивания, стабильной при перемешивании и/или стабильной в условиях длительного хранения.

В определенных вариантах осуществления фармацевтическая композиция, представленная в настоящем документе, является стабильной при хранении при температуре около -70°C и при хранении при температуре от около 2°C до около 8°C в течение около 1 года.

В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция может содержать антитело к В7-Н4 или его антигенсвязывающий фрагмент. В некоторых вариантах осуществления концентрация антитела к В7-Н4 или его антигенсвязывающего фрагмента (включая его кислотные и основные варианты) в составе составляет от около 5 мг/мл до около 30 мг/мл. В некоторых вариантах осуществления концентрация антитела к В7-Н4 или его антигенсвязывающего фрагмента (включая его кислотные и основ-

антигенсвязывающего фрагмента через 6 месяцев при хранении при 5°C.

В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который специфически связывается с В7-Н4 человека (например, афукозилированное антитело 20502), причем композиция содержит от около 30% до около 45%, от около 30% до около 40 % или от около 35% до около 40% кислых вариантов антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, и/или от около 11% до около 16%, от около 10% до около 17% или от около 9% до около 18% основных вариантов антитела или его антигенсвязывающего фрагмента через 6 месяцев при хранении при 5°C. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который специфически связывается с В7-Н4 человека (например, афукозилированное антитело 20502), причем композиция содержит от 30% до 45%, от 30% до 40 % или от 35% до 40% кислых вариантов антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, и/или от 11% до 16%, от 10% до 17% или от 9% до 18% основных вариантов антитела или его антигенсвязывающего фрагмента через 6 месяцев при хранении при 5°C.

В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который специфически связывается с В7-Н4 человека, причем композиция содержит не более 60% или 55% кислых и основных вариантов антитела, или его антигенсвязывающего фрагмента через 6 месяцев при хранении при 5°C. В некоторых вариантах осуществления композиция также содержит не более 40% кислых вариантов и/или не более 20% основных вариантов антитела или его антигенсвязывающего фрагмента через 6 месяцев при хранении при 5°C. В некоторых вариантах осуществления предлагаются фармацевтические композиции, в которых фармацевтическая композиция содержит афукозилированные антитела к В7-Н4 или их антигенсвязывающие фрагменты, и фармацевтически приемлемый носитель. В конкретных вариантах осуществления предлагаются фармацевтические композиции, в которых фармацевтическая композиция содержит афукозилированные антитела к В7-Н4 или антигенсвязывающие фрагменты, например, причем по меньшей мере 80% антител в композиции являются афукозилированными. В конкретных вариантах осуществления предлагаются фармацевтические композиции, в которых фармацевтическая композиция содержит афукозилированные антитела к В7-Н4 или антигенсвязывающие фрагменты, например, причем по меньшей мере 85% антител в композиции являются афукозилированными. В конкретных вариантах осуществления предлагаются фармацевтические композиции, в которых фармацевтическая композиция содержит афукозилированные антитела к В7-Н4 или антигенсвязывающие фрагменты, например, причем по меньшей мере 90% антител в композиции являются афукозилированными. В конкретных вариантах осуществления предлагаются фармацевтические композиции, в которых фармацевтическая композиция содержит афукозилированные антитела к В7-Н4 или антигенсвязывающие фрагменты, например, причем по меньшей мере 95% антител в композиции являются афукозилированными. В конкретных вариантах осуществления предлагаются фармацевтические композиции, в которых фармацевтическая композиция содержит афукозилированные антитела к В7-Н4 или антигенсвязывающие фрагменты, например, причем по меньшей мере 96% антител в композиции являются афукозилированными. В конкретных вариантах осуществления предлагаются фармацевтические композиции, в которых фармацевтическая композиция содержит афукозилированные антитела к В7-Н4 или антигенсвязывающие фрагменты, например, причем по меньшей мере 97% антител в композиции являются афукозилированными. В конкретных вариантах осуществления предлагаются фармацевтические композиции, в которых фармацевтическая композиция содержит афукозилированные антитела к В7-Н4 или антигенсвязывающие фрагменты, например, причем по меньшей мере 98% антител в композиции являются афукозилированными. В конкретных вариантах осуществления предлагаются фармацевтические композиции, в которых фармацевтическая композиция содержит афукозилированные антитела к В7-Н4 или антигенсвязывающие фрагменты, например, причем по меньшей мере 99% антител в композиции являются афукозилированными. В конкретных вариантах осуществления предлагаются фармацевтические композиции, в которых фармацевтическая композиция содержит афукозилированные антитела к В7-Н4 или антигенсвязывающие фрагменты, причем фукоза является необнаруживаемой в композиции.

В некоторых вариантах осуществления предлагаются фармацевтические композиции, в которых фармацевтическая композиция содержит (i) изолированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который специфически связывается с В7-Н4 человека, включающим (а) последовательности области определяющей комплементарность (CDR) 1 переменной области тяжелой цепи (VH), CDR2 VH, CDR3 VH и CDR1, CDR2 и CDR3 переменной области легкой цепи (VL) SEQ ID NO: 5-10 соответственно, (б) переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11 и переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12, или (с) тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22 и (ii) фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество.

В настоящем документе также предлагается фармацевтическая композиция, в которой фармацевтическая композиция содержит (i) антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связываются с В7-Н4 человека и содержат последовательности области определяющей комплементарность (CDR) 1 переменной области тяжелой цепи (VH), CDR2 VH, CDR3 VH и CDR1, CDR2 и

CDR3 варибельной области легкой цепи (VL) SEQ ID NO: 5-10 соответственно и (ii) фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество, 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 варибельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11, и варибельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12, или (ii) антитело содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22.

5.3 Антитела к B7-H4.

В настоящем документе предлагаются фармацевтические композиции, содержащие антитела (например, моноклональные антитела, такие как химерные, гуманизированные антитела или антитела человека) и их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связываются с B7-H4 (например, B7-H4 человека). Типовые антитела B7-H4 и их антигенсвязывающие фрагменты, которые могут быть использованы в фармацевтических композициях, представленных в настоящем документе, известны в данной области техники. Аминокислотные последовательности для 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:

```
MASLGQILFWSIISIIILAGAIALIGFGISGRHSITVTTVASAGNIGEDGILSCTFEPDIKLS
IVIQWLKEGVLGLVHEFKEGKDELSEQDEMFRGRTAVFADQVIVGNASRLRLKINVQLTD
AGTYKCYIITSKGKGNANLEYKTGAFSMPEVNVVDYNASSETLRCEAPRWFPQPTVVWA
SQVDQGANFSEVSNTSFELNSENVTMKVVSVLNVNTINNTYSCMIENDIAKATGDIKVT
ESEIKRRSHLQLLNSKASLCVSSFFAISWALLPLSPYLMLK (SEQ ID NO:1)
```

B7-H4 яванского макака:

```
MASLGQILFWSIISIIIFILAGAIALIGFGISGRHSITVTTVASAGNIGEDGILSCTFEPDIKLS
DIVIQWLKEGVIGLVHEFKEGKDELSEQDEMFRGRTAVFADQVIVGNASRLRLKINVQLTD
AGTYKCYIITSKGKGNANLEYKTGAFSMPEVNVVDYNASSETLRCEAPRWFPQPTVVWA
SQVDQGANFSEVSNTSFELNSENVTMKVVSVLNVNTINNTYSCMIENDIAKATGDIKVT
ESEIKRRSHLQLLNSKASLCVSSFLAISWALLPLAPYLMLK (SEQ ID NO:2)
```

B7-H4 мыши:

```
MASLGQIIFWSIINIIILAGAIALIGFGISGKHFITVTTFTSAGNIGEDGTLSCCTFEPDIKLN
IVIQWLKEGIKGLVHEFKEGKDDLSQHEMFRGRTAVFADQVVVGNASRLRLKINVQLTD
AGTYTCYIIRTSKKGKGNANLEYKTGAFSMPEINVDYNASSESLRCEAPRWFPQPTVAWAS
QVDQGANFSEVSNTSFELNSENVTMKVVSVLNVNTINNTYSCMIENDIAKATGDIKVT
SEVKRRSQLQLLNSGSPSPCVFSSAFVAGWALLSLSCCLMLR (SEQ ID NO:3)
```

B7-H4 крысы:

```
MASLGQIIFWSIINVIIIILAGAIIVLIGFGISGKHFITVTTFTSAGNIGEDGTLSCCTFEPDIKLN
GIVIQWLKEGIKGLVHEFKEGKDDLSQHEMFRGRTAVFADQVVVGNASRLRLKINVQLT
DAGTYTCYIIRTSKKGKGNANLEYKTGAFSMPEINVDYNASSESLRCEAPRWFPQPTVAW
ASQVDQGANFSEVSNTSFELNSENVTMKVVSVLNVNTINNTYSCMIENDIAKATGDIKV
TDSEVKRRSQLELLNSGSPSPCVSSVSAAGWALLSLSCCLMLR (SEQ ID NO:4)
```

В определенных вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент в фармацевтических композициях, представленных в настоящем документе, специфически связывается с B7-H4 человека. В определенных вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент в фармацевтических композициях, представленных в настоящем документе, специфически связывается с B7-H4 человека и яванского макака. В определенных вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент в фармацевтических композициях, представленных в настоящем документе, специфически связывается с B7-H4 человека, мыши и крысы. В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент в фармацевтических композициях, представленных в настоящем документе, специфически связывается с B7-H4 человека, яванского макака, мыши и крысы.

B7-H4 содержит эктодомен IgC (аминокислоты 153-241 SEQ ID NO: 1) и эктодомен IgV (аминокислоты 35-146 SEQ ID NO: 1). В определенных вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент в фармацевтических композициях, представленных в настоящем документе, специфически

чески связывается с доменом IgV B7-H4 человека. Соответственно в настоящем документе представлены фармацевтические композиции, содержащие антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связываются с полипептидом, состоящим из аминокислот 35-146 SEQ ID NO: 1.

В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент в фармацевтических композициях, представленных в настоящем документе, специфически связывается с B7-H4 человека и содержит шесть CDR антитела 20502, перечисленные в табл. 1 и 2.

Таблица 1

Аминокислотная последовательность CDR VH¹

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

¹ CDR VH в табл. 1 определяются по Кабат

Таблица 2

Аминокислотная последовательность CDR² VL

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

² CDR VL в табл. 2 определяются по Кабат

В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент в фармацевтических композициях, представленных в настоящем документе, специфически связывается с B7-H4 человека и содержит VH антитела 20502, указанную в табл. 3.

Таблица 3

Аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи (VH)

Антитело	Аминокислотная последовательность VH (SEQ ID NO)
20502	QLQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSIKSGSYWGWIRQPPGKGLE WIGNIYYSGSTYYNPSLRVSRVTISVDTSKNQFSLKLVTAADTAVYY CAREGSYPNQFDPWGQGLTIVTSS (SEQ ID NO:11)

В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент в фармацевтических композициях, представленных в настоящем документе, специфически связывается с B7-H4 человека и содержит VL 20502, указанную в табл. 4.

Таблица 4

Аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи (VL)

Антитело	Аминокислотная последовательность VL (SEQ ID NO)
20502	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSNLAWYQQKPGQAPRLLIY GASTRATGIPARFSGSGTEFTLTISSLSQSEDFAVYYCQQYHSFPFTFG GGTKVEIK (SEQ ID NO:12)

В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент в фармацевтических композициях, представленных в настоящем документе, специфически связывается с B7-H4 человека и содержит VH и VL антитела 20502, указанные в табл. 3 и 4.

В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент в фармацевтических композициях, представленных в настоящем документе, специфически связывается с B7-H4 человека и содержит каркасные области VH антитела 20502, указанные в табл. 5.

Таблица 5

Аминокислотная последовательность FR³ VH

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

³ Каркасные области VH, описанные в табл. 5, определяются на основе границ системы нумерации 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

В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент в фарма-

цветических композициях, представленных в настоящем документе, специфически связывается с B7-H4 человека и содержит каркасные области VL антитела 20502, указанные в табл. 6.

Таблица 6

Аминокислотная последовательность FR⁴ VL

Антитело	FR1 VL (SEQ ID NO:)	FR2 VL (SEQ ID NO:)	FR3 VL (SEQ ID NO:)	FR4 VL (SEQ ID NO:)
20502	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSC (SEQ ID NO:17)	WYQQKPGQAPRLLIY (SEQ ID NO:18)	GIPARFSGSGSGTEFTLTISLQSEDFAVYYC (SEQ ID NO:19)	FGGGTKVEIK (SEQ ID NO:20)

⁴ Каркасные области VL, описанные в табл. 6, определяются 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

В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент в фармацевтических композициях, представленных в настоящем документе, специфически связывается с B7-H4 человека и содержит четыре каркасных области VH и четыре каркасных области VL антитела 20502, перечисленные в табл. 5 и 6.

В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент в фармацевтических композициях, представленных в настоящем документе, специфически связывается с B7-H4 человека и содержит последовательность тяжелой цепи антитела 20502, приведенную в табл. 7.

Таблица 7

Аминокислотные последовательности полноразмерной тяжелой цепи

Антитело	Аминокислотная последовательность полноразмерной тяжелой цепи (SEQ ID NO)
20502	QLQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSIKSGSYWGWIRQPPGKGL EWIGNIYYSGSTYYNPSLRSRVTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVY YCAREGSPNQFDPWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGT AALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKVEPKSCDKTHTCPPCPAP ELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV NKALPAIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:21)

В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент в фармацевтических композициях, представленных в настоящем документе, специфически связывается с B7-H4 человека и содержит последовательность легкой цепи антитела 20502, приведенную в табл. 8.

Таблица 8

Аминокислотные последовательности полноразмерной легкой цепи

Антитело	Аминокислотная последовательность полноразмерной легкой цепи (SEQ ID NO)
20502	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSNLAWYQQKPGQAPRLL IYGASTRATGIPARFSGSGSGTEFTLTISLQSEDFAVYYCQYHNSFPF TFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREA KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHK VYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:22)

В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент в фармацевтических композициях, представленных в настоящем документе, специфически связывается с B7-H4 человека и содержит последовательность тяжелой цепи и последовательность легкой цепи антитела 20502, перечисленные в табл. 7 и 8.

В определенных аспектах антитело или его антигенсвязывающий фрагмент в фармацевтических композициях, представленных в настоящем документе, описывается только его VL-доменом или только его VH-доменом или только его 3 CDR VL или только его 3 CDR VH. См., например, Rader C et al., (1998) PNAS 95: 8910-8915, которая включена в настоящее описание посредством ссылки во всей ее полноте, описывая гуманизацию мышинового антитела к $\alpha\beta\gamma\delta$ путем идентификации дополняющей легкой

цепи или тяжелой цепи, соответственно, от легкой цепи человека или библиотеки тяжелой цепи, приводящей к вариантам гуманизированного антитела, имеющим сродство настолько же или более высокое, чем сродство исходного антитела. См. также Clackson T et al., (1991) *Nature* 352: 624-628, которая включена в настоящее описание посредством ссылки во всей ее полноте, описывая способы получения антител, которые специфически связываются со специфическим антигеном с использованием специфического VL домена (или домена VH), и скрининг библиотеки на дополняющий VH домен (или VL домен). Скрининг привел к 14 новым партнерам для конкретного домена VH и 13 новым партнерам для конкретного домена VL, которые связывались сильнее, как определено с помощью ИФА. См. также Kim SJ & Hong HJ, (2007) *J Microbiol* 45: 572-577, которая включена в настоящее описание посредством ссылки во всей ее полноте, описывая способы получения антител, которые специфически связывают специфический антиген, с использованием специфического домена VH и скрининга библиотеки (например, библиотеки VL человек) на дополняющие VL домены; выбранные VL домены в свою очередь, могут быть использованы для направленного отбора дополняющих комплементарных (например, человека) VH доменов.

В некоторых аспектах CDR антитела или его антигенсвязывающий фрагмент могут быть определены в соответствии со схемой нумерации по Чотиа, которая относится к местоположению иммуноглобулина структурных петель (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). Как правило, при использовании системы нумерации по Кабату петля по Чотиа CDR-H1 представлена аминокислотами тяжелой цепи 26-32, 33 или 34, петля по Чотиа CDR-H2 представлена аминокислотами тяжелой цепи 52-56, и петля по Чотиа CDR-H3 представлена аминокислотами тяжелой цепи 95-102, в то время как петля по Чотиа CDR-L1 представлена аминокислотами легкой цепи 24-34, петля по Чотиа CDR-L2 представлена аминокислотами легкой цепи 50-56 и петля по Чотиа CDR-L3 представлена аминокислотами легкой цепи 89-97. Конец петли CDR-H1 по Чотиа при нумерации согласно системе нумерации по Кабату варьируется между H32 и H34 в зависимости от длины петли (это связано с тем, что в схеме нумерации по Кабату в H35A и H35B размещаются вставки; если ни 35A, ни 35B не присутствуют, петля заканчивается на 32; если присутствует только 35A, петля заканчивается на 33; если присутствуют оба 35A и 35B, петля заканчивается на 34).

В некоторых аспектах в настоящем документе предложены фармацевтические композиции, содержащие антитела и антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связываются с B7-H4 (например, B7-H4 человека) и содержат CDR VH и VL по Чотиа из антитела 20502, перечисленные в табл. 3 и 4. В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе предложены фармацевтические композиции, содержащие антитела и антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связываются с B7-H4 (например, B7-H4 человека) и содержат один или более CDR, в которых CDR по Чотиа и по Кабат имеют одинаковую аминокислотную последовательность. В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе предложены фармацевтические композиции, содержащие антитела и антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связываются с B7-H4 (например, B7-H4 человека) и состоят из комбинаций CDR по Кабату, и CDR по Чотиа.

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 и Lefranc M-P et al., (1999) *Nucleic Acids Res* 27: 209-212. Согласно системе нумерации IMGT VH-CDR1 находится в положениях 26-35, VH-CDR2 находится в положениях 51- 57, VH-CDR3 находится в положениях 93-102, VL-CDR1 находится в положениях 27-32, VL-CDR2 находится в положениях 50-52, и VL-CDR3 находится в положениях 89-97. В конкретном варианте осуществления в настоящем документе предложены фармацевтические композиции, содержащие антитела и антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связываются с B7-H4 (например, B7-H4 человека) и содержат CDR VH и VL IMGT из антитела 20502, перечисленные в табл. 3 и 4, например, как описано в Lefranc M-P (1999) выше и Lefranc M-P et al., (1999) выше).

В определенных аспектах CDR антитела или его антигенсвязывающего фрагмента могут быть определены в соответствии с MacCallum RM et al., (1996) *J Mol Biol* 262: 732-745. См. также, например, Martin A. "Protein Sequence and Structure Analysis of Antibody Variable Domains," в *Antibody Engineering*, Kontermann и Dübel, eds., Chapter 31, pp. 422-439, Springer-Verlag, Berlin (2001). В конкретном варианте осуществления в настоящем документе предложены фармацевтические композиции, содержащие антитела или антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связываются с B7-H4 (например, B7-H4 человека) и содержат CDR VH и VL, из антитела 20502, перечисленные в табл. 3 и 4, как определено методом из MacCallum RM et al.

В определенных аспектах CDR антитела или его антигенсвязывающего фрагмента могут быть определены в соответствии со схемой нумерации AbM, которая относится к гипервариабельным областям AbM, и которая представляют собой компромисс между CDR по Кабат и структурными петлями Чотиа, и используется в программном обеспечении для моделирования антител AbM Oxford Molecular (Oxford Molecular Group, Inc.). В конкретном варианте осуществления в настоящем документе предложены фармацевтические композиции, содержащие антитела или антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связываются с B7-H4 (например, B7-H4 человека) и содержат CDR VH и VL из антитела 20502,

перечисленные в табл. 3 и 4, как определено схемой нумерации AbM.

В конкретных аспектах в настоящем документе предложены фармацевтические композиции, содержащие антитела, которые содержат тяжелую цепь и легкую цепь.

Что касается легкой цепи, в конкретном варианте осуществления легкая цепь антитела, описанного в настоящем документе, представляет собой легкую цепь каппа. Константная область легкой цепи каппа человека может содержать следующую аминокислотную последовательность:

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNFYFPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ

DSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:23).

Константная область легкой цепи каппа человека может кодироваться следующей нуклеотидной последовательностью:

CGGACCGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAA
TCTGGAACCTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAA
GTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAC
AGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCA
AAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTG
AGCTCGCCCGTCAAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT (SEQ ID NO:24).

В конкретном варианте осуществления изобретения антитела, которое иммуноспецифически связывается с полипептидом B7-H4 (например, B7-H4 человека) фармацевтическая композиция, описанная в настоящем документе, включает легкую цепь, причем аминокислотная последовательность домена VL содержит множество последовательностей указанных в табл. 4, и при этом константная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность константной области легкой цепи каппа человека.

В конкретном варианте осуществления изобретения антитела, которое иммуноспецифически связывается с B7-H4 (например, B7-H4 человека) фармацевтическая композиция, описанная в настоящем документе, включает тяжелую цепь, причем аминокислотная последовательность домена VH содержит множество аминокислотных последовательностей указанных в табл. 3, и при этом константная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность константной области тяжелой цепи гамма.

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

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSQVHTFPAVLQSS
GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPELGG
PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY
NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR
DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK
SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:25).

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

GCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCT
GGGGGCACAGCGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTCCCCGAACCGGTGAC
GGTGTCTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCTCT
ACAGTCTCAGGACTTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCTCCAGCAGCTT
GGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGG
ACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCCA
GCACCTGAACTCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAACCAAGGAC
ACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCAC
GAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGC
CAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGGGTGGTACGCGTC
CTCACCGTCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTC
CAACAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGCCAAAGGGCAGC
CCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAAC
CAGGTACGCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAG
TGGGAGAGCAATGGGCAGCCGAGAACAACCTACAAGACCACGCTCCCGTGTGGGA
CTCCGACGGCTCTTCTTCTTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCA

GCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACAC

GCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTA. (SEQ ID NO:26)

В конкретном варианте осуществления антитело, которое иммуноспецифически связывается с B7-N4 (например, B7-N4 человека) в фармацевтической композиции, описанной в настоящем документе, включает домен VH и домен VL, содержащий аминокислотную последовательность любого VH и VL доменов, описанных в настоящем документе, и при этом константные области содержат аминокислотные последовательности константных областей молекулы иммуноглобулина IgG (например, IgG человека). В другом конкретном варианте осуществления антитело, которое иммуноспецифически связывается с B7-N4 (например, B7-N4 человека), для использования в фармацевтической композиции, описанной в настоящем документе, включает домен VH и домен VL, содержащий аминокислотную последовательность любого VH и VL доменов, описанных в настоящем документе, и при этом константные области содержат аминокислотные последовательности константных областей молекулы иммуноглобулина IgG₁ (например, IgG₁ человека).

Антитела с пониженным содержанием фукоз, как сообщалось, обладают повышенной аффинностью к рецепторам Fc, таким как, например, FcγRIIIA. Соответственно, в определенных вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент в фармацевтической композиции, описанной в настоящем документе, имеет пониженное содержание фукозы или не содержит фукозы (то есть является "афукозилированным"). Такие антитела или их антигенсвязывающие фрагменты могут быть получены с использованием методик, известных специалисту в данной области техники. Например, они могут быть экспрессированы в клетках с дефицитом или отсутствием способности к фукозилрованию. В конкретном примере клеточные линии с нокаутом обоих аллелей гена α1,6-фукозилтрансферазы (FUT8) могут быть использованы для получения антител или их антигенсвязывающих фрагментов с пониженным содержанием фукозы. Potelligent © система (Lonza) является примером такой системы, которая может быть использована для получения антител и антигенсвязывающих их фрагментов с пониженным содержанием фукозы. Альтернативно, антитело или антигенсвязывающие фрагменты с пониженным содержанием фукозы или не содержащие фукозу, могут быть получены, например (i) культивирование клетки в условиях, которые предотвращают или уменьшают фукозилрование; (ii) посттрансляционным удалением фукозы (например, с помощью фермента фукозидазы); (iii) посттрансляционным добавлением желаемых углеводов, например, пострекомбинантной экспрессией 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 и Imai-Nishiya H et al., (2007) BMC Biotechnol. 7: 84 для способов получения антител не содержащих фукозу или с пониженным содержанием фукозы.

В некоторых вариантах осуществления афукозилированное B7-N4 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент обладает повышенной ADCC активностью *in vitro* по сравнению с фукозилированными B7-N4 антителами или их антигенсвязывающими фрагментами, имеющими одинаковую аминокислотную последовательность. В некоторых вариантах осуществления афукозилированные антитела B7-N4 или их антигенсвязывающие фрагменты вызывают специфический лизис, который на 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 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 процентов больше, чем специфический лизис вызванный фукозилированными антителами B7-N4.

В некоторых вариантах осуществления B7-N4 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент имеет усиленное сродство к Fc гамма RIIIА по сравнению с фукозилированными антителами B7-N4 или их антигенсвязывающими фрагментами, имеющими одинаковую аминокислотную последовательность. В некоторых вариантах осуществления афукозилированные антитела B7-N4 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 с большим сродством, чем фукозилированные антитела B7-N4 или их антигенсвязывающие фрагменты. В некоторых вариантах осуществления аффинность 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).

В некоторых вариантах осуществления присутствие фукозы может быть определено способом, включающим высокоэффективную жидкостную хроматографию (ВЭЖХ), капиллярный электрофорез или масс-спектрометрию MALDI-TOF.

В конкретных вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (i) содержат последовательности CDR 20502, последовательности VH и VL 20502 или последовательности тяжелой и легкой цепей 20502 и (ii) являются афукозилированными.

В конкретных вариантах осуществления композиция содержит антитело или их антигенсвязываю-

щие фрагменты, которые (i) содержат последовательности CDR 20502, последовательности VH и VL 20502 или последовательности тяжелой и легкой цепей 20502 и (ii) являются афукозилированными, например, в которых по меньшей мере 95% антител в композиции являются афукозилированными или при этом фукозилирование является не обнаруживаемым в композиции.

Инженерные гликоформы могут быть полезны для различных целей, включая, но не ограничиваясь, усиление или уменьшение эффекторной функции. Способы получения сконструированных гликоформ в антителе или его антигенсвязывающем фрагменте, описанные в настоящем документе, включают, но не ограничиваются ими, те, которые описаны, 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 № US 2007/0248600; 2007/0178551; 2008/0060092; и 2006/0253928; международных патентных публикациях № WO 00/61739; WO 01/292246; WO 02/311140; и WO 02/30954; технологии Potelligent™ (Biowa, Inc. Принстон, Нью Джерси); и технологии конструирования гликозилирования GlycoMAB® (Glycart biotechnology AG, Цюрих, Швейцария). См. также, например, Ferrara C et al., (2006) *Biotechnol Bioeng* 93: 851-861; международные патентные публикации № WO 07/039818; WO 12/130831; WO 99/054342; WO 03/011878; и WO 04/065540.

В определенных вариантах осуществления любые из мутаций или модификаций константной области, описанных в настоящем документе, могут быть введены в одну или обе константные области тяжелой цепи антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, описанного в настоящем документе, имеющего две константные области тяжелой цепи.

В другом конкретном варианте осуществления изобретения, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанный в настоящем документе, который иммуноспецифически связывается с B7-H4 (например, B7-H4 человека), содержит тяжелую и легкую цепь, причем (i) тяжелая цепь содержит домен VH, содержащий аминокислотные последовательности CDR1 VH, CDR2 VL и CDR3 VL антитела 20502, перечисленные в табл. 1; (ii) легкая цепь содержит домен VL, содержащий аминокислотные последовательности CDR1 VL, CDR2 VH и CDR3 VH антитела 20502, перечисленные в табл. 2; (iii) тяжелая цепь дополнительно содержит константный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность константного домена тяжелой цепи IgG 1 человека; и (iv) легкая цепь дополнительно содержит константный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность константного домена легкой цепи каппа человека.

В другом конкретном варианте осуществления изобретения, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанный в настоящем документе, который иммуноспецифически связывается с B7-H4 (например, B7-H4 человека), содержит тяжелую и легкую цепь, причем (i) тяжелая цепь содержит домен VH, содержащий аминокислотную последовательность домена VH антитела 20502, перечисленную в табл. 3; (ii) легкая цепь содержит домен VL, содержащий аминокислотную последовательность домена VL антитела 20502, перечисленную в табл. 4; (iii) и 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 цепи каппа человека.

В конкретных вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в настоящем документе, которые иммуноспецифически связываются с B7-H4 (например, B7-H4 человека), проявляют активность по отношению к блокаде активности контрольной точки Т-клеток. В конкретных вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в настоящем документе, которые иммуноспецифически связываются с B7-H4 (например, B7-H4 человека), увеличивают 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 B7-H4 (например, B7-H4 человека), усиливают пролиферацию Т-клеток. В конкретных вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в настоящем документе, которые иммуноспецифически связываются с B7-H4 (например, B7-H4 человека), усиливают пролиферацию CD4⁺ Т-клеток. В конкретных вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в настоящем документе, которые иммуноспецифически связываются с B7-H4 (например, B7-H4 человека), усиливают пролиферацию CD8⁺ Т-клеток.

В конкретных вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в настоящем документе, которые иммуноспецифически связываются с B7-H4 (например, B7-H4 человека), демонстрируют антителозависимую клеточноопосредованную цитотоксичность (ADCC). В конкретных вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в настоящем документе, которые иммуноспецифически связываются с B7-H4 (например, B7-H4 человека), демонстрируют антителозависимую клеточноопосредованную цитотоксичность (ADCC) на клеточных линиях с по меньшей мере 300000 молекул B7-H4 на поверхности клетки (например, клетки SK-BR-3). В

конкретных вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в настоящем документе, которые иммуноспецифически связываются с B7-H4 (например, B7-H4 человека), демонстрируют антителозависимую клеточноопосредованную цитотоксичность (ADCC) на клеточных линиях с по меньшей мере 100000 молекул B7-H4 на поверхности клетки (например, клетки HCC1569). В конкретных вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в настоящем документе, которые иммуноспецифически связываются с B7-H4 (например, B7-H4 человека), демонстрируют антителозависимую клеточноопосредованную цитотоксичность (ADCC) на клеточных линиях с по меньшей мере 50000 молекул B7-H4 на поверхности клетки (например, клетки ZR-75-1). В конкретных вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в настоящем документе, которые иммуноспецифически связываются с B7-H4 (например, B7-H4 человека), демонстрируют антителозависимую клеточноопосредованную цитотоксичность (ADCC) на клеточных линиях с по меньшей мере 30000 молекул B7-H4 на поверхности клетки (например, клетки MDA-MB-468). В конкретных вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в настоящем документе, которые иммуноспецифически связываются с B7-H4 (например, B7-H4 человека), демонстрируют антителозависимую клеточноопосредованную цитотоксичность (ADCC) на клеточных линиях с по меньшей мере 15000 молекул B7-H4 на поверхности клетки (например, клетки HCC1964).

В конкретном аспекте антигенсвязывающий фрагмент, как описано в настоящем документе, который иммуноспецифически связывается с B7-H4 (например, B7-H4 человека), выбран из группы, состоящей из Fab, Fab', F(ab')₂, и ScFv, причем Fab, Fab', F(ab')₂ или ScFv содержит последовательность вариабельной области тяжелой цепи и вариабельной области легкой цепи последовательности антитела к B7-H4 или его антигенсвязывающего фрагмента, как описано в настоящем документе. Fab, Fab', F(ab')₂ или scFv могут быть получены любым способом, известным специалистам в данной области техники. В некоторых вариантах осуществления Fab, Fab', F(ab')₂ или ScFv дополнительно содержат фрагмент, который увеличивает период полураспада антитела *in vivo*. Фрагмент также называют "фрагмент, увеличивающий период полураспада". Могут быть использованы любые фрагменты, известные специалистам в данной области техники для увеличения периода полураспада Fab, Fab', F(ab')₂ или ScFv *in vivo*. Например, фрагмент, увеличивающий период полураспада, может включать Fc область, полимер, альбумин или альбумин-связывающий белок или соединение. Полимер может включать природный или синтетический, необязательно замещенный полиалкилен с прямой или разветвленной цепью, полиалкенилен, полиоксилалкилен, полисахарид, полиэтиленгликоль, полипропиленгликоль, поливиниловый спирт, метоксиполиэтиленгликоль, лактозу, амилозу, декстран, гликоген или их производное. Заместители могут включать одну или более гидроксильные, метильные или метоксигруппы. В некоторых вариантах осуществления Fab, Fab', F(ab')₂ или ScFv могут быть изменены путем добавления одной или более C-концевых аминокислот для прикрепления фрагмента, увеличивающего период полураспада. В некоторых вариантах осуществления изобретения фрагмент, увеличивающий период полураспада, представляет собой полиэтиленгликоль или сывороточный альбумин человека. В некоторых вариантах осуществления Fab, Fab', F(ab')₂ или ScFv слит с Fc областью.

5.4 Производство антител и полинуклеотидов.

Антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые иммуноспецифично связываются с B7-H4 (например, B7-H4 человека) могут быть получены любым способом, известным в данной области техники для синтеза антител и антигенсвязывающих их фрагментов, например, химическим синтезом или методами рекомбинантной экспрессии. Способы, описанные в настоящем документе используют, если не указано иное, обычные методы молекулярной биологии, микробиологии, генетического анализа, рекомбинантной ДНК, органической химии, биохимии, ПНР, синтеза олигонуклеотидов и их модификации, гибридизации нуклеиновых кислот, и методы смежных областей в пределах области техники. Эти методики описаны, например, в ссылках, цитируемых в настоящем документе, и полностью объяснены в литературе. См., например, Sambrook J et al., (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY; Ausubel FM et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons (1987 and annual updates); *Current Protocols in Immunology*, John Wiley & Sons (1987 and annual updates) Gait (ed.) (1984) *Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach*, IRL Press; Eckstein (ed.) (1991) *Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach*, IRL Press; Birren B et al., (eds.) (1999) *Genome Analysis: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press.

В определенных аспектах в настоящем документе предлагаются фармацевтические композиции, содержащие антитело к B7-H4 или антигенсвязывающий фрагмент, причем антитела или фрагменты продуцируются рекомбинантной экспрессией полинуклеотида, содержащего нуклеотидную последовательность, в соответствующей клетке-хозяине.

В определенных аспектах антитело к B7-H4 или его антигенсвязывающий фрагмент в фармацевтических композициях, представленных в настоящем документе, содержит вариабельную область тяжелой цепи, кодируемую полинуклеотидом, содержащим нуклеотидную последовательность, представленную в табл. 9 (то есть SEQ ID NO: 27). В определенных аспектах антитело к B7-H4 или его антигенсвязывающий фрагмент в фармацевтических композициях, представленных в настоящем документе, содержит

вариабельную область тяжелой цепи, кодируемую полинуклеотидом, содержащим нуклеотидную последовательность, представленную в табл. 9 (то есть SEQ ID NO: 27), и нуклеотидную последовательность, кодирующую константную область тяжелой цепи гамма (γ) человека. В определенных аспектах антитело к B7-H4 или его антигенсвязывающий фрагмент в фармацевтических композициях, представленных в настоящем документе, содержит вариабельную область тяжелой цепи, кодируемую полинуклеотидом, содержащим нуклеотидную последовательность, представленную в табл. 9 (то есть SEQ ID NO: 27), и константный домен тяжелой цепи, кодируемый полинуклеотидом, содержащим нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 26.

Таблица 9

Полинуклеотидные последовательности, кодирующие
вариабельную область тяжелой цепи

Анти- тело	Полинуклеотидная последовательность, кодирующая вариабельную область тяжелой цепи (SEQ ID NO)
20502	CAGCTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCAGGACTGGTGAAGCCTTCGGAG ACCCTGTCCCTCACCTGCACTGTCTCTGGTGGCTCCATCAAAAGTGGTA GTTACTACTGGGGCTGGATCCGCCAGCCCCAGGGAAGGGGCTGGAGT GGATTGGGAACATCTATTATAGTGGGAGCACCTACTACAACCCGTCCCT CAGAAGTCGAGTCACCATATCCGTAGACACGTCCAAGAACCAGTTCTC CCTGAAGCTGAGTTCTGTGACCGCCGACACGGCGGTGTACTACTG CGCCAGAGAAGGATCTTACCCCAATCAGTTTGATCCATGGGGACAGGG TACATTGGTCACCGTCTCCTCA (SEQ ID NO:27)

В определенных аспектах антитело к B7-H4 или его антигенсвязывающий фрагмент в фармацевтических композициях, представленных в настоящем документе, содержит вариабельную область легкой цепи, кодируемую полинуклеотидом, содержащим нуклеотидную последовательность, представленную в табл. 10 (то есть SEQ ID NO: 28). В определенных аспектах антитело к B7-H4 или его антигенсвязывающий фрагмент в фармацевтических композициях, представленных в настоящем документе, содержит вариабельную область легкой цепи, кодируемую полинуклеотидом, содержащим нуклеотидную последовательность, представленную в табл. 10 (то есть SEQ ID NO: 28), и нуклеотидную последовательность, кодирующую константную область легкой цепи лямбда человека. В определенных аспектах антитело к B7-H4 или его антигенсвязывающий фрагмент в фармацевтических композициях, представленных в настоящем документе, содержит вариабельную область легкой цепи, кодируемую полинуклеотидом, содержащим нуклеотидную последовательность, представленную в табл. 10 (то есть SEQ ID NO: 28), и константный домен легкой цепи, кодируемый полинуклеотидом, содержащим нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 24.

Таблица 10

Полинуклеотидные последовательности, кодирующие
вариабельную область легкой цепи

Антитело	Полинуклеотидная последовательность, кодирующая вариабельную область легкой цепи (SEQ ID NO)
20502	GAAATAGTGATGACGCAGTCTCCAGCCACCCTGTCTGTCTCCAGGG GAAAGAGCCACCCTCTCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCAA CTTAGCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCAT STATGGTGCATCCACCAGGGCCACTGGTATCCAGCCAGGTTCACTGG CAGTGGGTCTGGGACAGAGTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGTC TGAAGATTTTGCAGTTTACTGTGTCAGCAGTACCCTCCTTCCCTTC ACTTTTGGCGGAGGGACCAAGGTTGAGATCAAA (SEQ ID NO:28)

В определенных аспектах антитело к B7-H4 или его антигенсвязывающий фрагмент в фармацевтических композициях, представленных в настоящем документе, содержит вариабельную область тяжелой цепи, кодируемую полинуклеотидом, содержащим нуклеотидную последовательность, кодирующую вариабельную область тяжелой цепи, представленную в табл. 9 (т.е. SEQ ID NO: 27) и вариабельную легкую цепь, кодируемую полинуклеотидом, содержащим нуклеотидную последовательность, кодирующую вариабельную легкую цепь, представленную в табл. 10 (то есть, SEQ ID NO: 28).

В определенных аспектах антитело к B7-H4 или его антигенсвязывающий фрагмент в фармацевтических композициях, представленных в настоящем документе, включает (i) тяжелую цепь, кодируемую полинуклеотидом, содержащим нуклеотидную последовательность, кодирующую вариабельную область

тяжелой цепи, представленную в табл. 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 легкую цепь, представленную в табл. 10 (т.е. SEQ ID NO: 28) и нуклеотидную последовательность, кодирующую константную область легкой цепи лямбда человека.

В определенных аспектах антитело к B7-H4 или его антигенсвязывающий фрагмент в фармацевтических композициях, представленных в настоящем документе, включает (i) тяжелую цепь, кодируемую полинуклеотидом, содержащим нуклеотидную последовательность, кодирующую переменную область тяжелой цепи, представленную в табл. 9 (т.е. SEQ ID NO: 27) и нуклеотидную последовательность, кодирующую константный домен тяжелой цепи SEQ ID NO:26, и (ii) легкую цепь, кодируемую полинуклеотидом, содержащим нуклеотидную последовательность, кодирующую переменную легкую цепь, представленную в табл. 10 (т.е. SEQ ID NO: 28) и нуклеотидную последовательность, кодирующую константный домен легкой цепи SEQ ID NO:24.

В некоторых аспектах, антитела к B7-H4 или антигенсвязывающие фрагменты в фармацевтических композициях, представленных в настоящем документе кодируются полинуклеотидами, кодирующими антитела к B7-H4 или их антигенсвязывающие фрагменты или домены, которые оптимизированы, например путем оптимизации кодонов/РНК, замены гетерологичными сигнальными последовательностями и удаления элементов нестабильности мРНК. Способы для генерирования оптимизированных нуклеиновых кислот, кодирующих антитело к B7-H4 или его антигенсвязывающий фрагмент или домен (например, тяжелую цепь, легкую цепь, домен VH, или домен VL) для рекомбинантной экспрессии путем внесения изменений в кодоны (например, изменение кодона, кодирующего ту же аминокислоту из-за вырожденности генетического кода) и/или устранение ингибирующие области в мРНК может быть осуществлено путем адаптации способов оптимизации описанных, например, патентах США № 5965726; 6174666; 6291664; 6414132; и 6 794498, соответственно.

Полинуклеотиды могут быть, например, в форме РНК или в форме ДНК. ДНК включает кДНК, геномную ДНК и синтетическую ДНК. ДНК может являться двухцепочечной или одноцепочечной. Будучи одноцепочечной, ДНК может являться кодирующей цепью или не кодирующей (антисмысловой) цепью. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид представляет собой кДНК или ДНК, в которой отсутствует один или более интронов. В определенных вариантах осуществления полинуклеотид представляет собой не встречающийся в природе полинуклеотид. В определенных вариантах осуществления полинуклеотид продуцируется рекомбинантно. В определенных вариантах осуществления полинуклеотиды являются изолированными. В определенных вариантах осуществления полинуклеотиды являются по существу чистыми. В определенных вариантах осуществления полинуклеотид очищают от природных компонентов.

В некоторых аспектах, векторы (например, векторы экспрессии) содержат нуклеотидные последовательности, кодирующие антитела к B7-H4 и их антигенсвязывающие фрагменты или домен, для рекомбинантной экспрессии в клетках-хозяевах, предпочтительно в клетках млекопитающих. В некоторых аспектах, клетки, например, клетки-хозяева, включают в себя такие векторы для рекомбинантной экспрессии антитела к B7-H4 или его антигенсвязывающего фрагмента, описанных в настоящем документе (например, человеческие или гуманизированные антитела или антигенсвязывающие фрагменты). Таким образом, способ получения антитела или его антигенсвязывающих фрагментов для применения в фармацевтической композиции, описанной в настоящем документе, может включать экспрессию такого антитела или его антигенсвязывающего фрагмента в клетке-хозяине.

Вектор экспрессии может быть перенесен в клетку (например, клетку-хозяина) с помощью обычных методик и полученные клетки могут быть затем культивированы с помощью обычных методов для получения антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, описанных в настоящем документе (например, антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, содержащих шесть CDR, VH, VL, VH и VL, тяжелую цепь, легкую цепь, или тяжелую и легкую цепь 20502) или их домена (например, VH, VL, VH и VL, тяжелую и легкую цепь 20502).

В некоторых вариантах осуществления, антитела к B7-H4 или антигенсвязывающий фрагмент (например, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, включающий CDR из 20502) в фармацевтических композициях, представленных в настоящем документе производятся в клетках Potelligent® CHOK1SV.

В некоторых вариантах осуществления, антитела к B7-H4 или антигенсвязывающие фрагменты (например, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, включающий CDR из 20502) в фармацевтических композициях, представленных в настоящем документе производятся в клетке-хозяине, в которой не хватает функционирующего гена альфа-1,6-фукозилтрансферазы (FUT8). В некоторых вариантах осуществления клетка-хозяин представляет собой клетку CHO.

В конкретных вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент в фармацевтических композициях, представленных в настоящем документе, выделяют или очищают. Обычно изолированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляет собой такое, которое

по существу не содержит других антител или их антигенсвязывающих фрагментов с антигенной специфичностью, отличной от выделенного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента. Например, в конкретном варианте осуществления состав антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, описанный в настоящем документе, по существу не содержит клеточного материала и/или химических предшественников.

5.5 Терапевтические применения и способы.

В одном аспекте в настоящем документе предлагаются способы модуляции одной или более иммунных функций у субъекта, включающие введение субъекту, нуждающемуся в этом, фармацевтической композиции, представленной в настоящем документе, содержащей антитело к В7-Н4 или его антигенсвязывающий фрагмент.

В другом варианте осуществления фармацевтическая композиция, представленная в настоящем документе, содержащая антитело к В7-Н4 или его антигенсвязывающий фрагмент, вводится пациенту (например, пациенту-человеку) для усиления пролиферации Т-клеток, CD4+ Т-клеток или CD8+ Т-клеток у пациента. В другом варианте осуществления фармацевтическая композиция, представленная в настоящем документе, содержащая антитело к В7-Н4 или его антигенсвязывающий фрагмент, вводится пациенту (например, пациенту-человеку) для увеличения выработки интерферона-гамма (IFN γ) у пациента. В другом варианте осуществления фармацевтическая композиция, представленная в настоящем документе, содержащая антитело к В7-Н4 или его антигенсвязывающий фрагмент, вводится пациенту (например, пациенту-человеку) для блокирования ингибирующей активности В7-Н4 в отношении Т-клеток у пациента. В другом варианте осуществления фармацевтическая композиция, представленная в настоящем документе, содержащая антитело к В7-Н4 или его антигенсвязывающий фрагмент, вводится пациенту (например, пациенту-человеку) для удаления экспрессирующих В7-Н4 раковых клеток у пациента. В другом варианте осуществления фармацевтическая композиция, представленная в настоящем документе, содержащая антитело к В7-Н4 или его антигенсвязывающий фрагмент, вводится для достижения двух или более из указанных выше эффектов.

В определенном варианте осуществления в настоящем документе предлагаются способы лечения рака, например рака, экспрессирующего В7-Н4, включающие введение фармацевтической композиции, содержащей антитело к В7-Н4 или его антигенсвязывающий фрагмент, предложенные в настоящем документе, пациенту (например, пациенту-человеку), нуждающемуся в этом. В определенном варианте осуществления в настоящем документе предлагаются способы лечения солидной опухоли, например солидной опухоли, экспрессирующей В7-Н4, включающие введение фармацевтической композиции, содержащей антитело к В7-Н4 или его антигенсвязывающий фрагмент, предложенные в настоящем документе, пациенту (например, пациенту-человеку), нуждающемуся в этом.

В определенном варианте осуществления настоящего изобретения предложены фармацевтические композиции для лечения рака, выбранного из группы, состоящей из: рака молочной железы (например, рак молочной железы, тройной негативный рак молочной железы, положительный на рецептор гормона (HR) рак молочной железы или рак протоков), рака эндометрия, рака яичника, рака уротелия, немелкоклеточного рака легкого (например, плоскоклеточный рак), рака поджелудочной железы, рака щитовидной железы, рака почки (например, почечно-клеточный рак) и рака мочевого пузыря (например, уротелиально-клеточный рак). В определенном варианте осуществления настоящего изобретения предложены фармацевтические композиции для лечения прогрессирующего рака молочной железы (в том числе тройного негативного рака молочной железы и положительного на рецептор гормона (HR) рака молочной железы), рака яичников, рака эндометрия, или уротериального рака. В определенном варианте осуществления настоящего изобретения предложены фармацевтические композиции для лечения рака молочной железы. В определенном варианте осуществления настоящего изобретения предложены фармацевтические композиции для лечения рака яичников. В определенном варианте осуществления настоящего изобретения предложены фармацевтические композиции для лечения рака эндометрия. В определенном варианте осуществления настоящего изобретения предложены фармацевтическими композициями для лечения уротериального рака.

В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой рак, экспрессирующий В7-Н4.

В другом варианте осуществления фармацевтическую композицию, предложенную в настоящем описании, вводят пациенту (например, пациенту-человеку) с диагнозом рак, чтобы усилить пролиферацию Т-клеток, CD4+ Т-клеток, или CD8+ Т-клеток у пациента. В другом варианте осуществления фармацевтическую композицию, представленную в настоящем документе, вводят пациенту (например, пациенту-человеку), с диагнозом рак, для увеличения выработки интерферона-гамма (IFN γ) у пациента. В другом варианте осуществления фармацевтическую композицию, представленную в настоящем документе, вводят пациенту (например, пациенту-человеку), с диагнозом рак, чтобы заблокировать ингибирующую активность В7-Н4 в отношении Т-клеток у пациента. В другом варианте осуществления фармацевтическую композицию, представленную в настоящем документе, вводят пациенту (например, пациенту-человеку), с диагнозом рак, чтобы истощить экспрессирующие В7-Н4 раковые клетки у пациента.

Фармацевтические композиции, описанные в настоящем документе, могут быть доставлены паци-

енту с помощью внутривенного введения. Обычно пациент является человеком, но могут поддаваться лечению млекопитающие, не являющиеся человеком, включая трансгенные млекопитающие.

6. Примеры

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

Пример 1. Способы, использованные в исследованиях составов.

I. Производство антител.

Антитела 20502 были получены в клеточной линии CHO, в которой отсутствует ген FUT8 (α 1,6-фукозилтрансфераза), поэтому антитела 20502, используемые во всех Примерах 2-9, являются афукозилированными. У них отсутствует концевая фукоза при ASN297 в Fc-части антитела.

II. Общая процедура составления.

Образцы моноклонального антитела (mAb) получали в различных составах путем диализа лекарственного вещества, не содержащего полисорбата (афукозилированное 20502), с использованием диализных мембранных устройств с отсечением по молекулярной массе в 20 кДа (MWCO). После диализа концентрацию моноклональных антител измеряли с помощью УФ-спектроскопии с использованием коэффициента экстинкции $1,47 \text{ см}^{-1}[\text{г/л}]^{-1}$. Концентрации белка в образцах, с замененным буфером, доводили до желаемых значений с помощью буфера для диализа, и 10% PS20 маточного раствора добавляли в каждый состав до конечной концентрации 0,05% (мас./об.) PS20. Составы стерильно фильтровали с использованием фильтровальных блоков 0,22 мкм и помещали в соответствующие системы контейнеров/укупорочных средств в вытяжном шкафу с ламинарным потоком. Образцы помещали в различные условия хранения в соответствии с дизайном исследования, и их стабильность анализировали с использованием различных способов в определенные моменты времени.

III. Аналитические способы.

Визуальный осмотр (AD-Gen-002/00): Визуальная оценка проводилась как на черном, так и на белом фоне при флуоресцентном освещении. Образцы были исследованы на цвет, прозрачность и наличие видимых частиц.

Концентрация белка (TM-150-001/00): Концентрацию белка определяли с помощью УФ-поглощения при длине волны 280 нм с использованием теоретических коэффициентов поглощения $1,47 \text{ см}^{-1}[\text{г/л}]^{-1}$. Образцы разбавляли до линейного диапазона поглощения с помощью фосфатно-солевого буфера Дульбекко (DPBS) и измеряли относительно DPBS в виде холостого раствора. Поглощение измеряли с использованием УФ-видимого спектрофотометра Agilent Cary 8454 (Agilent Technologies, Калифорния).

pH (AD-GEN-001/00): pH буфера определяли с помощью калиброванного устройства Beckman Coulter pH560 (Beckman Coulter, Inc., Калифорния).

Осмоляльность (TM-GEN-004/00): Осмоляльность буфера измеряли по давлению пара с использованием системы Wescor VAPRO (Wescor, Inc., Юта).

Дифференциальная сканирующая калориметрия (ДСК).

Измерения ДСК проводились на платформе MicroCal VP-Capillary DSC (GE Healthcare, Великобритания). Образцы mAb разводили в различных буферах составов до концентрации 1 мг/мл. В качестве эталона использовали буфер соответствующего состава. Образцы сканировали при температуре от 15 до 110°C со скоростью 1°C/мин. Данные сначала были нормализованы по концентрации белка, затем скорректированы по исходному уровню и значения для буфера были вычтены с помощью программного обеспечения Origin 7.0 (OriginLab, Массачусетс). Переходы плавления были проанализированы с помощью иницируемой курсором функции подгонки пика DSC с использованием модели развертывания без двух состояний в исходном программном обеспечении.

Температура развертыванияTM по системе UNIT: Температура развертывания (Tm) белка обеспечивает измерение физической стабильности молекулы. Температура развертывания определяется как температура, при которой в равновесии существуют равные количества нативного и денатурированного белка. Система UNIT от Unchained Labs (Калифорния) использует собственные флуоресцентные спектроскопические изменения для определения температуры, при которой происходит тепловое развертывание белка. Образцы в концентрации 1 мг/мл сканировали при температуре от 20 до 90°C со скоростью 1°C/мин. Tm определяли с использованием программного обеспечения Uncle от Unchained Labs (Калифорния).

Изоэлектрическое фокусирование под визуализационным контролем (iCE) (TM-150-003/02): Варианты заряда были проанализированы с помощью изоэлектрического фокусирования под визуализационным контролем (iCE) на приборе Protein Simple iCE3 с автоматическим пробоотборником 720 NV (ProteinSimple, Калифорния). Данные анализировали с использованием программного обеспечения iCE CFR, и относительные количества главных, кислых и основных пиков определяли путем интегрирования площади пиков, наблюдаемых в профиле, и использовали для расчета процентного содержания кислых и основных вариантов.

Эксклюзионная хроматография (SEC), (TM-150-004/00): Образцы были проанализированы на Agilent 1100 Series ВЭЖХ, снабженном детектором с диодной матрицей, и оптическую плотность измеряли

при 280 нм. Образцы разбавляли до 1 мг/мл в подвижной фазе (100 мМ фосфата натрия, 400 мМ хлорида натрия, pH 6,8) и 50 мкл вкалывали в предварительно уравновешенную колонку Sepax Zenix SEC-300 7,8×200 мм (Sepax Technologies, Inc., Делавэр). Разделительные SEC и защитные колонки использовались при 25°C. Скорость потока 1,0 мл/мин использовалась при длительности анализа 12 мин. Пики агрегатов, мономеров и фрагментов определяли количественно с использованием программного обеспечения для анализа данных.

Капиллярный электрофорез с гелем и додецилсульфатом натрия (CE-SDS) (TM-150-002/00): CE-SDS использовали для определения чистоты антитела В7-Н4 20502 при восстановительных и не восстановительных условиях. Образцы анализировали на системе Beckman Coulter PA800 plus (Beckman Coulter, Калифорния) с использованием капилляра с внутренним диаметром 50 мкм без покрытия. Поглощение наблюдали при 220 нм. Чистоту 20502 в восстановительных условиях определяли путем измерения площади пиков тяжелых и легких цепей и сравнения с общей площадью всех обнаруженных пиков. Чистоту 20502 в не восстановительных условиях определяли путем измерения площади главного пика интактного белка и сравнения с общей площадью всех обнаруженных пиков.

Частицы не видимые невооруженным глазом по НИАС (AD-GEN-006).

Счетчик частиц НИАС 9703+ (Nach, Колорадо), оборудованный детектором HRDL-150 и шприцем на 1 мл. Перед использованием система была промыта не содержащей частиц водой Milli-Q (Millipore, Массачусетс) для создания чистой базовой линии. Четыре последовательных аликвоты по 0,4 мл были взяты из образцов, и количество частиц из трех последних аликвот было усреднено и зарегистрировано.

Пример 2. Биохимический анализ аминокислотных остатков антитела 20502.

Антитело к В7-Н4 20502 представляет собой моноклональное антитело. Основанный на знаниях подход к составлению составов использовался для определения подходящих композиций, которые обеспечивают максимальную стабильность белка. Для этого учитывались как внутренние свойства молекулы, так и свойства компонентов состава, которые могут влиять на стабильность белка.

Аминокислотные последовательности полноразмерной тяжелой цепи и легкой цепи антитела 20502 показаны в табл. 11.

Таблица 11

Первичные аминокислотные последовательности полноразмерной тяжелой цепи и легкой цепи антитела 20502

Обозначение последовательности	Последовательность (SEQ ID NO)
Тяжелая цепь	QLLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSIKSGSYWGWIRQPPGKGLE WIGNIYYSGSTYYNPSLRSRVTVSDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYC AREGSYPNQFDPWQGTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAL GCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSS SLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPELGGPS VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE KTISKAKGQPREPVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTTTPVL DS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMH EALHNHYTQKSLSPGK (SEQ ID NO:21)
Легкая цепь	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSNLAWYQQKPGQAPRLLIY GASTRATGIPARFSGSGTEFTLTISSLQSEDFAVYYCQYHSPFTFG GGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQ WKVDNALQSGNSQESVTEQ DS KDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYAC EVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:22)

Анализ первичной последовательности 20502 показал, что некоторые аминокислотные остатки потенциально могут подвергаться биохимическим модификациям. К ним относятся дезамидирование при аспарагине, изомеризация при аспарагиновой кислоте и окисление при метионине, цистеине, гистидине, триптофана, фенилаланине и тирозине. Аспарагины, аспарагиновые кислоты и метионины, поддающиеся дезамидированию, изомеризации и окислению, соответственно, указаны жирным и серым квадратами в последовательностях в табл. 11. Потенциальные сайты биохимической деградации в 20502 отмечены в табл. 12. Эти потенциальные сайты деградации находятся вне областей CDR.

Таблица 12

Потенциальные аминокислотные остатки в 20502
для путей химической деградации

Пути деградации	Сайты	Количество сайтов
Деаминация	Аспарагин-глицин	2
	Аспарагин-серин	3
	Аспарагин-аспарагин	2
Изомеризация	Аспарагиновая кислота-глицин	2
	Аспарагиновая кислота-серин	3
Окисление	Метионин	3
	Гистидин	12
	Триптофан	11
	Цистеин	16 (четное число)
	Тирозин	30
	Фенилаланин	22

Чтобы разработать жидкий состав, который мог бы обеспечить хорошую стабильность для 20502, были оценены различные условия, такие как pH, типы буферов и вспомогательные вещества. Стабильность белка контролировали на основе биофизических и биохимических свойств 20502 в каждом примере. Детали исследований и их результаты описаны в настоящем документе.

Пример 3. Начальное скрининг pH.

pH состава влияет на стабильность белка. pH состава может влиять на пути биохимического разложения, такие как деаминация, изомеризация и окисление, а также на биофизическое разложения, такое как агрегация и фрагментация, вследствие взаимодействия между белками и окружающей их средой.

Скрининг pH был проведен для определения диапазона pH, который обеспечивает максимальную стабильность для 20502, и для понимания механизмов деградации белка в этих условиях. Детали состава, определяемые в исследовании, приведены в табл. 13.

Таблица 13

Составы, оцененные по влиянию pH на стабильность белка

№	20502 (мг/мл)	Состав ингредиентов и концентрации	% PS20 (масс./об.)	pH
1	1,0	20 mM Цитрат, 270 mM сахараза	0,05	4,0
2	1,0	20 mM Цитрат, 270 mM сахараза	0,05	5,0
3	1,0	20 mM гистидин, 270 mM сахараза	0,05	6,0
4	1,0	20 mM фосфат, 270 mM сахараза	0,05	7,0
5	1,0	20 mM Трис, 270 mM Сахараза	0,05	8,0

Чтобы определить термостабильность белка при различных pH, температуру разворачивания измеряли по изменению во внутренней флуоресценции при другой температуре с использованием прибора UNit. Сдвиг длины волны флуоресцентного излучения триптофана (среднее барицентрическое значение, ВСМ) указывает на то, что при нагревании образцов происходит событие разворачивания. Фиг. 1 показывает измеренную температуру разворачивания (Tm1) 20502 при различных условиях pH. Результаты показывают, что Tm1 зависит от pH. При более высоком pH (например, pH ≥ 7) наблюдалась температура разворачивания в 74°C. При pH 5 и 6 температуры разворачивания составляли 66°C и 70°C соответственно. При pH 4 температура разворачивания составляла 55°C. Кроме того, температура начала, по-видимому, составляла ~ 50°C с использованием pH 4, но температура начала составляла 62°C или выше с использованием pH 5-8. Эти результаты демонстрируют, что составы с pH ≥ 5 будут обеспечивать лучшую термическую стабильность, чем составы с pH 4.

Стабильность 20502 при различных значениях pH также оценивали в условиях стресса при 40°C в течение до четырех недель. Все образцы оставались прозрачными и бесцветными без каких-либо частиц, наблюдаемых на протяжении всего исследования. Изменения в агрегатах и фрагментах определяли с помощью эксклюзионной ВЭЖХ. В нулевой момент времени (T0) в исследуемых составах не было обна-

ружено видимых агрегатов для 20502 при концентрации 1 мг/мл. Через четыре недели при 40°C количество растворимых агрегатов заметно увеличилось в составах с рН 4, 7 и 8; только небольшое увеличение количества агрегатов наблюдалось в композициях с рН 5 или 6 (фиг. 2). Аналогичное влияние рН наблюдалось на образование фрагментов (фиг. 3). Результаты этого исследования показали, что 20502 наиболее стабильно при рН 5-6, как показано измерением эксклюзионной ВЭЖХ указанных свойств.

Пример 4. Детальный скрининг рН.

Результаты предварительного скринингового исследования рН показали, что антитело 20502 наиболее стабильно при рН 5-6. Было проведено детальное исследование рН для определения рН, которое обеспечивает максимальную стабильность в диапазоне от 4,5 до 6,5. Детали составов приведены в табл. 14. Это исследование было проведено с использованием цитратного буфера, чтобы минимизировать возможное влияние типов буферов на стабильность mAb. Стабильность антитела 20502 при 10 мг/мл исследовали на основе внешнего вида, агрегации, фрагментации (с помощью эксклюзионной ВЭЖХ) и вариантов заряда (iCE) в условиях стресса (40°C) в течение до трех недель.

Таблица 14

Составы, оцененные на детальное влияние рН на стабильность белка

№	Составы	% PS20 (масс./об.)	рН	Концентрация антител (мг/мл)
1	20 мМ цитрат, 270 мМ сахароза	0,05	4,5	10
2	20 мМ цитрат, 270 мМ сахароза	0,05	5,0	10
3	20 мМ цитрат, 270 мМ сахароза	0,05	5,5	10
4	20 мМ цитрат, 270 мМ сахароза	0,05	6,0	10
5	20 мМ цитрат, 270 мМ сахароза	0,05	6,5	10

Все образцы оставались прозрачными и бесцветными без каких-либо частиц, наблюдаемых на протяжении всего исследования. Результаты эксклюзионной ВЭЖХ показали, что низкий уровень агрегатов наблюдался для 20502 при концентрации 10 мг/мл в начале исследования (T0). Термический стресс в течение трех недель при 40°C приводил к зависящему от рН увеличению агрегации в порядке 4,5<5,0<5,5<6,0<6,5, в то время как фрагментация показала противоположную тенденцию (фиг. 4 и 5).

Данные iCE показали, что количество кислых вариантов увеличилось через 3 недели при 40°C. Увеличение количество кислых вариантов зависело от рН, причем порядок возрастания рН составлял 6,5/6,0/5,5<5,0<4,5 (фиг. 6).

Тот факт, что более высокие рН были связаны с повышенной агрегацией, а более низкие рН были связаны с повышенной фрагментацией, усложняло определение желаемого фармацевтического состава. В совокупности результаты исследования показывают, что составы с рН 5-6 обеспечивают наилучший общий профиль стабильности для 20502.

Пример 5. Скрининг буферов.

Как и рН, типы буферов в различной степени влияют на стабильность белка. Ускоренную стабильность 20502 при 10 мг/мл оценивали в ацетатном, цитратном, сукцинатном и гистидиновом буферах от рН 5,0 до 6,5 с шагом 0,5 единицы на основе их рКа с целью определения буфера, который обеспечит максимальную стабильность при рН 5,0 - 6,5. Подробные составы представлены в табл. 15. Эти буферы были исследованы на их влияние на стабильность белка на основе внешнего вида, агрегации, фрагментации и заряда.

Таблица 15

Виды буферов для составов, оцененные на их влияние на стабильность белка

№	Составы	% PS20 (масс./об.)	рН	Концентрация (мг/мл)
1	20 мМ ацетат, 270 мМ сахароза	0,05	5,0	10
2	20 мМ цитрат, 270 мМ сахароза	0,05	5,5	10
3	20 мМ сукцинат, сахароза 270 мМ	0,05	6,0	10
4	20 мМ гистидин, 270 мМ сахароза	0,05	6,5	10

Все образцы оставались прозрачными и бесцветными без каких-либо частиц, наблюдаемых на протяжении всего исследования. Результаты эксклюзионной ВЭЖХ, показанные на фиг. 16 показывают увеличение количества агрегатов в зависимости от буфера (рН) в этом исследовании. Агрегаты образовывались с более высокими скоростями при более высоком рН по сравнению со скоростью при более низком рН; в порядке гистидин (рН 6,5)> сукцинат (рН 6)> цитрат (рН 5,5)> ацетат (рН 5). С другой стороны, в ацетатном (рН 5) и цитратном (рН 5,5) буферах было обнаружено слегка меньшее количество фрагментов по сравнению с таковым в гистидиновых (рН 6,5) и сукцинатных (рН 6) буферах, хотя общие уровни

фрагментов были низкими (0,5% - 0,7%) в течение 3 недель при 40°C (фиг. 8).

Результаты iCE показали, что буферы оказали некоторое влияние на профиль заряда 20502, как показано на фиг. 9 и фиг. 10. Но общая разница между ними составляла чуть более 10% в кислых вариантах и около 2% в основных вариантах при хранении при 40°C в течение трех недель.

Антитело 20502 было испытано в двух других стандартных составах, содержащих гистидин, но ни один из них не привел к композиции с желаемой стабильностью. На основании этих результатов был сделан вывод о том, что 20502 наиболее стабильно в ацетатном буфере при pH 5 среди всех протестированных условий составов. Нитратный буфер при pH 5,5 также обеспечивает относительно стабильный буфер для 20502.

Пример 6. Скрининг вспомогательных веществ.

Вспомогательные вещества, такие как наполнители, могут влиять на стабильность продукта. Чтобы оценить влияние вспомогательных веществ на стабильность антитела 20502, антитело в концентрации 20 мг/мл готовили в виде ацетатного и цитратного составов, содержащих хлорид натрия (NaCl), трегалозу, сорбит или сахарозу в изотонических концентрациях. Цитратные составы были составлены при pH 5,5, а ацетатные составы были составлены при pH 5,0. Два дополнительных ацетатных состава с сахарозой также готовили при pH 4,5 и 5,5. Подробные составы представлены в табл. 16. Вспомогательные вещества были исследованы на их влияние на стабильность белка на основе внешнего вида, агрегации, фрагментации и вариантов заряда при условиях хранения 40°C, 25°C и 5°C.

Таблица 16

Вспомогательные вещества для составов, оцененные на их влияние на стабильность белка

ID	Буфер	Вспомогательные вещества	pH	% PS20 (масс./об.)	Концентрация (мг/мл)
1	20 mM цитрат	0,9% NaCl	5,5	0,05%	20,0
2	20 mM цитрат	10% трегалозы	5,5	0,05%	20,0
3	20 mM цитрат	4,7% сорбита	5,5	0,05%	20,0
4	20 mM цитрат	270 mM сахароза	5,5	0,05%	20,0
5	20 mM ацетат	0,9% NaCl	5,0	0,05%	20,0
6	20 mM ацетат	10% трегалозы	5,0	0,05%	20,0
7	20 mM ацетат	4,7% сорбита	5,0	0,05%	20,0
8	20 mM ацетат	270 mM сахароза	5,0	0,05%	20,0
9	20 mM ацетат	270 mM сахароза	4,5	0,05%	20,0
10	20 mM ацетат	270 mM сахароза	5,5	0,05%	20,0

Все образцы оставались прозрачными и бесцветными без каких-либо частиц, наблюдаемых в течение 4-недельного периода исследования. Результаты эксклюзионной ВЭЖХ, показанные на фиг. 11 показывают, что агрегаты 20502 образуются с более высокими скоростями в цитратных составах по сравнению с ацетатными составами. Скорость агрегации была самой высокой в составах с NaCl, и это было справедливо как для цитрата, так и для ацетата. Составы с сорбитом, трегалозой и сахарозой показали сходные изменения в агрегации как в цитратном, так и в ацетатном буферах. Что касается фрагментов, все составы были аналогичными, за исключением состава, содержащего ацетат и NaCl, который показал немного большее количество фрагментов (фиг. 12). Таким образом, хотя NaCl широко используется в фармацевтических композициях, он приводил к увеличению агрегации и фрагментации 20502. Количество фрагментов, наблюдаемых в этом исследовании, было выше, чем в предыдущих исследованиях. Это может быть связано с более высокой концентрацией белка (20 мг/мл), использованной в этом исследовании.

Вспомогательные вещества составов оказывали меньшее влияние на профиль заряда 20502 при хранении. Как показано на фиг. 13, разница в количестве кислых вариантов среди всех составов составляла менее чем 10%. Подобным образом, разница в количестве основных вариантов в пределах каждого типа буфера во всех составах составляла менее чем 2% (фиг. 14).

На основании результатов исследования вспомогательных веществ, выбрали сахарозу вместо NaCl из-за наблюдаемого уровня агрегатов. Сахароза показала схожий профиль агрегации и заряда, как и сорбит, и трегалоза. Тем не менее, сахароза является более надежной с точки зрения поставок сырья с лучшим качеством и опытом регулирования.

В совокупности результаты исследований pH, видов буферов и скрининга вспомогательных веществ показывают, что антитело 20502 было наиболее стабильным в составе, содержащем 20 mM ацетата, 270 mM сахарозы и 0,05% PS20 при pH 5,0. Состав, содержащий 20 mM цитрата, 270 mM сахарозы, 0,05% PS20 при pH 5,5, также обеспечивал хорошую стабильность.

Профиль дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК) антитела 20502 в составе, содержащем 20 mM ацетата, 270 mM сахарозы, 0,05% PS20 при pH 5,0, показан на фиг. 15. Наблюдалось два пика: $T_{m1} = 69^\circ\text{C}$ и $T_{m2} = 84^\circ\text{C}$.

Пример 7. Устойчивость к замораживанию-оттаиванию 20502.

Исследование замораживания/оттаивания проводили путем замораживания лекарственного вещества 20502, составленного в виде 20 мг/мл белка, в 20 mM ацетата, 270 mM сахарозы, 0,05% PS20 при pH

5,0 в количестве 500 мл при -70°C и оттаивания при температуре окружающей среды в течение 5 циклов. Никаких видимых изменений внешнего вида, растворимых агрегатов или твердых частиц не было обнаружено (табл. 17).

Таблица 17

Стабильность состава 20502 после замораживания-оттаивания

Временные точки (месяцы)	Температура ($^{\circ}\text{C}$)	Внешний вид		SEC			Не видимые невооруженным глазом Материя (всего / 1,7 мл флакон)			
		Прозрачность	Цвет	% ВММ	% Основной	% НММ	≥ 2 мкм	≥ 5 мкм	≥ 10 мкм	≥ 25 мкм
0FT	Заморожена при -70°C и оттаивала при комнатной температуре	Прозрачная	бесцветная	0,1	99,9	н/д	68	30	17	2
1FT		Прозрачная	бесцветная	0,1	99,9	н/д	38	11	2	0
2FT		Прозрачная	бесцветная	0,1	99,9	н/д	23	2	0	0
3FT		Прозрачная	бесцветная	0,1	99,9	н/д	34	9	0	0
4FT		Прозрачная	бесцветная	0,1	99,9	н/д	34	2	0	0
5FT		Прозрачная	бесцветная	0,1	99,9	н/д	25	2	0	0

Пример 8. Стабильность при перемешивании 20502.

На 20502 создавалось перемешивающее напряжение путем заполнения лекарственного вещества 20502 в стеклянные флаконы объемом 3 см^3 , размещения флакон с образцами горизонтально на орбитальном шейкере и встряхивания образцов при 300 об/мин в течение 72 часов при комнатной температуре. 20502 составляли в виде 20 мг/мл белка в 20 мМ ацетата, 270 мМ сахарозы, 0,05% PS20 при pH 5,0. В образцах состава 20502 не было обнаружено видимых изменений внешнего вида, растворимых агрегатов, профилей вариантов заряда или невидимых невооруженным глазом твердых частиц (табл. 18). Все исследования проводились при комнатной температуре $20\pm 5^{\circ}\text{C}$. Все образцы были прозрачны и бесцветны, и без видимых частиц.

Таблица 18

Стабильность состава 20502 после перемешивания в течение 72 ч

Время Точки	Состояние	SEC			iCE			Не видимые невооруженным глазом Материя (всего/1,7 мл флакон)			
		% ВММ	% Основной	% НММ	% Кислотных	% Основной	% Основных	≥ 2 мкм	≥ 5 мкм	≥ 10 мкм	≥ 25 мкм
0	Контроль	0,1	99,9	н/д	44,3	32,9	22,8	55	21	5	0
T24ч	Контроль	0,1	99,9	н/д	44,7	31,5	23,8	68	18	2	0
	Стресс	0,1	99,9	н/д	44,7	31,5	23,8	105	9	2	0
T48ч	Контроль	0,1	99,9	н/д	45,4	32,9	21,7	106	45	19	0
	Стресс	0,1	99,9	н/д	43,3	34,3	22,4	123	23	11	0
T72ч	Контроль	0,1	99,9	н/д	44,1	32,7	23,1	94	23	2	0
	Стресс	0,1	99,9	н/д	44,9	34,5	20,6	62	9	2	0

Пример 9. Подтверждение исследований по стабильности.

Исследование стабильности было выполнено для оценки стабильности 20502 в двух составах (i) состава, содержащего 20 мг/мл белка в 20 мМ ацетата, 270 мМ сахарозы и 0,05% PS20 при pH 5,0, и (ii) состава, содержащего 20 мг/мл белка в 20 мМ цитрата, 270 мМ сахарозы и 0,05% PS20 при pH 5,5. 1,5 мл приготовленных растворов помещали в стеклянные флаконы объемом 3 см^3 типа 1 с 13 мм горлышками, закрывали серыми бромбутиловыми пробками West 4023/50 для сыворотки толщиной 13 мм и герметизировали алюминиевыми уплотнениями. Совместимость системы контейнера/укупорки с антителом 20502 оценивали, помещая флаконы в перевернутые положения. Условия хранения при 5°C , 25°C и 40°C были использованы для этого исследования стабильности. Данные о стабильности за шесть месяцев, показанные в табл. с 19 по 21 для ацетатного состава и в табл. с 22 по 24 для цитратного состава.

Таблица 19

Стабильность лекарственного продукта 20502 в ацетатном составе при 5°C

Анализ	Критерий приемлемости	T0	2-8°C			
			1 месяц	2 месяца	3 месяца	6 месяцев
Визуальный внешний вид	От прозрачного до слегка опалесцирующего, от бесцветного до слегка желтоватого, может содержать несколько белковоподобных частиц	Соответствует требованиям	Соответствует требованиям	Соответствует требованиям	Соответствует требованиям	Соответствует требованиям
pH	4,5 – 5,5	4,9	4,9	5,0	4,9	5,0
Осмоляльность	270 - 370 мОсм/кг	321	325	337	324	323
Концентрация	18 - 22 мг/мл	19	19	20	20	20
iCIEF	% кислых пиков	37,8	37,9	36,4	35,3	37,2
	% Главных пиков	51,2	49,4	51,3	49,5	47,1
	% Основных пиков	11,0	12,7	12,2	15,2	15,8
SE-ВЭЖХ	≤5% агрегатов	0,2	0,1	0,1	0,2	0,2
	≥90% мономера	99,9	99,9	99,8	99,6	99,6
	% Низкомолекулярных	0	0	0,1	0,3	0,3
восстановленный CE-SDS	≥90% Тяжелой цепи и легкой цепи цепи	98,8	99,4	99,5	99,2	99,4
невосстановленный CE-SDS	Значение (% главного пика)	94,0	93,6	93,8	93,8	93,7
Активность по ИФА связыванию	50–150% контрольного материала	100	102	NT	99	106
Активность по ADCC	Результат (% контрольного материала)	107	NP	NP	NP	95

Сокращения: NP = не планировали; NT = не проверяли; T0 = время ноль.

Таблица 20

Стабильность лекарственного продукта 20502 в ацетатном составе при 25°C

Анализ	Критерий приемлемости	T0	25°C			
			1 месяц	2 месяца	3 месяца	6 месяцев
Визуальный Внешний вид	От прозрачного до слегка опалесцирующего, от бесцветного до слегка желтоватого, может содержать несколько белковоподобных частиц	Соответствует требованиям	Соответствует требованиям	Соответствует требованиям	Соответствует требованиям	Соответствует требованиям
pH	4,5 – 5,5	4,9	5,0	5,9	4,9	5,0
Осмоляльность	270 - 370 мОсм/кг	321	330	340	329	330
Концентрация	18 - 22 мг/мл	19	19	20	20	20

iCIEF	% кислых пиков	37,8	40,7	41,0	44,8	52,0
	% Главных пиков	51,2	47,0	47,2	41,3	35,5
	% Основных пиков	11,0	12,4	11,8	13,9	13,5
SE-ВЭЖХ	≤5% агрегатов	0,2	0,2	0,2	0,3	0,4
	≥90% мономера	99,9	99,7	99,5	99,0	99,6
	% Низкомолекулярных	0	0,1	0,3	0,7	1,0
Восстановленный CE-SDS	≥90% Тяжелой цепи и легкой цепи	98,8	99,1	99,4	98,8	98,6
невосстановленный CE-SDS	Значение (% главного пика)	94,0	93,3	92,8	92,1	91,2
Активность по ИФА связыванию	50–150% контрольного материала	100	101	NT	89	107
Активность по ADCC	Результат (% контрольного материала)	107	NP	NP	NP	80

Таблица 21

Стабильность лекарственного продукта 20502 в ацетатном составе при 40°C

Анализ	Критерий приемлемости	T0	40°C			
			2 недели	1 месяц	2 месяца	3 месяца
Визуальный Внешний вид	От прозрачного до слегка опалесцирующего, от бесцветного до слегка желтоватого, может содержать несколько белковоподобных частиц	Соответствует требованиям	Соответствует требованиям	Соответствует требованиям	Соответствует требованиям	Соответствует требованиям
pH	4,5 – 5,5	4,9	5,0	5,0	5,0	5,0
Осмоляльность	270 - 370 мОсм/кг	321	325	330	356	350
Концентрация	18 - 22 мг/мл	19	19	19	20	20
iCIEF	% кислых пиков	37,8	50,1	61,8	76,4	85,1
	% Главных пиков	51,2	37,6	28,5	16,3	7,5
	% Основных пиков	11,0	12,3	9,7	7,3	7,5
SE-ВЭЖХ	≤5% агрегатов	0,2	0,3	0,4	0,6	1,3
	≥90% мономера	99,9	99,3	98,8	97,6	95,0
	% Низкомолекулярных	0	0,4	0,8	1,9	3,7
восстановленный CE-SDS	≥90% Тяжелой цепи и легкой цепи	98,8	98,0	97,1	94,3	81,9
невосстановленный CE-SDS	Значение (% главного пика)	94,0	92,7	90,2	87,0	69,7
Активность по ИФА связыванию	50–150% контрольного материала	100	88	93	NT	73
Активность по ADCC	Результат (% контрольного материала)	107	NP	NP	NP	31

Таблица 22

Стабильность лекарственного продукта 20502 в цитратном составе при 5°C

Анализ	Критерий приемлемости	T0	2-8°C			
			1 месяц	2 месяца	3 месяца	6 месяца
Визуальный Внешний вид	От прозрачного до слегка опалесцирующего, от бесцветного до слегка желтоватого, может содержать несколько белковоподобных частиц	Соответствует требованиям	Соответствует требованиям	Соответствует требованиям	Соответствует требованиям	Соответствует требованиям
pH	5,0 – 6,0	5,5	5,5	5,5	5,5	5,5
Осмоляльность	270 - 370 мОсм/кг	330	333	343	329	326
Концентрация	18 - 22 мг/мл	21	21	21	20	21
iCIEF	% кислых пиков	37,6	38,0	36,8	35,7	37,3
	% Главных пиков	51,5	49,4	51,8	49,6	47,2
	% Основных пиков	11,0	12,6	11,4	14,6	15,5
эксклюзивная ВЭЖХ	≤5% агрегатов	0,2	0,3	0,3	0,4	0,5
	≥90% мономера	99,8	99,8	99,7	99,6	99,3
	% Низкомолекулярных	0	0	0,1	0	0,2
восстановленный CE-SDS	≥90% Тяжелой цепи и легкой цепи	99,1	99,5	99,7	98,8	99,3
невосстановленный CE-SDS	Значение (% главного пика)	94,1	93,5	93,6	93,9	93,3
Активность по ИФА связыванию	50–150% контрольного материала	105	114	NT	110	102
Активность по ADCC	Результат (% контрольного материала)	97	NP	NP	NP	94

Таблица 23

Стабильность лекарственного продукта 20502 в цитратном составе при 25°C

Анализ	Критерий приемлемости	T0	25°C			
			1 месяц	2 месяца	3 месяца	6 месяца
Визуальный Внешний вид	От прозрачного до слегка опалесцирующего, от бесцветного до слегка желтоватого, может содержать несколько белковоподобных частиц	Соответствует требованиям	Соответствует требованиям	Соответствует требованиям	Соответствует требованиям	Соответствует требованиям
pH	5,0 – 6,0	5,5	5,5	5,5	5,5	5,5
Осмоляльность	270 - 370 мОсм/кг	330	333	345	334	328
Концентрация	18 - 22 мг/мл	21	21	21	20	21
iCIEF	% кислых пиков	37,6	39,8	41,6	45,2	53,3
	% Главных пиков	51,5	48,2	47,0	40,7	33,4
	% Основных пиков	11,0	12,0	11,5	14,1	13,4
эксклюзивная ВЭЖХ	≤5% агрегатов	0,2	0,6	0,7	1,0	1,3
	≥90% мономера	99,8	99,3	99,1	98,5	97,9
	% Низкомолекулярных	0	0,1	0,2	0,5	0,9
восстановленный CE-SDS	≥90% Тяжелой цепи и легкой цепи	99,1	99,1	99,5	98,9	98,8
невосстановленный CE-SDS	Значение (% главного пика)	94,1	93,5	93,5	92,2	91,6
Активность по ИФА связыванию	50–150% контрольного материала	105	111	NT	106	97
Активность по ADCC	Результат (% контрольного материала)	97	NP	NP	NP	62

Стабильность лекарственного продукта 20502 в цитратном составе при 40°C

Анализ	Критерий приемлемости	T0	40°C			
			2 недели	1 месяц	2 месяца	3 месяца
Визуальный Внешний вид	От прозрачного до слегка опалесцирующего, от бесцветного до слегка желтоватого, может содержать несколько белковоподобных частиц	Соответствует требованиям	Соответствует требованиям	Соответствует требованиям	Соответствует требованиям	Соответствует требованиям
pH	5,0 – 6,0	5,5	5,5	5,5	5,5	5,5
Осмоляльность	270 - 370 мОсм/кг	330	334	336	359	344
Концентрация	18 - 22 мг/мл	21	20	21	19	20
iCIEF	% кислых пиков	37,6	50,6	59,5	74,5	82,9
	% Главных пиков	51,5	38,1	30,6	18,2	10,0
	% Основных пиков	11,0	11,3	9,9	7,3	7,2
эксклюзионная ВЭЖХ	≤5% агрегатов	0,2	1,0	1,3	1,8	2,7
	≥90% мономера	99,8	98,7	98,0	96,8	94,7
	% Низкомолекулярных	0	0,4	0,6	1,4	2,7
Восстановленный CE-SDS	≥90% Тяжелой цепи и легкой цепи	99,1	97,9	97,5	96,2	87,1
невосстановленный CE-SDS	Значение (% главного пика)	94,1	93,1	91,0	88,0	77,3
Активность по ИФА связыванию	50–150% контрольного материала	105	104	101	NT	82
Активность по ADCC	Результат (% контрольного материала)	97	NP	NP	NP	40

Данные о стабильности лекарственного средства 20502 в условиях длительного хранения при 2-8°C собирали в реальном времени в ацетатных и нитратных составах в течение 6 месяцев. Все данные о стабильности соответствовали критериям приемлемости (табл. 19 и табл. 22). Никакой четкой тенденции изменений стабильности не наблюдалось ни в одном из протестированных признаков. Результаты показывают, что лекарственное средство 20502 является стабильным в обоих составах в условиях длительного хранения при 2-8°C в течение по меньшей мере 6 месяцев.

Данные о стабильности при ускоренных условиях 25°C собирали в ацетатных и цитратных составах в течение 6 месяцев. В целом, хранение в ускоренных условиях в течение 6 месяцев привело к увеличению количества кислотных пиков и уменьшению главного пика, что определено с помощью iCE; небольшому увеличению количества агрегатов и фрагментов, что определено с помощью эксклюзионной ВЭЖХ; незначительному снижению чистоты, определяемое по восстановленному и не восстановленному CE-SDS; и небольшому снижению активности, что определено анализом ADCC в клетках. Никаких изменений в других свойствах продукта не наблюдалось. Все данные о стабильности были в пределах приемлемых критериев.

Данные об устойчивости при стрессовых условиях при 40°C собирали в течение 3 месяцев. Некоторые изменения были более заметны в данных, собранных с течением времени. Тенденции были аналогичны тем, которые были показаны в условиях ускоренного хранения (25°C). Наблюдали количества увеличения кислотных пиков и уменьшение главного пика и количества основных пиков по iCE. Увеличение количества агрегатов и фрагментов с уменьшением количества мономера наблюдали с помощью SE-ВЭЖХ. Кроме того, в этих условиях снижалась чистота, что продемонстрировано в результате анализа с восстановленным и не восстановленным CE-SDS. Также наблюдалось снижение активности в анализе ADCC в клетках. Эти результаты согласуются с ожидаемыми изменениями для белковых лекарственных средств, которые хранят в указанных условиях.

Вышеуказанные исследования были проведены для определения составов, которые обеспечивают максимальную стабильность для 20502. К ним относятся скрининг pH, выбор видов буферов и исследования выбора вспомогательных веществ. 20502 было наиболее стабильным в диапазоне pH 5-6 в ацетатном или цитратном буфере. 20502 также было стабильным, когда в качестве вспомогательного вещества использовалась сахароза. Был выбран состав, содержащий 20 мг/мл белка в 20 мМ ацетата, 270 мМ саха-

розы и 0,05% PS20 при pH 5,0. Также была выбран резервный состав в виде 20 мг/мл белка в 20 мМ цитрата, 270 мМ сахарозы, 0,05% PS20, pH 5,5.

Антитело 20502 также стабильно в ацетатном составе в условиях замораживания-оттаивания и перемешивания. Ожидается, что 20502 в ацетатном составе будет стабильным как в качестве лекарственного средства при хранении при -70°C, так и в качестве лекарственного средства при хранении при 2-8°C в течение по меньшей мере 12 месяцев.

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

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

Перечень последовательностей.

<110> ФАЙВ ПРАЙМ ТЕРАПЬЮТИКС, ИНК.

<120> СОСТАВЫ АНТИТЕЛА В7-Н4

<130> 3986.013PC01/EKS/CLD/M-S

<150> US 62/633 537

<151> 21.02.2018

<160> 28

<170> PatentIn версия 3.5

<210> 1

<211> 282

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> человеческий В7-Н4

<400> 1

Met Ala Ser Leu Gly Gln Ile Leu Phe Trp Ser Ile Ile Ser Ile Ile
1 5 10 15

Ile Ile Leu Ala Gly Ala Ile Ala Leu Ile Ile Gly Phe Gly Ile Ser
20 25 30

Gly Arg His Ser Ile Thr Val Thr Thr Val Ala Ser Ala Gly Asn Ile
35 40 45

Gly Glu Asp Gly Ile Leu Ser Cys Thr Phe Glu Pro Asp Ile Lys Leu
50 55 60

Ser Asp Ile Val Ile Gln Trp Leu Lys Glu Gly Val Leu Gly Leu Val
65 70 75 80

043376

His Glu Phe Lys Glu Gly Lys Asp Glu Leu Ser Glu Gln Asp Glu Met
85 90 95

Phe Arg Gly Arg Thr Ala Val Phe Ala Asp Gln Val Ile Val Gly Asn
100 105 110

Ala Ser Leu Arg Leu Lys Asn Val Gln Leu Thr Asp Ala Gly Thr Tyr
115 120 125

Lys Cys Tyr Ile Ile Thr Ser Lys Gly Lys Gly Asn Ala Asn Leu Glu
130 135 140

Tyr Lys Thr Gly Ala Phe Ser Met Pro Glu Val Asn Val Asp Tyr Asn
145 150 155 160

Ala Ser Ser Glu Thr Leu Arg Cys Glu Ala Pro Arg Trp Phe Pro Gln
165 170 175

Pro Thr Val Val Trp Ala Ser Gln Val Asp Gln Gly Ala Asn Phe Ser
180 185 190

Glu Val Ser Asn Thr Ser Phe Glu Leu Asn Ser Glu Asn Val Thr Met
195 200 205

Lys Val Val Ser Val Leu Tyr Asn Val Thr Ile Asn Asn Thr Tyr Ser
210 215 220

Cys Met Ile Glu Asn Asp Ile Ala Lys Ala Thr Gly Asp Ile Lys Val
225 230 235 240

Thr Glu Ser Glu Ile Lys Arg Arg Ser His Leu Gln Leu Leu Asn Ser
245 250 255

Lys Ala Ser Leu Cys Val Ser Ser Phe Phe Ala Ile Ser Trp Ala Leu
260 265 270

Leu Pro Leu Ser Pro Tyr Leu Met Leu Lys
275 280

<210> 2

<211> 282

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> В7-Н4 яванского макака

<400> 2

Met Ala Ser Leu Gly Gln Ile Leu Phe Trp Ser Ile Ile Ser Ile Ile
 1 5 10 15
 Phe Ile Leu Ala Gly Ala Ile Ala Leu Ile Ile Gly Phe Gly Ile Ser
 20 25 30
 Gly Arg His Ser Ile Thr Val Thr Thr Val Ala Ser Ala Gly Asn Ile
 35 40 45
 Gly Glu Asp Gly Ile Leu Ser Cys Thr Phe Glu Pro Asp Ile Lys Leu
 50 55 60
 Ser Asp Ile Val Ile Gln Trp Leu Lys Glu Gly Val Ile Gly Leu Val
 65 70 75 80
 His Glu Phe Lys Glu Gly Lys Asp Glu Leu Ser Glu Gln Asp Glu Met
 85 90 95
 Phe Arg Gly Arg Thr Ala Val Phe Ala Asp Gln Val Ile Val Gly Asn
 100 105 110
 Ala Ser Leu Arg Leu Lys Asn Val Gln Leu Thr Asp Ala Gly Thr Tyr
 115 120 125
 Lys Cys Tyr Ile Ile Thr Ser Lys Gly Lys Gly Asn Ala Asn Leu Glu
 130 135 140
 Tyr Lys Thr Gly Ala Phe Ser Met Pro Glu Val Asn Val Asp Tyr Asn
 145 150 155 160
 Ala Ser Ser Glu Thr Leu Arg Cys Glu Ala Pro Arg Trp Phe Pro Gln
 165 170 175
 Pro Thr Val Val Trp Ala Ser Gln Val Asp Gln Gly Ala Asn Phe Ser
 180 185 190
 Glu Val Ser Asn Thr Ser Phe Glu Leu Asn Ser Glu Asn Val Thr Met
 195 200 205
 Lys Val Val Ser Val Leu Tyr Asn Val Thr Ile Asn Asn Thr Tyr Ser
 210 215 220
 Cys Met Ile Glu Asn Asp Ile Ala Lys Ala Thr Gly Asp Ile Lys Val

Tyr Lys Thr Gly Ala Phe Ser Met Pro Glu Ile Asn Val Asp Tyr Asn
145 150 155 160

Ala Ser Ser Glu Ser Leu Arg Cys Glu Ala Pro Arg Trp Phe Pro Gln
165 170 175

Pro Thr Val Ala Trp Ala Ser Gln Val Asp Gln Gly Ala Asn Phe Ser
180 185 190

Glu Val Ser Asn Thr Ser Phe Glu Leu Asn Ser Glu Asn Val Thr Met
195 200 205

Lys Val Val Ser Val Leu Tyr Asn Val Thr Ile Asn Asn Thr Tyr Ser
210 215 220

Cys Met Ile Glu Asn Asp Ile Ala Lys Ala Thr Gly Asp Ile Lys Val
225 230 235 240

Thr Asp Ser Glu Val Lys Arg Arg Ser Gln Leu Gln Leu Leu Asn Ser
245 250 255

Gly Pro Ser Pro Cys Val Phe Ser Ser Ala Phe Val Ala Gly Trp Ala
260 265 270

Leu Leu Ser Leu Ser Cys Cys Leu Met Leu Arg
275 280

<210> 4
<211> 282
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> В7-Н4 крысы

<400> 4

Met Ala Ser Leu Gly Gln Ile Ile Phe Trp Ser Ile Ile Asn Val Ile
1 5 10 15

Ile Ile Leu Ala Gly Ala Ile Val Leu Ile Ile Gly Phe Gly Ile Ser
20 25 30

Gly Lys His Phe Ile Thr Val Thr Thr Phe Thr Ser Ala Gly Asn Ile
35 40 45

Gly Glu Asp Gly Thr Leu Ser Cys Thr Phe Glu Pro Asp Ile Lys Leu

043376

50 55 60

Asn Gly Ile Val Ile Gln Trp Leu Lys Glu Gly Ile Lys Gly Leu Val
65 70 75 80

His Glu Phe Lys Glu Gly Lys Asp Asp Leu Ser Gln Gln His Glu Met
85 90 95

Phe Arg Gly Arg Thr Ala Val Phe Ala Asp Gln Val Val Val Gly Asn
100 105 110

Ala Ser Leu Arg Leu Lys Asn Val Gln Leu Thr Asp Ala Gly Thr Tyr
115 120 125

Thr Cys Tyr Ile His Thr Ser Lys Gly Lys Gly Asn Ala Asn Leu Glu
130 135 140

Tyr Lys Thr Gly Ala Phe Ser Met Pro Glu Ile Asn Val Asp Tyr Asn
145 150 155 160

Ala Ser Ser Glu Ser Leu Arg Cys Glu Ala Pro Arg Trp Phe Pro Gln
165 170 175

Pro Thr Val Ala Trp Ala Ser Gln Val Asp Gln Gly Ala Asn Phe Ser
180 185 190

Glu Val Ser Asn Thr Ser Phe Glu Leu Asn Ser Glu Asn Val Thr Met
195 200 205

Lys Val Val Ser Val Leu Tyr Asn Val Thr Ile Asn Asn Thr Tyr Ser
210 215 220

Cys Met Ile Glu Asn Asp Ile Ala Lys Ala Thr Gly Asp Ile Lys Val
225 230 235 240

Thr Asp Ser Glu Val Lys Arg Arg Ser Gln Leu Glu Leu Leu Asn Ser
245 250 255

Gly Pro Ser Pro Cys Val Ser Ser Val Ser Ala Ala Gly Trp Ala Leu
260 265 270

Leu Ser Leu Ser Cys Cys Leu Met Leu Arg
275 280

<210> 5

<211> 11
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> VH CDR1

<400> 5

Gly Ser Ile Lys Ser Gly Ser Tyr Tyr Trp Gly
 1 5 10

<210> 6
 <211> 16
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> VH CDR2

<400> 6

Asn Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Arg Ser
 1 5 10 15

<210> 7
 <211> 12
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> VH CDR3

<400> 7

Ala Arg Glu Gly Ser Tyr Pro Asn Gln Phe Asp Pro
 1 5 10

<210> 8
 <211> 11
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> VL CDR1

<400> 8

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Asn Leu Ala
 1 5 10

<210> 9
 <211> 7
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
<223> VL CDR2

<400> 9

Gly Ala Ser Thr Arg Ala Thr
1 5

<210> 10
<211> 9
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> VL CDR3

<400> 10

Gln Gln Tyr His Ser Phe Pro Phe Thr
1 5

<210> 11
<211> 120
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Вариабельный домен тяжелой цепи (VH)

<400> 11

Gln Leu Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Lys Ser Gly
20 25 30

Ser Tyr Tyr Trp Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu
35 40 45

Trp Ile Gly Asn Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser
50 55 60

Leu Arg Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe
65 70 75 80

Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
85 90 95

Cys Ala Arg Glu Gly Ser Tyr Pro Asn Gln Phe Asp Pro Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 12
 <211> 107
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Вариабельный домен легкой цепи (VL)
 <400> 12

Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly
 1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Asn
 20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Gly Ala Ser Thr Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr His Ser Phe Pro Phe
 85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 13
 <211> 26
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> VH FR1
 <400> 13

Gln Leu Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
 1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly
 20 25

<210> 14
 <211> 14
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> VH FR2

<400> 14

Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly
 1 5 10

<210> 15
 <211> 30
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> VH FR3

<400> 15

Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Lys
 1 5 10 15

Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 20 25 30

<210> 16
 <211> 11
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> VH FR4

<400> 16

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 1 5 10

<210> 17
 <211> 23
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> VL FR1

<400> 17

Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly
 1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys
20

<210> 18
<211> 15
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> VL FR2

<400> 18

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr
1 5 10 15

<210> 19
<211> 32
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> VL FR3

<400> 19

Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr
1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys
20 25 30

<210> 20
<211> 10
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> VL FR4

<400> 20

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
1 5 10

<210> 21
<211> 450
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Полноразмерная аминокислотная последовательность тяжелой цепи

<400> 21

043376

Gln Leu Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
 1 5 10 15
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Lys Ser Gly
 20 25 30
 Ser Tyr Tyr Trp Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu
 35 40 45
 Trp Ile Gly Asn Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser
 50 55 60
 Leu Arg Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe
 65 70 75 80
 Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
 85 90 95
 Cys Ala Arg Glu Gly Ser Tyr Pro Asn Gln Phe Asp Pro Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
 115 120 125
 Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
 130 135 140
 Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
 145 150 155 160
 Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
 165 170 175
 Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
 180 185 190
 Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
 195 200 205
 Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
 210 215 220
 Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
 225 230 235 240

043376

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
 245 250 255

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
 260 265 270

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
 275 280 285

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
 290 295 300

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
 305 310 315 320

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
 325 330 335

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
 340 345 350

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
 355 360 365

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
 370 375 380

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
 385 390 395 400

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
 405 410 415

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
 420 425 430

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 435 440 445

Gly Lys
 450

<210> 22

<211> 214

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Полноразмерная аминокислотная последовательность легкой цепи

<400> 22

Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Asn
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Gly Ala Ser Thr Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr His Ser Phe Pro Phe
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210

<210> 23

<211> 107

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> константная область легкой цепи каппа человека

<400> 23

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
 1 5 10 15

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
 20 25 30

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
 35 40 45

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
 50 55 60

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
 65 70 75 80

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
 85 90 95

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 100 105

<210> 24

<211> 321

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> нуклеотидная последовательность константной области легкой цепи каппа человека

<400> 24

cggaccgtgg ctgcaccatc tgtcttcac ttcccgccat ctgatgagca gttgaaatct
 60

ggaactgcct ctggtgtgtg cctgctgaat aacttctatc ccagagaggc caaagtacag
 120

tggaaggtgg ataacgcct ccaatcgggt aactcccagg agagtgtcac agagcaggac
 180

043376

agcaaggaca gcacctacag cctcagcagc acctgacgc tgagcaaagc agactacgag
240

aaacacaaag tctacgctg cgaagtcacc catcagggcc tgagctcgcc cgtcaciaag
300

agcttcaaca ggggagagtg t
321

<210> 25

<211> 330

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> константная область тяжелой цепи IgG1 человека

<400> 25

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
145 150 155 160

043376

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
225 230 235 240

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
325 330

<210> 26

<211> 990

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> нуклеотидная последовательность константной области тяжелой цепи IgG1 человека

<400> 26

gcctccacca agggcccatc ggtcttcccc ctggcaccct cctccaagag cacctctggg
60

ggcacagcgg cctgggctg cctggtcaag gactacttcc ccgaaccggt gacggtgtcg
120

tggaactcag gcgcctgac cagcggcgtg cacaccttcc cggtgtcct acagtcctca
180

ggactctact ccctcagcag cgtggtgacc gtgccctcca gcagcttggg caccagacc
240

tacatctgca acgtgaatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagaa agttgagccc
300

aaatcttggt acaaaactca cacatgccca ccgtgccag cacctgaact cctgggggga
360

ccgtcagtct tcctcttccc cccaaaacc aaggacacc tcatgatctc ccggaccct
420

gaggtcacat gcgtgggtgg ggacgtgagc cacgaagacc ctgaggtaa gttcaactgg
480

tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc cgcgggagga gcagtacaac
540

agcacgtacc ggggtggcag cgtcctcacc gtcctgcacc aggactggct gaatggcaag
600

gagtacaagt gcaaggtctc caacaaagcc ctcccagccc ccatcgagaa aaccatctcc
660

aaagccaaag ggcagccccg agaaccacag gtgtacaccc tgccccatc ccgggatgag
720

ctgaccaaga accaggtcag cctgacctgc ctggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc
780

gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctcccgtg
840

ctggactccg acggctcctt cttcctctac agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg
900

cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacag
960

cagaagagcc tctccctgtc tccgggtaaa
990

<210> 27

<211> 360

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> полинуклеотидная последовательность кодирующая переменную область тяжелой цепи 20502

<400> 27

cagctgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcggagac cctgtccctc
60

acctgcactg tctctgggtg ctccatcaaa agtggtagtt actactgggg ctggatccgc
120

cagccccag ggaaggggct ggagtggatt gggaacatct attatagtgg gagcacctac
180

tacaaccgt ccctcagaag tcgagtcacc atatccgtag acacgtccaa gaaccagttc
240

tcctgaagc tgagttctgt gaccgccgca gacacggcgg tgtactactg cgccagagaa
300

ggatcttacc ccaatcagtt tgatccatgg ggacagggta cattggtcac cgtctcctca
360

<210> 28

<211> 321

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> полинуклеотидная последовательность кодирующая вариабельную область легкой цепи 20502

<400> 28

gaaatagtga tgacgcagtc tccagccacc ctgtctgtgt ctccagggga aagagccacc
60

ctctcctgca gggccagtca gagtgtagc agcaacttag cctggtagca gcagaaacct
120

ggccaggctc ccaggctcct catctatggt gcatccacca gggccactgg tatcccagcc
180

aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagag ttcactctca ccatcagcag cctgcagtct
240

gaagattttg cagtttatta ctgtcagcag taccactcct tccctttcac ttttggcgga
300

gggaccaagg ttgagatcaa a
321

1

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Фармацевтическая композиция, содержащая (i) антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который специфически связывается с В7-Н4 человека и содержит последовательности CDR1 VH, CDR2 VH, CDR3 VH и CDR1, CDR2 и CDR3 VL SEQ ID NO: 5-10 соответственно, (ii) буфер и (iii) pH композиции составляет от около 4,5 до около 6.

2. Композиция по п.1, отличающаяся тем, что композиция содержит от около 30% до около 40% кислых вариантов антитела или его антигенсвязывающего фрагмента через 6 месяцев хранения при 5°C.

3. Композиция по п.1 или 2, отличающаяся тем, что композиция содержит от около 10% до около 17% основных вариантов антитела или его антигенсвязывающего фрагмента через 6 месяцев хранения при 5°C.

4. Композиция по любому из пп.1-3, отличающаяся тем, что композиция содержит не более чем 55% кислых и основных вариантов антитела или его антигенсвязывающего фрагмента через 6 месяцев

хранения при 5°C.

5. Композиция по любому из пп.1-4, отличающаяся тем, что композиция дополнительно содержит сахар.

6. Композиция по любому из пп.1-5, отличающаяся тем, что концентрация буфера составляет от около 15 до около 25 мМ.

7. Композиция по п.5 или 6, отличающаяся тем, что концентрация сахара составляет от около 225 мМ до около 300 мМ.

8. Композиция по любому из пп.1-7, отличающаяся тем, что композиция дополнительно содержит поверхностно-активное вещество.

9. Композиция по любому из пп.1-8, отличающаяся тем, что концентрация антитела или его антигенсвязывающего фрагмента составляет от около 5 мг/мл до около 30 мг/мл.

10. Композиция по любому из пп.1-9, содержащая около 20 мМ ацетата, около 270 мМ сахарозы, около 20 мг/мл антитела или его антигенсвязывающего фрагмента и около 0,05% полисорбата 20, при этом рН композиции составляет около 5,0.

11. Композиция по любому из пп.1-9, содержащая около 20 мМ цитрата, около 270 мМ сахарозы, около 20 мг/мл антитела или его антигенсвязывающего фрагмента и около 0,05% полисорбата 20, при этом рН композиции составляет около 5,5.

12. Композиция по любому из пп.1-11, отличающаяся тем, что антитело содержит VH, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 11, и/или VL, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 12.

13. Композиция по п.12, отличающаяся тем, что антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 21, и/или легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 22.

14. Композиция по любому из пп.1-13, отличающаяся тем, что по меньшей мере 95% антител или их антигенсвязывающих фрагментов композиции афукозилированы.

15. Фармацевтическая композиция, состоящая из (i) антитела, содержащего тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 21, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 22, (ii) около 20 мМ ацетата, (iii) около 270 мМ сахарозы и (iv) около 0,05% мас./об. полисорбата 20, при этом рН композиции составляет около 5,0.

16. Фармацевтическая композиция, состоящая из (i) антитела, содержащего тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 21, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 22, (ii) около 20 мМ цитрата, (iii) около 270 мМ сахарозы и (iv) около 0,05% мас./об. полисорбата 20, при этом рН композиции составляет около 5,5.

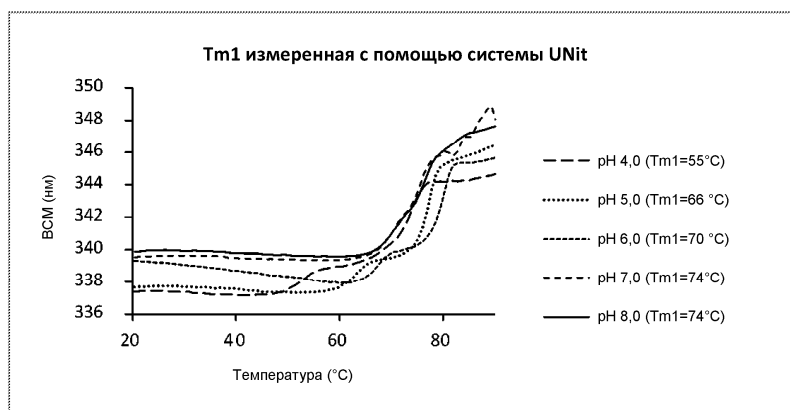
17. Шприц, содержащий фармацевтическую композицию по любому из пп.1-16.

18. Флакон, содержащий фармацевтическую композицию по любому из пп.1-16.

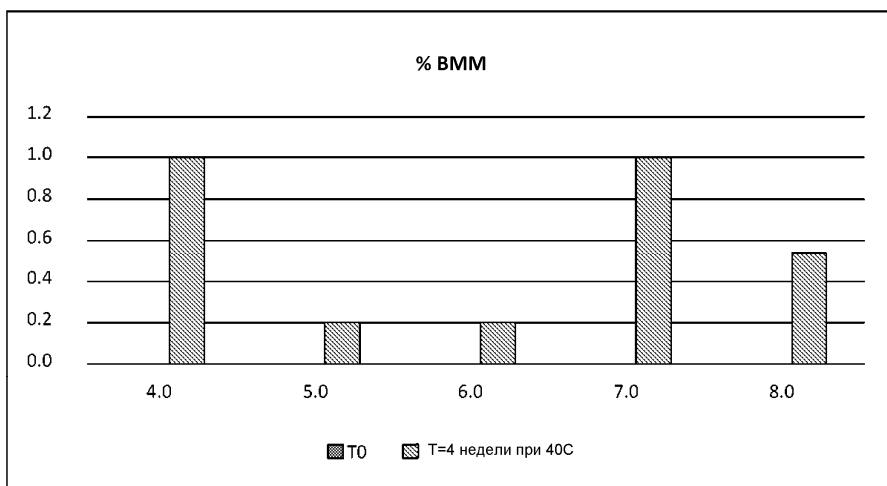
19. Способ лечения рака, экспрессирующего B7-H4, у субъекта, включающий введение субъекту фармацевтической композиции по любому из пп.1-16.

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

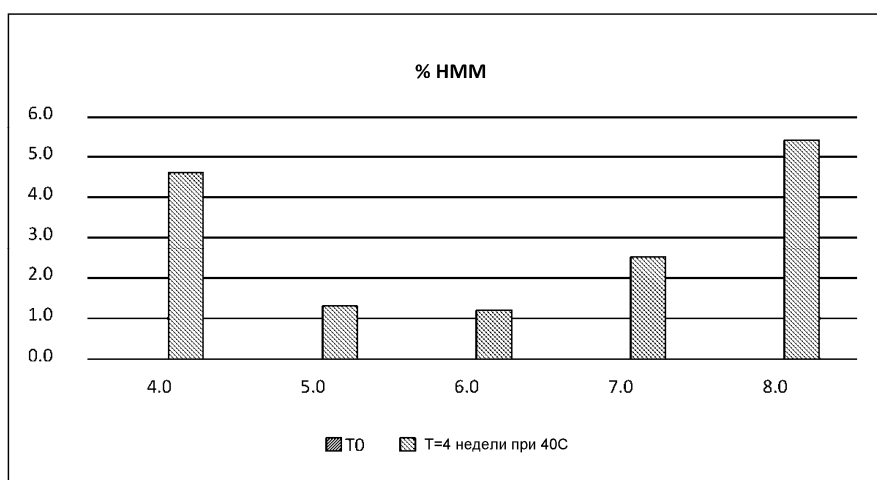
21. Способ по п.19 или 20, отличающийся тем, что фармацевтическую композицию вводят парентерально или внутривенно.



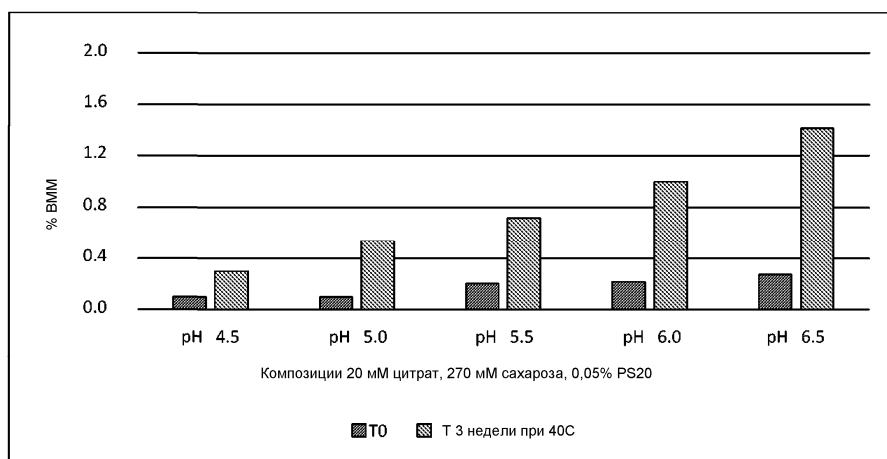
Фиг. 1



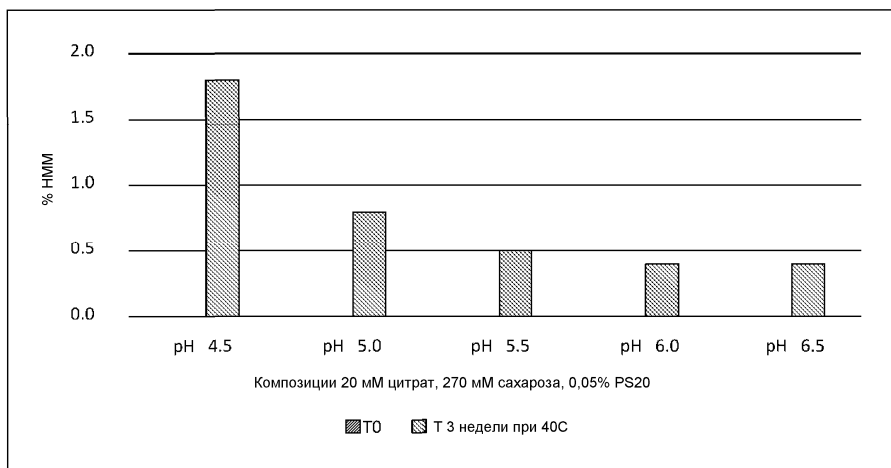
Фиг. 2



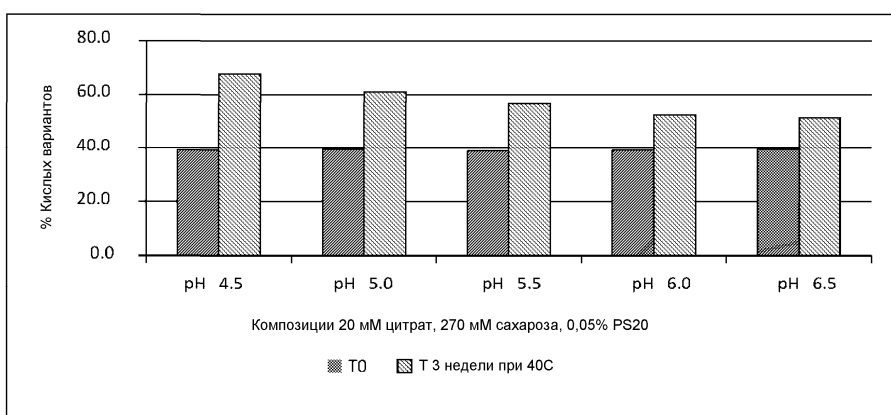
Фиг. 3



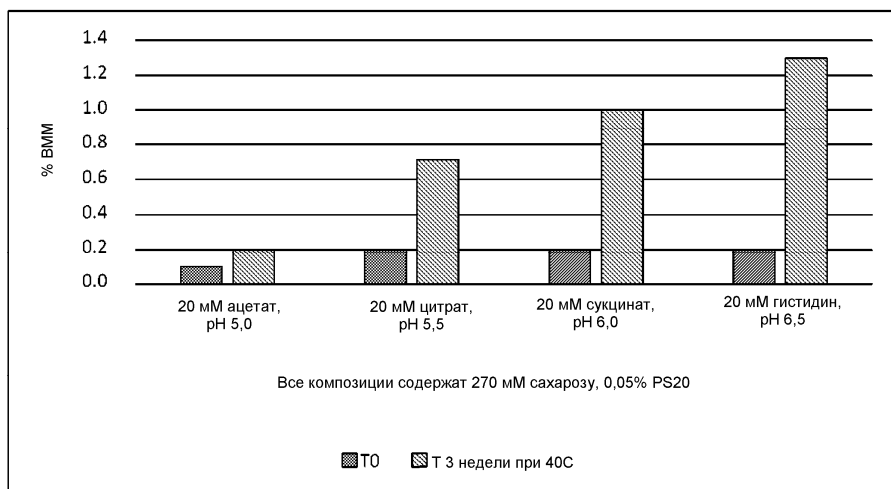
Фиг. 4



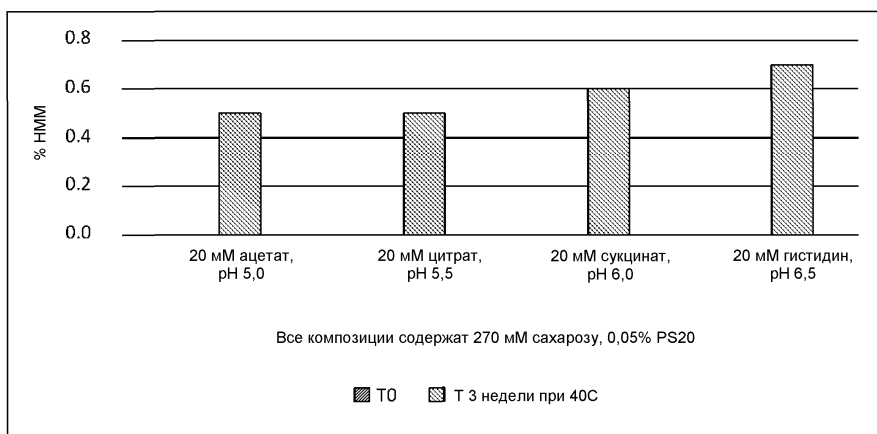
Фиг. 5



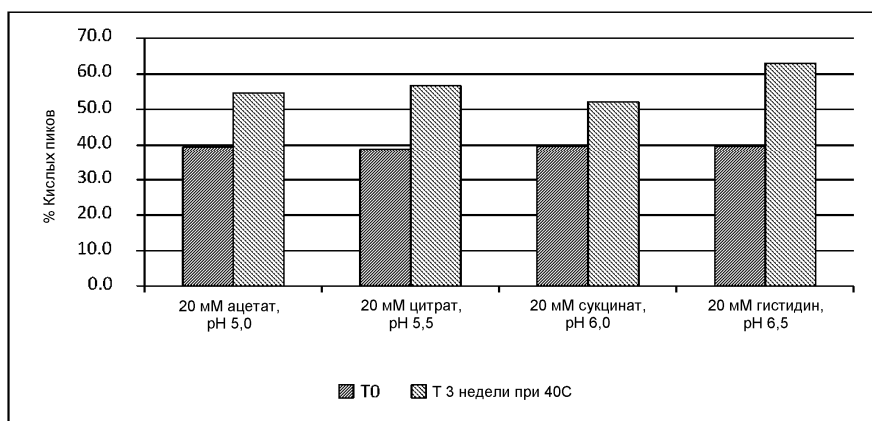
Фиг. 6



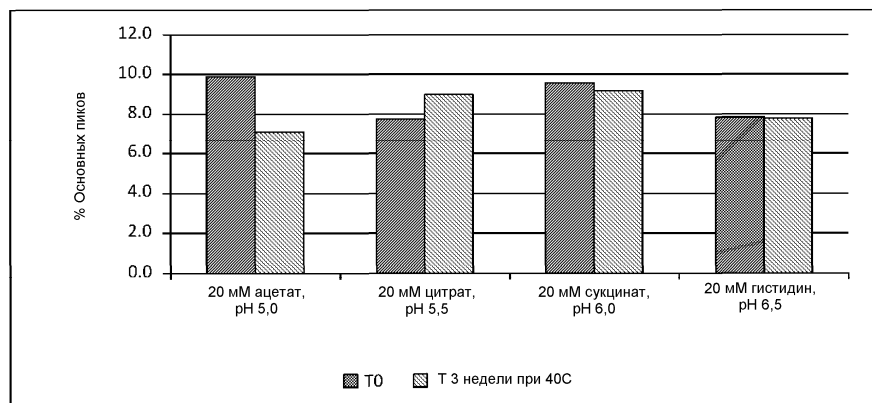
Фиг. 7



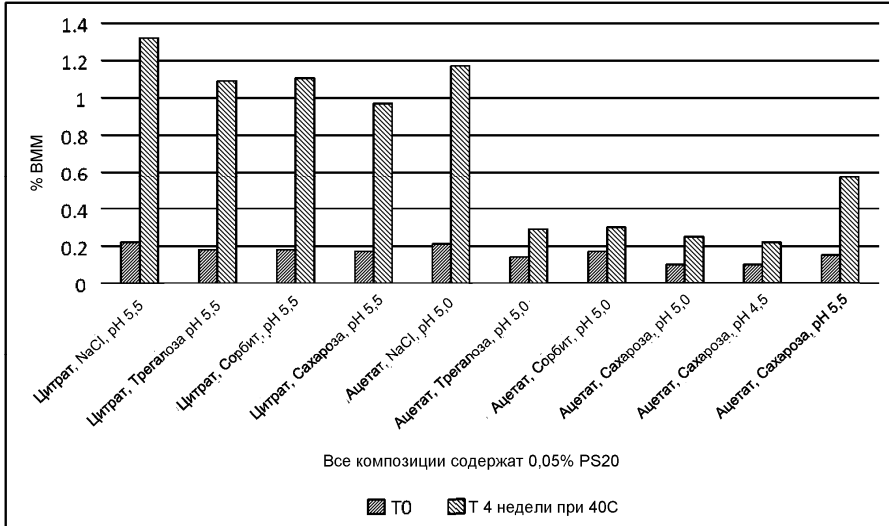
Фиг. 8



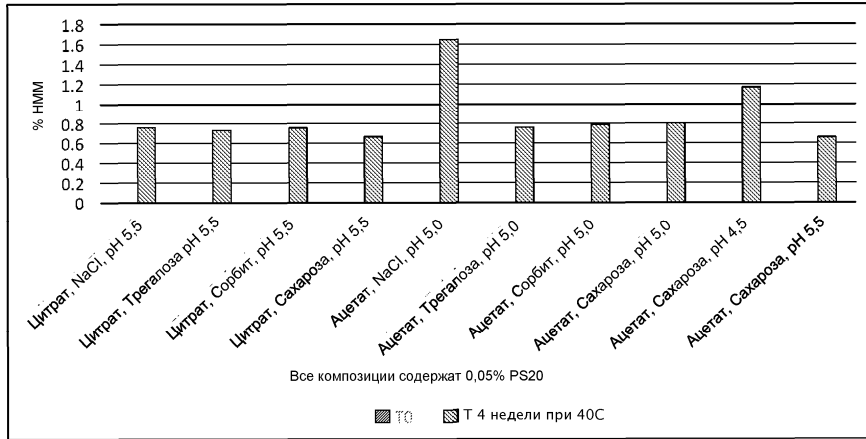
Фиг. 9



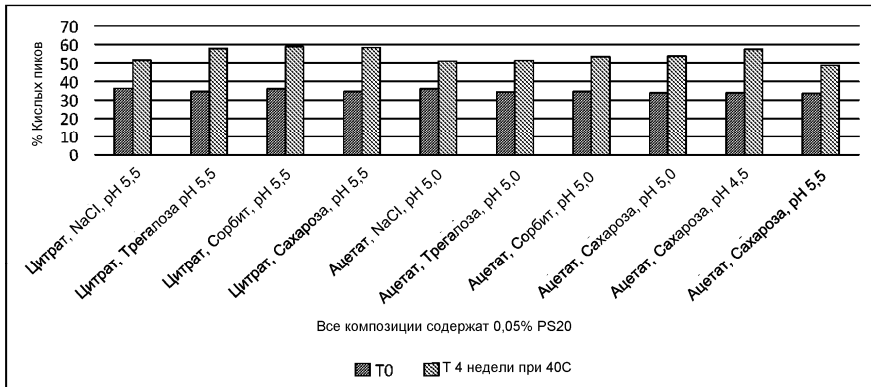
Фиг. 10



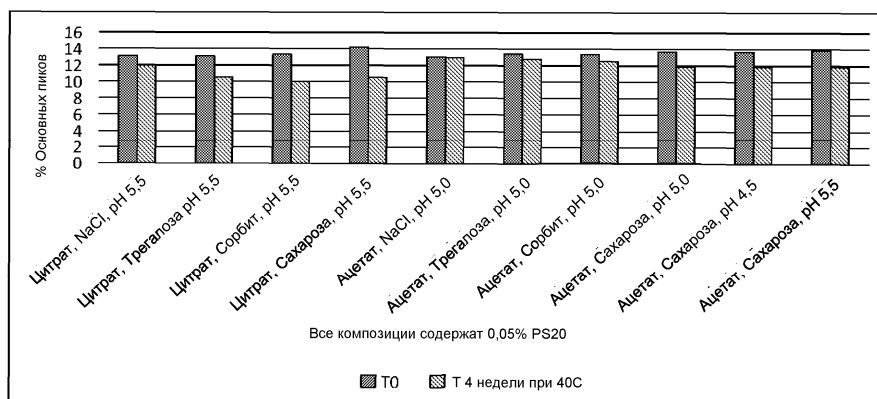
Фиг. 11



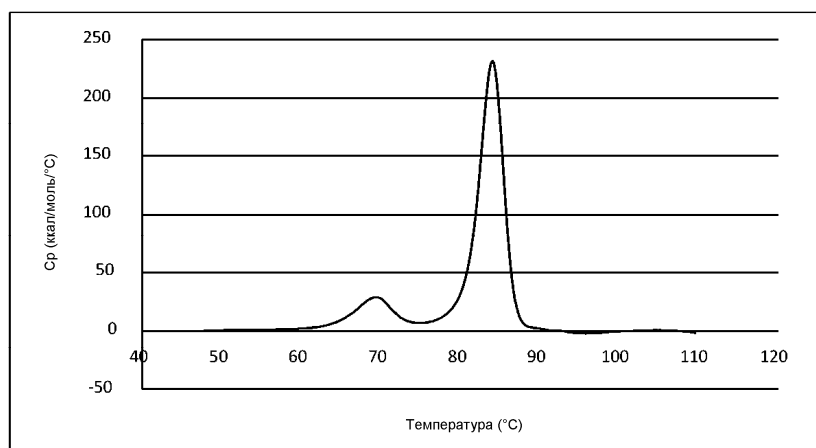
Фиг. 12



Фиг. 13



Фиг. 14



Фиг. 15

