



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **131039** (13) **C2**

(51) МПК (2026.01)

C07K 16/28 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 35/00

A61P 39/00

НАЦІОНАЛЬНИЙ ОРГАН
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ ВЛАСНОСТІ
ДЕРЖАВНА ОРГАНІЗАЦІЯ
"УКРАЇНСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ
ОФІС ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ ТА ІННОВАЦІЙ"

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(21) Номер заявки:	а 2021 01837	(72) Винахідник(и):	Інамдар Сандіп П. (US), Коллінс Хелен Л. (US), Ксіанг Хонг (US), Чжанг Ксіанг (US), Маріна Нейсса (US)
(22) Дата подання заявки:	15.10.2019	(73) Володілець (володільці):	ФАЙВ ПРАЙМ ТЕРАПЕУТИКС, ІНК., One Amgen Center Drive, Thousand Oaks, California 91320, United States of America (US)
(24) Дата, з якої є чинними права інтелектуальної власності:	23.07.2026	(74) Представник:	Бочаров Максим Анатолійович, реєстр. №367
(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	62/745,464, 62/802,091, 62/854,494	(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою:	WO 2009/073533 A2, 11.06.2009 WO 2019/040780 A1, 28.02.2019 HYUNGJUN JEON et al. Structure and Cancer Immunotherapy of the B7 Family Member B7x. CELL REPORTS, US. 01.11.2014. Vol. 9. No. 3. P. 1089 – 1098 NING ZHANG et al. Preparation and Characterization of Monoclonal Antibody Against Human B7-H4 Molecule. MONOCLONAL ANTIBODIES IN IMMUNODIAGNOSIS AND IMMUNOTHERAPY, US. 01.08.20140801. Vol. 33. No. 4. P. 270 – 274 DENARDA DANGAJ et al. Blocking the B7-H4 pathway with novel recombinant antibodies enhances T cell-mediated antitumor responses. ONCOIMMUNOLOGY. 01.08.2013. Vol. 2. No. 8. P. e25913 JOSEPH R. PODOJIL et al. Potential targeting of B7- H4 for the treatment of cancer. IMMUNOLOGICAL REVIEWS., US. 01.03.2017. Vol. 276. No. 1. P. 40 – 51 US 2014/322129 A1, 30.10.2014 WO 2016/040724 A1, 17.03.2016 WO 2017/106656 A1, 22.06.2017 WO 2018/106864 A1, 14.06.2018 WO 2018/106862 A1, 28.02.2019 MURALI JANAKIRAM et al. The third group of the B7-CD28 immune checkpoint family: HHLA2, TMIGD2, B7x, and B7-H3. IMMUNOLOGICAL REVIEWS., US. 01.03.2017. Vol. 276. No. 1. P. 26 – 39
(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	15.10.2018, 06.02.2019, 30.05.2019		
(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку:	US, US, US		
(41) Публікація відомостей про заявку:	23.06.2021, Бюл.№ 25		
(46) Публікація відомостей про державну реєстрацію:	22.07.2026, Бюл.№ 29		
(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ	PCT/US2019/056210, 15.10.2019		

(54) КОМБІНОВАНА ТЕРАПІЯ ОНКОЛОГІЧНОГО ЗАХВОРЮВАННЯ

(57) Реферат:

UA 131039 C2

Винахід стосується введення антитіл, які специфічно зв'язуються з B7-H4 людини, суб'єкту, який цього потребує, наприклад, пацієнту з онкологічним захворюванням, в комбінації з антагоністом PD-1/PD-L1 - антитілом до PD-1.

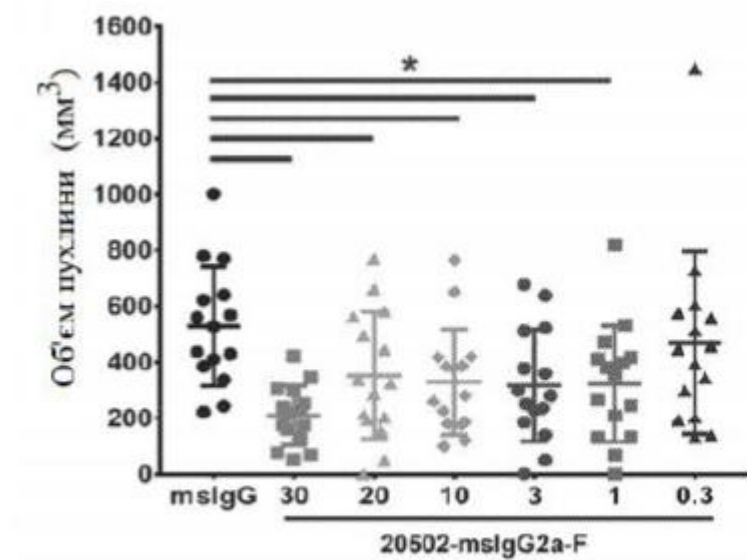


Fig. 2

ОБЛАСТЬ ТЕХНІКИ

Це розкриття стосується способів введення антитіл, які специфічно зв'язуються з B7-H4 людини в комбінації з антагоністом PD-1/PD-L1, як-от пембролізумаб, для лікування таких захворювань, як онкологічне захворювання. Пропонуються схеми введення, які мають перевагу.

5 1. РІВЕНЬ ТЕХНІКИ

B7-H4 (також відомий як B7x, B7-S1 і VTCN1) являє собою імунорегулюючу молекулу, яка має гомологію з іншими членами сімейства B7, включаючи PD-L1. Це трансмембранний білок I типу, що складається з ектодоменів IgV і IgC. У той час як експресія B7-H4 у здорових тканинах відносно обмежена на рівні білка, B7-H4 експресується в декількох солідних пухлинах, як-от гінекологічні карциноми молочної залози, яєчників й ендометрію. Експресія B7-H4 в пухлинах має тенденцію корелювати з несприятливим прогнозом. Рецептор B7-H4 невідомий, але вважається, що він експресується на Т-клітинах. Вважається, що B7-H4 безпосередньо інгібує активність Т-клітин.

З огляду на експресію та функцію B7-H4, антитіла, які специфічно зв'язуються з B7-H4, розробляються для терапії, що включає модуляцію активності B7-H4, наприклад, для лікування онкологічного захворювання.

PD-1 є ключовим рецептором імунної контрольної точки, що експресується активованими Т- і В-клітинами, і опосередковує імуносупресію. PD-1 є членом сімейства рецепторів CD28, яке включає CD28, CTLA-4, ICOS, PD-1 і BTLA. Були ідентифіковані два глікопротеїнові ліганди клітинної поверхні для PD-1, ліганд програмованої клітинної загибелі-1 (PD-L1) і ліганд програмованої клітинної загибелі-2 (PD-L2), які експресуються на антигенпрезентуючих клітинах, а також на багатьох злоякісних клітинах людини і було показано, що вони пригнічують активацію Т-клітин і секрецію цитокінів при зв'язуванні з PD-1. Інгібування взаємодії PD-1/PD-L1, наприклад, антитілами до PD-1 або до PD-L1, опосередковує сильну протипухлинну активність.

Відповідно, існує потреба в ефективних схемах введення для введення антитіл, які зв'язуються з B7-H4 і інгібіторами взаємодії PD-1/PD-L1.

2. КОРОТКИЙ ОПИС СУТНОСТІ ВИНАХОДУ

У цьому документі представлені способи введення антитіл до B7-H4 та їх антигензв'язуючих фрагментів у комбінації з антагоністом PD-1/PD-L1 із застосуванням терапевтично ефективної схеми введення. Антитіла до B7-H4 та їх антигензв'язуючі фрагменти можуть бути антитілом 20502 або його антигензв'язуючим фрагментом; або антитіло або антигензв'язуючий фрагмент, що містить варіабельну область важкого і легкого ланцюгів CDR антитіла 20502; або антитіло, або антигензв'язуючий фрагмент, що містить варіабельні області важкого і легкого ланцюгів антитіла 20502, включно з афукозильованими формами будь-чого з перерахованого вище. Антагоніст PD-1/PD-L1 може являти собою антитіло до PD-1, як-от пембролізумаб, або антитіло, або антигензв'язуючий фрагмент, що містить варіабельну область важкого і легкого ланцюгів CDR пембролізумаба; або антитіло, або антигензв'язуючий фрагмент, що містить варіабельні області важкого і легкого ланцюгів пембролізумаба.

У деяких аспектах спосіб лікування солідної пухлини у суб'єкта-людини включає введення суб'єкту (а) від близько 0,1 до близько 20 мг/кг антитіла або його антигензв'язуючого фрагмента, яке специфічно зв'язується з B7-H4 людини і містить послідовності варіабельної області важкого ланцюга (VH), що визначає комплементарність (CDR) 1, VH CDR2, VH CDR3 і варіабельної області легкого ланцюга (VL) CDR1, VL CDR2 і VL CDR3 антитіла 20502; і (b) близько 200 мг пембролізумаба. У деяких варіантах здійснення (а) і (b) вводять одночасно або послідовно.

У деяких аспектах спосіб лікування солідної пухлини у суб'єкта-людини включає введення суб'єкту (а) фармацевтичної композиції, що містить (i) антитіла або їх антигензв'язуючий фрагмент, причому антитіла або їх антигензв'язуючі фрагменти специфічно зв'язуються з B7-H4 людини і містять послідовності області, що визначає комплементарність (CDR) 1, варіабельної області важкого ланцюга (VH), CDR2 VH, CDR3 VH і CDR1 варіабельної області легкого ланцюга (VL), CDR2 VL і CDR3 VL антитіла 20502 і (ii) фармацевтично прийнятний наповнювач, причому щонайменше 95 % антитіл або їх антигензв'язуючих фрагментів у композиції є афукозильованими, і при цьому вводять від близько 0,1 до близько 20 мг/кг антитіл або їх антигензв'язуючих фрагментів; і (b) фармацевтичної композиції, що містить пембролізумаб, при цьому вводять близько 200 мг пембролізумаба. У деяких варіантах здійснення (а) і (b) вводять одночасно або послідовно.

У деяких аспектах зазначені CDR антитіл або антигензв'язуючих фрагментів являють собою CDR, визначені за Кабатом, CDR, визначені за Чотіа, або CDR, визначені за AbM. У деяких аспектах зазначені послідовності VH CDR1, VH CDR2, VH CDR3, VL CDR1, VL CDR2 і CDR3 містять амінокислотні послідовності SEQ ID NO: 5–10 відповідно.

У деяких аспектах суб'єкту вводять близько 20 мг/кг або 20 мг/кг антитіла до B7-H4 або його антигензв'язуючого фрагмента. У деяких аспектах суб'єкту вводять близько 10 мг/кг або 10 мг/кг антитіла до B7-H4 або його антигензв'язуючого фрагмента. У деяких аспектах суб'єкту вводять близько 3 мг/кг або 3 мг/кг антитіла до B7-H4 або його антигензв'язуючого фрагмента. У деяких

5 аспектах суб'єкту вводять близько 1 мг/кг або 1 мг/кг антитіла до B7-H4 або його антигензв'язуючого фрагмента. У деяких аспектах суб'єкту вводять близько 0,3 мг/кг або 0,3 мг/кг антитіла до B7-H4 або його антигензв'язуючого фрагмента. У деяких аспектах суб'єкту вводять близько 0,1 мг/кг або 0,1 мг/кг антитіла до B7-H4 або його антигензв'язуючого фрагмента.

10 У деяких аспектах зазначене антитіло до B7-H4 або його антигензв'язуючий фрагмент і/або пембролізумаб вводять приблизно один раз на три тижні.

У деяких аспектах зазначене антитіло до B7-H4 або його антигензв'язуючий фрагмент, і/або пембролізумаб вводять внутрішньовенно.

15 У деяких аспектах B7-H4 був виявлений в солідній пухлині з використанням імуногістохімії (ІГХ) до його введення.

У деяких аспектах зазначене антитіло до B7-H4 або його антигензв'язуючий фрагмент містить VH, що містить амінокислотну послідовність, наведену в SEQ ID NO: 11, і/або VL, що містить амінокислотну послідовність, наведену в SEQ ID NO: 12. У деяких аспектах зазначене антитіло до B7-H4 або антигензв'язуючий фрагмент містить константну область важкого

20 ланцюга і/або константну область легкого ланцюга. У певних аспектах зазначена константна область важкого ланцюга являє собою константну область важкого ланцюга імуноглобуліну IgG₁ людини і/або константна область легкого ланцюга являє собою константну область легкого ланцюга імуноглобуліну IgG_k людини. У певних аспектах зазначене антитіло або його антигензв'язуючий фрагмент містить константну область важкого ланцюга, що містить

25 амінокислотну послідовність, наведену в SEQ ID NO: 25, і/або константну область легкого ланцюга, що містить амінокислотну послідовність, наведену в SEQ ID NO: 23. У деяких аспектах зазначене антитіло до B7-H4 або його антигензв'язуючий фрагмент містить важкий ланцюг, що містить амінокислотну послідовність, наведену в SEQ ID NO: 21, і/або легкий ланцюг, що містить амінокислотну послідовність, наведену в SEQ ID NO: 22.

30 У деяких аспектах зазначене антитіло або його антигензв'язуючий фрагмент являє собою антитіло людини або його антигензв'язуючий фрагмент.

У деяких аспектах зазначене антитіло до B7-H4 або його антигензв'язуючий фрагмент є афукозилюваним.

У деяких аспектах зазначене антитіло або його антигензв'язуючий фрагмент являє собою повнорозмірне антитіло. У деяких аспектах зазначене антитіло або його антигензв'язуючий

35 фрагмент являє собою антигензв'язуючий фрагмент. У деяких аспектах зазначений антигензв'язуючий фрагмент містить або являє собою Fab, Fab', F(ab')₂, одноланцюговий Fv (scFv), дисульфіднозв'язаний Fv, домен V-NAR, IgNar, інтратіло, IgGΔCH2, мінітіло, F(ab')₃, тетратіло, триатіло, діатіло, одномономерне антитіло, DVD-Ig, Fcab, mAb², (scFv)₂ або scFv-Fc.

40 У деяких аспектах рівень фукозилювання є таким, що не виявляється в композиції, яка містить антитіла до B7-H4.

У певних аспектах зазначена солідна пухлина експресує B7-H4.

У деяких аспектах зазначена солідна пухлина є неоперабельною, місцевопоширеною або метастатичною.

45 У деяких аспектах зазначена солідна пухлина вибрана з групи, що складається з раку молочної залози, протокової карциноми, карциноми ендометрію, раку яєчників, уротеліального раку, недрібноклітинного раку легень, раку підшлункової залози, раку щитоподібної залози, раку нирки і раку сечового міхура. У певних аспектах зазначена солідна пухлина являє собою рак молочної залози, рак яєчників, рак ендометрію або уротеліальний рак. У певних аспектах

50 зазначений рак молочної залози являє собою рак молочної залози на пізній стадії. У деяких аспектах зазначений рак молочної залози є HER2-негативним. У деяких аспектах зазначений рак молочної залози являє собою тричі негативний рак молочної залози. У певних аспектах зазначений рак молочної залози являє собою рак молочної залози, позитивний відносно рецепторів гормонів (HR). У деяких аспектах зазначений недрібноклітинний рак легень являє собою плоскоклітинний рак. У деяких аспектах зазначений суб'єкт не отримував попередню

55 терапію антагоністом PD-1/PD-L1.

У деяких аспектах зазначений спосіб додатково включає моніторинг кількості імунних клітин у пухлині. У деяких аспектах зазначений спосіб додатково включає моніторинг кількості природних клітин-кілерів (NK), клітин CD4⁺ і/або клітин CD8⁺ в пухлині. У деяких аспектах

60 зазначений спосіб додатково включає моніторинг рівнів цитокінів у суб'єкта. У деяких аспектах

зазначений спосіб додатково включає моніторинг рівнів IL-2, IL-6, IL-10, TNF і/або гамма-інтерферону (IFN γ) у суб'єкта.

У деяких аспектах введення антитіла до B7-H4 або його антигензв'язуючого фрагмента і антитіла до PD-1 або його антигензв'язуючого фрагмента призводить до синергетичного ефекту.

У деяких аспектах спосіб лікування солідної пухлини у суб'єкта-людини включає введення суб'єкту (i) близько 20 мг/кг антитіла до B7-H4, яке специфічно зв'язується з B7-H4 людини і містить VH, що містить амінокислотну послідовність, наведену в SEQ ID NO: 11 і VL, що містить амінокислотну послідовність, наведену в SEQ ID NO: 12; і (ii) близько 200 мг антитіла до PD-1, що містить VH, що містить амінокислотну послідовність, наведену в SEQ ID NO: 32, і VL, що містить амінокислотну послідовність, наведену в SEQ ID NO: 33, причому антитіло до B7-H4 і антитіло до PD-1 вводять внутрішньовенно приблизно один раз на три тижні.

У певних аспектах спосіб лікування солідної пухлини у суб'єкта-людини включає введення суб'єкту (a) фармацевтичної композиції, що містить (i) антитіла до B7-H4, які специфічно зв'язуються з B7-H4 людини і містять VH, що містить амінокислотну послідовність, наведену в SEQ ID NO: 11 і VL, що містить амінокислотну послідовність, наведену в SEQ ID NO: 12, і (ii) фармацевтично прийнятний наповнювач, причому щонайменше 95 % їх антитіл до B7-H4 в композиції афукозильовані, і при цьому вводять близько 20 мг/кг антитіл; і (b) фармацевтичної композиції, що містить антитіло до PD-1 або його антигензв'язуючий фрагмент, що містить VH, що містить амінокислотну послідовність, наведену в SEQ ID NO: 32, і VL, що містить амінокислотну послідовність, наведену в SEQ ID NO: 33 і фармацевтично прийнятний наповнювач, причому вводять близько 200 мг антитіла або антигензв'язуючого фрагмента, при цьому антитіло до B7-H4 і антитіло до PD-1 вводять внутрішньовенно приблизно один раз на три тижні.

У деяких аспектах зазначене антитіло до B7-H4 містить важкий ланцюг, що містить амінокислотну послідовність, наведену в SEQ ID NO: 21, і легкий ланцюг, що містить амінокислотну послідовність, наведену в SEQ ID NO: 22. У деяких аспектах зазначене антитіло до PD-1 містить важкий ланцюг, що містить амінокислотну послідовність, наведену в SEQ ID NO: 30, і легкий ланцюг, що містить амінокислотну послідовність, наведену в SEQ ID NO: 31.

У певних аспектах зазначена солідна пухлина являє собою рак молочної залози, необов'язково, при цьому рак молочної залози являє собою тричі негативний рак молочної залози або рак яєчників.

3. КОРОТКИЙ ОПИС ГРАФІЧНИХ МАТЕРІАЛІВ

На Фіг. 1A, 1B і 1C продемонстрована *in vivo* протипухлинна ефективність антитіла до B7-H4 в комбінації з антитілом до PD-1. (Див. Приклад 4).

На Фіг. 2 продемонстрована дозозалежна протипухлинна активність антитіла до B7-H4. (Див. Приклад 4).

На Фіг. 3 продемонстровано, що антитіло до B7-H4 синергетично поєднується з антитілом до PD1, навіть коли антитіло до B7-H4 вводять в дозі, яка є неефективною в якості монотерапії. (Див. Приклад 4)

4. ДЕТАЛЬНИЙ ОПИС СУТНОСТІ ВІНАХОДУ

У цьому документі представлені способи введення антитіл (наприклад, моноклональних антитіл) та їх антигензв'язуючих фрагментів, які специфічно зв'язуються з B7-H4 (наприклад, з B7-H4 людини), в комбінації з антагоністом PD-1/PD-L1 (наприклад, пембролізумабом). Антитіла до B7-H4 і їх антигензв'язуючі фрагменти можна вводити в комбінації з антагоністом PD-1/PD-L1 (наприклад, пембролізумабом), наприклад, для лікування солідної пухлини у суб'єкта. У конкретному варіанті здійснення близько 20 мг/кг, близько 10 мг/кг, близько 3 мг/кг, близько 1 мг/кг, близько 0,3 мг/кг або близько 0,1 мг/кг антитіла або його антигензв'язуючого фрагмента вводять суб'єкту в комбінації з близько 200 мг пембролізумаба, наприклад, при цьому введення виконують приблизно кожні три тижні.

4.1 Термінологія

Термін "B7-H4", в контексті цього документу, стосується поліпептидів B7-H4 ссавців, включаючи, але не обмежуючись цим, нативні поліпептиди B7-H4 та ізоформи поліпептидів B7-H4. "B7-H4" включає повнорозмірні необроблені поліпептиди B7-H4, а також форми поліпептидів B7-H4, які виникають в результаті процесингу всередині клітини. Термін "B7-H4 людини", в контексті цього документу, стосується поліпептиду, який містить амінокислотну послідовність, наведену в SEQ ID NO: 1. "Полінуклеотид B7-H4", "нуклеотид B7-H4" або "нуклеїнова кислота B7-H4" стосуються полінуклеотиду, що кодує B7-H4.

Термін "антитіло" означає молекулу імуноглобуліну, яка розпізнає та специфічно зв'язується з мішенню, як-от білок, поліпептид, пептид, вуглевод, полінуклеотид, ліпід або їх комбінації,

щонайменше за допомогою одного сайту розпізнавання антигену у варіабельній області молекули імуноглобуліну. Термін "антитіло", в контексті цього документа, охоплює інтактні поліклональні антитіла, інтактні моноклональні антитіла, химерні антитіла, гуманізовані антитіла, антитіла людини, злиті білки, що містять антитіло, і будь-яку іншу модифіковану молекулу імуноглобуліну, за умови, що антитіла проявляють бажану біологічну активність. Антитіло може належати до будь-якого з п'яти основних класів імуноглобулінів: IgA, IgD, IgE, IgG і IgM або їх підкласів (ізотипів) (наприклад, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 і IgA2), на підставі ідентичності їх константних доменів важкого ланцюга, що називаються альфа, дельта, епсилон, гамма і му, відповідно. Різні класи імуноглобулінів мають різні й добре відомі структури субодиниць і тривимірні конфігурації. Антитіла можуть бути некон'югованими або кон'югованими з іншими молекулами, як-от токсини, радіоізотопи тощо.

Термін "фрагмент антитіла" стосується частини інтактного антитіла. "Антигензв'язуючий фрагмент", "антигензв'язуючий домен" або "антигензв'язуюча область" стосується частини інтактного антитіла, яка зв'язується з антигеном. Антигензв'язуючий фрагмент може містити сайт розпізнавання антигену інтактного антитіла (наприклад, області, що визначають комплементарність (CDR), достатні для специфічного зв'язування антигену). Приклади антигензв'язуючих фрагментів антитіл включають, але не обмежуються ними, фрагменти Fab, Fab', F(ab')₂ і Fv, лінійні антитіла та одноланцюгові антитіла. Антигензв'язуючий фрагмент антитіла може бути отриманий з будь-яких видів тварин, як-от гризуни (наприклад, миша, щур або хом'як) і людини, або може бути отриманий штучно.

Терміни "антитіло до B7-H4", "антитіло B7-H4" і "антитіло, яке зв'язується з B7-H4" стосуються антитіла, яке здатне специфічно зв'язувати B7-H4 з достатньою афінністю, так що антитіло стає придатним в якості діагностичного і/або терапевтичного засобу націлювання на B7-H4. Терміни "специфічне зв'язування", "імуноспецифічне зв'язування", "імуноспецифічне розпізнавання" і "специфічне розпізнавання", в контексті цього документа, є аналогічними термінами в контексті антитіл або їх антигензв'язуючих фрагментів. Ці терміни вказують на те, що антитіло або його антигензв'язуючий фрагмент зв'язується з епітопом через його антигензв'язуючий домен і що зв'язування тягне за собою деяку комплементарність між антигензв'язуючим доменом і епітопом. Відповідно, антитіло, яке "специфічно зв'язується" з B7-H4 людини (SEQ ID NO: 1), може також зв'язуватися з B7-H4 інших видів (наприклад, B7-H4 яванського макака, миші й/або щура) та/або білками B7-H4, які продукуються іншими алелями людини, але ступінь зв'язування з неспорідненим, не-B7-H4 білком (наприклад, іншими членами сімейства білків B7, як-от PD-L1) становить менше ніж близько 10 % зв'язування антитіла з B7-H4, як виміряно, наприклад, за допомогою радіоімуноаналізу (RIA). У конкретному варіанті здійснення в цьому документі передбачено антитіло або його антигензв'язуючий фрагмент, який специфічно зв'язується з B7-H4 людини, яванського макака, миші і щура.

"Моноклональне" антитіло або його антигензв'язуючий фрагмент стосується популяції гомогенного антитіла або антигензв'язуючого фрагмента, яке бере участь у високоспецифічному зв'язуванні однієї антигенної детермінанти або епітопу. Цим вони відрізняється від поліклональних антитіл, які зазвичай включають різні антитіла, спрямовані проти різних антигенних детермінант. Термін "моноклональне" антитіло або його антигензв'язуючий фрагмент охоплює як інтактні, так і повнорозмірні моноклональні антитіла, а також фрагменти антитіл (як-от Fab, Fab', F(ab')₂, Fv), одноланцюгові (scFv) мутанти, злиті білки, що містять частину антитіла, і будь-яку іншу модифіковану молекулу імуноглобуліну, що містить сайт розпізнавання антигена. Крім того, "моноклональне" антитіло або його антигензв'язуючий фрагмент стосується таких антитіл і їх антигензв'язуючих фрагментів, отриманих будь-якою кількістю способів, включаючи, але не обмежуючись, гібридомою, селекцією за допомогою фагового дисплею, рекомбінантною експресією та трансгенними тваринами.

У контексті цього документа терміни "варіабельна область" або "варіабельний домен" використовуються як взаємозамінні і є загальними в цій області техніки. Зазначена варіабельна область зазвичай стосується фрагмента антитіла, зазвичай, легкого або важкого ланцюга, зазвичай близько аміно-кінцевої ділянки від 110 до 120 амінокислот або від 110 до 125 амінокислот у зрілому важкому ланцюгу та від близько 90 до 115 амінокислот у зрілому легкому ланцюгу, які розрізняються за послідовністю серед антитіл та беруть участь у зв'язуванні і специфічності конкретного антитіла відносно його конкретного антигена. Варіабельна послідовність зосереджена в тих областях, які називаються областями, що визначають комплементарність (CDR), в той час як більш високонсервативні області у варіабельному домені називаються каркасними областями (FR). Не бажаючи бути зв'язаними будь-яким конкретним механізмом або теорією, вважається, що CDR легкого та важкого ланцюгів в першу чергу відповідають за взаємодію і специфічність антитіла з антигеном. У деяких варіантах

здійснення зазначена варіабельна область являє собою варіабельну область людини. У деяких варіантах здійснення зазначена варіабельна область включає CDR гризунів або мишей, і каркасні області людини (FR). У конкретних варіантах здійснення зазначена варіабельна область являє собою варіабельну область приматів (наприклад, приматів, відмінних від людини). У деяких варіантах здійснення зазначена варіабельна область містить CDR гризунів або мишей, і каркасні області (FR) приматів (наприклад, приматів, відмінних від людини).

Терміни "VL" і "домен VL" використовуються як взаємозамінні для позначення варіабельної області легкого ланцюга антитіла.

Терміни "VH" і "домен VH" використовуються як взаємозамінні для позначення варіабельної області важкого ланцюга антитіла.

Термін "нумерація за Кабатом" і подібні терміни відомі в цій області техніки і стосуються системи нумерації амінокислотних залишків у варіабельних областях важкого та легкого ланцюгів антитіла, або його антигензв'язуючого фрагмента. У деяких аспектах CDR можуть бути визначені відповідно до системи нумерації за Кабатом (див., наприклад, Kabat EA & Wu TT (1971) Ann NY Acad Sci 190: 382-391 and Kabat EA et al., (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242). Використовуючи систему нумерації за Кабатом, CDR в молекулі важкого ланцюга антитіла зазвичай присутні в положеннях амінокислот з 31 до 35, які необов'язково можуть включати одну або дві додаткові амінокислоти, що йдуть за 35 (позначені в схемі нумерації за Кабатом як 35A і 35B) (CDR1), положеннях амінокислот з 50 до 65 (CDR2) і положеннях амінокислот з 95 до 102 (CDR3). Використовуючи систему нумерації за Кабатом, CDR легкого ланцюга молекули антитіла зазвичай присутні в положеннях амінокислот з 24 по 34 (CDR1), положеннях амінокислот з 50 по 56 (CDR2) і положеннях амінокислот з 89 по 97 (CDR3). У конкретному варіанті здійснення зазначені CDR описаних у цьому документі антитіл були визначені відповідно до схеми нумерації за Кабатом.

Нумерація за Чотіа, навпаки, відноситься до розташування структурних петель (Chothia and Lesk, J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987)). Кінець петлі CDR-H1 за Чотіа при нумерації відповідно до системи нумерації за Кабатом варіюється між H32 і H34 залежно від довжини петлі (це пов'язано з тим, що в схемі нумерації за Кабатом в H35A і H35B розміщуються вставки; якщо ані 35A, ані 35B не присутні, петля закінчується на 32, якщо присутній тільки 35A, петля закінчується на 33, якщо присутні обидва 35A і 35B, петля закінчується на 34). Гіперваріабельні області за AbM являють собою компромісний варіант між CDR за Кабатом і структурними петлями за Чотіа, і використовуються в програмному забезпеченні для моделювання антитіл Oxford Molecular's AbM.

Петля	Кабаг	AbM	Чотіа
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
		(Нумерація за Кабатом)	
H1	H31-H35	H26-H35	H26-H32
		(Нумерація за Чотіа)	
H2	H50-H65	H50-H58	H52-H56
H3	H95-H102	H95-H102	H95-H102

Термін "константна область" або "константний домен", в контексті цього документа, є взаємозамінними і мають загальноприйняте значення в цій області техніки. Константна область являє собою фрагмент антитіла, наприклад, карбоксильний кінцевий фрагмент легкого та/або важкого ланцюга, який не бере участь у зв'язуванні антитіла з антигеном, але може проявляти різні ефекторні функції, як-от взаємодія з рецептором Fc. Константна область молекули імуноглобуліну зазвичай має більш консервативну амінокислотну послідовність у порівнянні з варіабельним доменом імуноглобуліну. У деяких аспектах антитіло або його антигензв'язуючий фрагмент містить константну область або її частину, достатню для антитілозалежної клітинноопосередкованої цитотоксичності (ADCC).

Термін "важкий ланцюг", в контексті цього документа, коли він використовується відносно антитіла, може стосуватися будь-якого окремого типу, наприклад, альфа (α), дельта (δ), епсилон (ϵ), гамма (γ) і мію (μ), на основі амінокислотної послідовності константного домену, які дають початок класам антитіл IgA, IgD, IgE, IgG і IgM, відповідно, включаючи підкласи IgG, наприклад, IgG1, IgG2, IgG3 і IgG4. Амінокислотні послідовності важкого ланцюга добре відомі в

цій галузі техніки. У конкретних варіантах здійснення важкий ланцюг являє собою важкий ланцюг людини.

Термін "легкий ланцюг", в контексті цього документа, при використанні відносно антитіла може стосуватися будь-якого окремого типу, наприклад, каппа (κ) або лямбда (λ) на основі амінокислотної послідовності константних доменів. Амінокислотні послідовності легкого ланцюга добре відомі в цій галузі техніки. У конкретних варіантах здійснення легкий ланцюг являє собою легкий ланцюг людини.

Термін "химерні" антитіла або їх антигензв'язуючі фрагменти стосуються антитіл або їх антигензв'язуючих фрагментів, в яких амінокислотна послідовність отримана від двох або більше видів. Зазвичай варіабельна область як легких, так і важких ланцюгів відповідає варіабельній області антитіл або їх антигензв'язуючих фрагментів, отриманих від одного виду ссавців (наприклад, миші, щура, кролика тощо) з бажаною специфічністю, афінністю і характеристиками, в той час як константні області гомологічні послідовностям антитіл або їх антигензв'язуючих фрагментів, отриманих від іншого джерела (зазвичай, людини), щоб уникнути індукції імунної відповіді у цього виду.

Термін "гуманізоване" антитіло або його антигензв'язуючий фрагмент стосується форм антитіл, які не є людськими (наприклад, мишачих), або антигензв'язуючих фрагментів, які являють собою специфічні ланцюги імуноглобуліну, химерні імуноглобуліни або їх фрагменти, які містять мінімальну кількість послідовностей, які не є людськими (наприклад, мишачі). Зазвичай, гуманізовані антитіла або антигензв'язуючі фрагменти являють собою імуноглобуліни людини, в яких залишки з області, що визначає комплементарність, (CDR) замінені залишками з CDR видів, які не належать до людини, (наприклад, миші, щура, кролика, хом'яка), які мають бажану специфічність, афінність і характеристики ("з прищепленою 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)). У деяких випадках певні залишки каркасної області (FR) Fv імуноглобуліну людини замінюються відповідними залишками антитіла або фрагменту з видів, відмінних від людини, яке має бажану специфічність, афінність і характеристики. Гуманізоване антитіло або його антигензв'язуючий фрагмент може бути додатково модифікований шляхом заміни додаткових залишків або в каркасній області Fv і/або в залишках CDR нелюдського походження для поліпшення й оптимізації специфічності, афінності та/або характеристик антитіла або фрагментів антигензв'язуючого фрагмента. У цілому, гуманізоване антитіло або його антигензв'язуючий фрагмент буде містити варіабельні домени, що містять всі або практично всі області CDR, які відповідають нелюдському імуноглобуліну, тоді як всі або практично всі області FR є областями консенсусної послідовності імуноглобуліну людини. Гуманізоване антитіло або його антигензв'язуючий фрагмент може також містити щонайменше частину константної області або домену (Fc) імуноглобуліну, зазвичай, імуноглобуліну людини. Приклади способів, які використовуються для створення гуманізованих антитіл, описані в патенті США 5225539; Roguska et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 91(3):969-973 (1994) і Roguska et al., Protein Eng. 9(10):895-904 (1996). У деяких варіантах здійснення "гуманізоване антитіло" являє собою антитіло зі зміненою поверхнею.

Термін "антитіло людини" або його антигензв'язуючий фрагмент означає антитіло або його антигензв'язуючий фрагмент, що має амінокислотну послідовність, отриману з локусу гена імуноглобуліну людини, де таке антитіло або антигензв'язуючий фрагмент отримують з використанням будь-якого способу, відомого в цій галузі техніки. Це визначення антитіла людини або його антигензв'язуючого фрагмента включає інтактні або повнорозмірні антитіла та їх фрагменти.

"Афукозильоване" антитіло або його антигензв'язуючий фрагмент, або антитіло, або його антигензв'язуючий фрагмент "без фукози" стосується ізотопного антитіла IgG1 або IgG3, або його антигензв'язуючого фрагмента, в якому відсутня фукоза в його глікозилюванні константної області. Глікозилювання IgG1 або IgG3 людини відбувається в Asn297 у вигляді глікозилювання корового фукозильованого біантенного комплексного олігосахариду із закінченням із аж до 2 залишків Gal. У деяких варіантах здійснення афукозильоване антитіло позбавлене фукози в положенні Asn297. Такі структури позначають G0, G1 (1,6 або 1,3), або G2 гліканові залишки залежно від кількості термінальних залишків Gal. Див., наприклад, Raju, T. S., BioProcess Int. 1: 44-53 (2003). Глікозилювання СНО-типу Fc-область антитіл описане, наприклад, в Routier, F. FL, Glycosylconjugate J. 14: 201-207 (1997).

Способи вимірювання фукозилювання включають будь-які способи, відомі в цій області техніки. Для цілей цього опису фукозилювання виявляється способом, описаним у Прикладі 1 WO2015/017600, який повністю включений в цей документа шляхом посилання. Якщо коротко, аналіз гліканів виконується шляхом вивільнення гліканів з антитіла (наприклад, шляхом

ферментативного вивільнення), мічення гліканів антраніловою кислотою (2-AA) та потім очищення мічених гліканів. Нормально-фазова ВЕРХ з флуоресцентним детектуванням використовується для розділення гліканів і вимірювання відносної кількості кожного глікана в антитілі. Глікани можуть бути позитивно ідентифіковані як такі, що не містять або містять фукозу за допомогою мас-спектрометрії. У деяких варіантах здійснення фукоза не виявляється в композиції, що містить множину афукозильованих антитіл або їх антигензв'язуючих фрагментів. У деяких варіантах здійснення афукозильоване антитіло або його антигензв'язуючий фрагмент має підвищену афінність до Fc-гамма RIIIA. У деяких варіантах здійснення афукозильоване антитіло або його антигензв'язуючий фрагмент має підвищену афінність до Fc-гамма RIIIA(V158). У деяких варіантах здійснення афукозильоване антитіло або його антигензв'язуючий фрагмент має підвищену афінність до Fc-гамма RIIIA(F158).

"Афінність зв'язування" зазвичай стосується сили загальної суми нековалентних взаємодій між одним сайтом зв'язування молекули (наприклад, антитілом або його антигензв'язуючим фрагментом) і її партнером зв'язування (наприклад, антигеном). Якщо не вказано інше, в контексті цього опису "афінність зв'язування" стосується дійсної афінності зв'язування, яка відображає взаємодію в співвідношенні 1:1 між членами пари, що зв'язує, (наприклад, антитілом або його антигензв'язуючим фрагментом, і антигеном). Афінність молекули X до її партнера Y зазвичай може бути представлена константою дисоціації (K_D). Афінність може бути виміряна і/або виражена кількома способами, відомими в цій галузі техніки, включаючи, але не обмежуючись цим, константу рівноважної дисоціації (K_D) і константу рівноважної асоціації (K_A). K_D обчислюється як співвідношення k_{off}/k_{on} , тоді як K_A обчислюється як співвідношення k_{on}/k_{off} . k_{on} стосується константи швидкості асоціації, наприклад, антитіла або його антигензв'язуючого фрагмента з антигеном, а k_{off} стосується дисоціації, наприклад, антитіла або його антигензв'язуючого фрагмента від антигена. k_{on} і k_{off} можуть бути визначені способами, відомими фахівцям в цій області техніки, як-от BIAcore® або KinExA.

У контексті цього документа, термін "епітоп" стосується локалізованої області антигену, з якою антитіло або його антигензв'язуючий фрагмент можуть специфічно зв'язуватися. Епітоп може являти собою, наприклад, суміжні амінокислоти поліпептиду (лінійний або безперервний епітоп), або епітоп може, наприклад, являти собою об'єднані дві або більше несуміжні області поліпептиду або поліпептидів (конформаційний, нелінійний, переривчастий або несуміжний епітоп). У деяких варіантах здійснення зазначений епітоп, з яким специфічно зв'язується антитіло або його антигензв'язуючий фрагмент, може бути визначений, наприклад, за допомогою ЯМР-спектроскопії, досліджень дифракційної рентгенівської кристалографії, ІФА, аналізів обміну водень/дейтерій в поєднанні зі мас-спектрометрією (наприклад, рідинною хроматографією зі мас-спектрометрією з електророзпиленням), аналізів на основі олігопептидного сканування і/або картування мутагенезу (наприклад, картування спрямованого мутагенезу). Для рентгенівської кристалографії кристалізація може бути виконана з використанням будь-якого зі способів, відомих в цій області (наприклад, Giegé R et al., (1994) *Acta 5 Crystallogr D Biol Crystallogr* 50(Pt 4): 339-350; McPherson A (1990) *Eur J Biochem* 189: 1-23; Chayen NE (1997) *Structure* 1269-1274; McPherson A (1976) *J Biol Chem* 251: 6300-6303). Антитіло/його антигензв'язуючий фрагмент: кристали антигену можуть бути вивчені з використанням добре відомих рентгенографічних способів і можуть бути уточнені з допомогою комп'ютерного програмного забезпечення, як-от X-PLOR (Єльський університет, 1992, розповсюджується Molecular Simulations, Inc.; див., наприклад, *Meth Enzymol* (1985) volumes 114 & 115, eds Wyckoff HW et al.; U.S. 2004/0014194) і 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). Дослідження картування мутагенезу можуть бути виконані з використанням будь-якого методу, відомого фахівцю в цій області техніки. Див., наприклад, Champe M et al., (1995) *J Biol Chem* 270: 1388-1394 and Cunningham BC & Wells JA (1989) *Science* 244: 1081-1085 для опису методів дослідження мутагенезу, включаючи методи дослідження аланін-сканувальним мутагенезом.

Терміни "білок програмованої клітинної загибелі 1" і "PD-1" стосуються імунінігуючого рецептора, що належить до сімейства CD28. PD-1 експресується переважно на раніше активованих Т-клітинах *in vivo* і зв'язується з двома лігандами, PD-L1 і PD-L2. У контексті цього документа термін "PD-1" включає PD-1 людини (hPD-1), варіанти і ізоформи hPD-1, що зустрічаються в природі, і видові гомологи hPD-1.

Терміни "ліганд 1 білка програмованої клітинної загибелі 1" і "PD-L1" стосуються одного з двох лігандів глікопротеїну клітинної поверхні для PD-1 (іншим є PD-L2), які пригнічують активацію Т-клітин і секрецію цитокінів при зв'язуванні з PD-1. У контексті цього документа

термін "PD-L1" включає PD-L1 людини (hPD-L1), варіанти і ізоформи hPD-1, що зустрічаються в природі, і видові гомологи hPD-L1.

Термін "антагоніст PD-1/PD-L1" стосується фрагменту, який порушує сигнальний шлях PD-1/PD-L1. У деяких варіантах здійснення зазначений антагоніст інгібує сигнальний шлях PD-1/PD-L1 шляхом зв'язування з PD-1 і/або PD-L1. У деяких варіантах здійснення зазначений антагоніст PD-1/PD-L1 також зв'язується з PD-L2. У деяких варіантах здійснення антагоніст PD-1/PD-L1 блокує зв'язування PD-1 з PD-L1 і, необов'язково, PD-L2. Необмежуючі приклади антагоністів PD-1/PD-L1 включають антагоністи PD-1, як-от антитіла, які зв'язуються з PD-1, наприклад, ніволумаб (OPDIVO) і пембролізумаб (KEYTRUDA); антагоністи PD-L1, як-от антитіла, які зв'язуються з PD-L1 (наприклад, атезолізумаб (TECENTRIQ), дурвалумаб і авелумаб); злиті білки, як-от AMP-224; і пептиди, як-от AUR-012.

"Пембролізумаб" належить до гуманізованих моноклональних антитіл до PD-1, які є активним інгредієнтом комерційного лікарського препарату, який називається KEYTRUDA®, що продається Merck & Co.

Поліпептид, антитіло, полінуклеотид, вектор, клітина або композиція, які "виділені", являють собою поліпептид, антитіло, полінуклеотид, вектор, клітину або композицію, які перебувають у формі, що не зустрічається в природі. Виділені поліпептиди, антитіла, полінуклеотиди, вектори, клітини або композиції включають ті, які були очищені до такого міри, що вони більше не перебувають в тій формі, в якій вони зустрічаються в природі. У деяких варіантах здійснення виділені антитіло, полінуклеотид, вектор, клітина або композиція є по суті чистими. У цьому контексті "по суті чистий" стосується матеріалу, який має чистоту не менше 50 % (тобто, не містить забруднюючих речовин), чистоту не менше 90 %, чистоту не менше 95 %, чистоту не менше 98 % або чистоту не менше 99 %.

Терміни "поліпептид", "пептид" і "білок" використовуються в цьому документі як взаємозамінні для позначення полімерів амінокислот будь-якої довжини. Полімер може бути лінійним або розгалуженим, він може містити модифіковані амінокислоти і може перериватися не амінокислотами. Зазначені терміни також охоплюють полімер амінокислоти, який був модифікований природним шляхом або штучно; наприклад, утворення дисульфідного зв'язку, глікозилювання, ліпидування, ацетилювання, фосфорилування або будь-які інші маніпуляції або модифікації, як-от кон'югація з компонентом, що мітить. Також термін включає, наприклад, поліпептиди, що містять один або більше аналогів амінокислоти (включаючи, наприклад, неприродні амінокислоти тощо), а також інші модифікації, відомі в цій області техніки. Зрозуміло, що оскільки поліпептиди згідно цього винаходу засновані на антитілах, у деяких варіантах здійснення поліпептиди можуть зустрічатися у вигляді окремих ланцюгів або зв'язаних ланцюгів.

Термін "клітина-господар" в контексті цього документу може означає будь-який тип клітини, наприклад, первинну клітину, клітину в культурі або клітину з клітинної лінії. У конкретних варіантах здійснення термін "клітина-господар" стосується клітини, трансфікованої молекулою нуклеїнової кислоти, і потомства або потенційного потомства такої клітини. Потомство такої клітини може не бути ідентичним батьківській клітині, трансфікованій молекулою нуклеїнової кислоти, наприклад, через мутації або вплив оточення, які можуть виникати в наступних поколіннях, або інтеграції молекули нуклеїнової кислоти в геном клітини-господаря.

Термін "фармацевтична композиція" стосується препарату, який перебуває в такій формі, щоб забезпечити біологічну активність активного інгредієнта, щоб бути ефективною, і який не містить будь-яких додаткових компонентів, які є неприйнятно токсичними для суб'єкта, якому буде вводиться композиція. Композиція може бути стерильною.

Терміни "ввести", "вводити", "введення" тощо, які використовуються в цьому документі, стосуються способів, які можуть використовуватися для забезпечення доставки лікарського засобу, наприклад, антитіла до B7-H4 або його антигензв'язуючого фрагмента в бажану ділянку біологічної дії (наприклад, внутрішньовенне введення). Методи введення, які можна використовувати з агентами і способами, описаними в цьому документі, можна знайти в, наприклад, Goodman and Gilman, The Pharmacological Basis of Therapeutics, current edition, Pergamon; and Remington's, Pharmaceutical Sciences, current edition, Mack Publishing Co., Easton, Pa.

У контексті цього документа терміни "суб'єкт" і "пацієнт" вживаються як взаємозамінні. Суб'єкт може бути твариною. У деяких варіантах здійснення зазначений суб'єкт являє собою ссавця, як-от тварину, яка не є людиною (наприклад, корову, свиню, коня, кішку, собаку, щура, мишу, мавпу або іншого примата тощо). У деяких варіантах здійснення зазначеним суб'єктом є яванський макак. У деяких варіантах здійснення зазначеним суб'єктом є людина.

Термін "терапевтично ефективна кількість" стосується кількості лікарського засобу, наприклад, антитіла до B7-H4 або його антигензв'язуючого фрагмента, ефективного для лікування захворювання або розладу у суб'єкта. У разі онкологічного захворювання зазначена терапевтично ефективна кількість лікарського засобу може зменшити кількість ракових клітин; зменшити розмір або навантаження пухлини; інгібувати до деякої міри інфільтрацію ракових клітин в периферичні органи; інгібувати до деякої міри метастазування пухлини; інгібувати до деякої міри зростання пухлини; полегшити до деякої міри один або більше симптомів, пов'язаних із онкологічним захворюванням; і/або призводити до сприятливої відповіді, як-от збільшення виживаності без прогресування захворювання (ВБП), безрецидивна виживаність (БРВ), загальна виживаність (ЗВ), повна відповідь (ПВ), часткова відповідь (ЧВ) або в деяких випадках стабільне захворювання (СЗ), зменшення прогресуючого захворювання (ПЗ), зменшення часу до прогресування (ЧДП) або будь-якої їх комбінації. У тій мірі, в якій лікарський засіб може запобігати зростанню і/або вбивати існуючі ракові клітини, він може бути цитостатичним і/або цитотоксичним.

Такі терміни, як "лікування", "лікують", "лікувати", "полегшення" і "полегшити" стосуються терапевтичних заходів, які виліковують, уповільнюють, зменшують симптоми і/або зупиняють прогресування патологічного стану або розладу. Таким чином, лікування потребують ті, у кого вже діагностовано захворювання або є підозра на його наявність. У деяких варіантах здійснення у суб'єкта успішно "лікують" онкологічне захворювання відповідно до способів за цим винаходом, якщо пацієнт демонструє одне або більше з наведеного: зменшення кількості або повна відсутність ракових клітин; зменшення розміру пухлини; інгібування або відсутність інфільтрації ракових клітин в периферичні органи, включаючи, наприклад, поширення раку в м'які тканини та кістки; інгібування або відсутність метастазів пухлини; інгібування або відсутність зростання пухлини; полегшення одного або декількох симптомів, пов'язаних із конкретним онкологічним захворюванням; зниження захворюваності та смертності; поліпшення якості життя; зменшення онкогенності, онкогенної частоти або онкогенної здатності пухлини; зменшення кількості або частоти ракових стовбурових клітин в пухлині; диференціювання онкогенних клітин у непухлинний стан; збільшення виживаності без прогресування (ВБП), безрецидивної виживаності (БРВ), загальної виживаності (ЗВ), повної відповіді (ПВ), часткової відповіді (ЧВ), стабільного захворювання (СЗ), зменшення прогресуючого захворювання (ПЗ), зменшений час до прогресування (ЧДП) або будь-яку їх комбінацію.

Терміни "онкологічне захворювання" і "злоякісний" стосуються або описують фізіологічний стан у ссавців, при якому популяція клітин характеризується нерегульованим зростанням клітин. Приклади онкологічного захворювання включають, але не обмежуються ними, гінекологічні онкологічні захворювання (наприклад, рак молочної залози (включаючи тричі негативний рак молочної залози, рак молочної залози, позитивний за рецепторами гормонів (HR), протокову карциному, рак яєчників і рак ендометрію)), недрібноклітинний рак легені, рак підшлункової залози, рак щитоподібної залози, рак нирки (наприклад, нирково-клітинний рак) і рак сечового міхура (наприклад, карцинома уротеліальної клітини). Онкологічне захворювання може бути "онкологічним захворюванням, при якому експресується B7-H4", або "B7-H4-експресуючим онкологічним захворюванням", або "B7-H4-позитивним онкологічним захворюванням". Такі терміни стосуються онкологічного захворювання, яке містить клітини, що експресують B7-H4. Онкологічне захворювання може бути солідною пухлиною, яка експресує B7-H4. Онкологічне захворювання може бути первинною пухлиною, прогресуючим або метастатичним онкологічним захворюванням.

"Рефрактерне" онкологічне захворювання являє собою онкологічне захворювання, яке прогресує, навіть якщо пацієнту з онкологічним захворюванням проводиться протипухлинне лікування, як-от хіміотерапія.

"Рецидивуюче" онкологічне захворювання являє собою онкологічне захворювання, яке повторно розвивається, або на початковій ділянці або у віддаленому місці, після відповіді на початкову терапію.

Як показано в цьому документі, введення антитіла до B7-H4 або його антигензв'язуючого фрагмента, і антитіла до PD-1 або його антигензв'язуючого фрагмента може забезпечувати "синергізм" або бути "синергетичним", тобто ефект, який досягається, коли кількість активних інгредієнтів, які використовуються разом, перевищує суму ефектів, що виникають в результаті використання активних інгредієнтів окремо. Синергетичний ефект може бути досягнутий, коли активні інгредієнти: (1) складені спільно і вводяться або доставляються одночасно в комбінованій лікарській формі з одноразовим дозуванням; (2) поставляються серійно, по черзі або паралельно у вигляді окремих композицій; або (3) за допомогою будь-яких інших схем введення. При введенні терапії, яка чергується, синергетичний ефект може бути досягнутий,

коли сполуки вводять або доставляють послідовно, наприклад, шляхом різних ін'єкцій в окремих шприцах.

Як використовується в цьому розкритті та формулі винаходу, форми однини включають форми множини, якщо з контексту явно не випливає інше.

5 Слід розуміти, що в тих випадках, коли варіанти здійснення описані в цьому документі з формулюванням "що містить", також передбачені аналогічні варіанти здійснення, описані в термінах "що складається з" та/або "що складається по суті з". У цьому описі "містить", "що містить", "що включає" і "що має" тощо можуть мати значення, яке приписується у патентному праві США, і можуть означати "включає", "що включає" тощо; "що по суті складається з" або "що складається по суті" аналогічним чином мають значення, вказані в патентному праві США, і термін є необмежувачим, що допускає присутність більше того, що вказано, якщо основні або нові характеристики того, про що йде мова, не по суті змінюються за наявності більше того, що вказано, але виключають варіанти здійснення за попереднім рівнем техніки.

15 Якщо спеціально не вказано або не очевидно з контексту, термін "або", який використовується в цьому документі, має значення "що включає". Термін "та/або", який використовується в цьому документі в фразі, як-от "А та/або В", призначений для включення "А і В", так і "А або В", "А" і "В". Аналогічним чином, термін "та/або", який використовується в такій фразі, як "А, В та/або В", призначений для охоплення кожного з наведених варіантів здійснення: А, В і В; А, В або В; А або В; А або В; В або В; А і В; А і В; В і В; А (окремо); В (окремо); і В (окремо).

20 Терміни "близько" і "приблизно", в контексті цього документа, коли використовуються для зміни числового значення або числового діапазону, вказують, що відхилення від 5 % до 10 % більше та від 5 % до 10 % менше значення або діапазону залишаються в межах ймовірного наведеного значення або діапазону.

25 Будь-які композиції або способи, представлені в цьому документі, можуть бути об'єднані з однією або більше з будь-яких інших композицій і способів, представлених у цьому документі.

4.2 Способи лікування онкологічного захворювання

В одному аспекті в цьому документі представлені способи лікування онкологічного захворювання у суб'єкта-людини, що включають введення суб'єкту, який цього потребує, (i) антитіла до B7-H4 або його антигензв'язуючого фрагмента, описаного в цьому документі, або його фармацевтичної композиції, як описано в цьому документі, в комбінації з (ii) інгібітором PD-1/PD-L1, описаним у цьому документі, або його фармацевтичною композицією, як описано в цьому документі, і причому (i) і (ii) вводяться одночасно або послідовно. Для введення "одночасно" в деяких варіантах здійснення агенти, зазначені в (i) і (ii), вводять у вигляді окремих композицій в один і той самий день, причому один вводять за іншим; або в інших варіантах здійснення агенти, зазначені в (i) і (ii), змішують разом перед введенням і, таким чином, вводять у вигляді суміші. Наприклад, у деяких варіантах здійснення агенти, як в (i) і (ii), можуть бути упаковані і зберігатися в одному і тому самому флаконі (тобто препарат з фіксованою комбінацією доз), або, альтернативно, флакони, що містять кожен окремий агент, можуть бути змішані разом безпосередньо перед введенням. Для "послідовного" введення агенти, як в (i) і (ii), вводять у вигляді окремих композицій в різні дні. У різних варіантах здійснення вказані агенти можуть бути введені *in vivo* різними шляхами, включаючи, але не обмежуючись цим, внутрішньовенний.

45 Комбінація антитіла до B7-H4 або його антигензв'язуючого фрагмента і інгібітора PD-1/PD-L1 може бути синергічною.

В одному аспекті інгібітора PD-1 являє собою пембролізумаб. Послідовності важкого і легкого ланцюгів пембролізумаба перераховані в наступній таблиці. У контексті послідовностей важкого і легкого ланцюгів послідовності CDR показані жирним шрифтом, а послідовності варіабельної області підкреслені.

50

Послідовності пембролізумаба

Домен	Амінокислотна послідовність (SEQ ID NO)
Важкий ланцюг	<u>QVQLVQSGVEVKKPGASVKVSC</u> <u>KASGYTFTNYYMYWVRQAP</u> <u>GQGLEWMGGINPSNGGTNFNEKFKNRVTLT</u> <u>DSSTTTAYME</u> <u>LKSLQFDDTAVYYCARRDYRFD</u> <u>MGFDYWGQGTTVTVSSAST</u> KGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGKTYTCNVDPKPS NTKVDKRVERESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQF NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSC SVMHEALHNHYTQKSLSLGLK (SEQ ID NO:30)
Легкий ланцюг	<u>EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCR</u> <u>RASKGVSTSGYSYLHWYQQK</u> <u>PGQAPRLLIYLA</u> <u>SYLESGVPARFSGSGSGTDFTLT</u> <u>ISSLEPEDFA</u> <u>VYYCQHSRDLPL</u> <u>TFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKS</u> GTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK DSTYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRG EC (SEQ ID NO:31)
VH	GQGLEWMGGINPSNGGTNFNEKFKNRVTLTDSSTTTAYME LKSLQFDDTAVYYCARRDYRFDMGFDYWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO:32)
VL	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASKGVSTSGYSYLHWYQQK PGQAPRLLIYLA SYLESGVPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFA VYYCQHSRDLPLTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:33)
VH-CDR1	NYYMY (SEQ ID NO:34)
VH-CDR2	GINPSNGGTNFNEKFKN (SEQ ID NO:35)
VH-CDR3	RDYRFDMGFDY (SEQ ID NO:36)
VL-CDR1	RASKGVSTSGYSYLH (SEQ ID NO:37)
VL-CDR2	LASYLES (SEQ ID NO:38)
VL-CDR3	QHSRDLPLT (SEQ ID NO:39)

В одному аспекті зазначений інгібітор PD-1 являє собою антитіло або антигензв'язуючий фрагмент, що містить CDR варіабельної області важкого і легкого ланцюгів пембролізумаба; або антитіло або антигензв'язуючий фрагмент, що містить варіабельні області важкого і легкого ланцюгів пембролізумаба.

В одному аспекті спосіб лікування онкологічного захворювання у людини включає введення суб'єкту, який цього потребує, (i) антитіла до B7-H4 або його антигензв'язуючого фрагмента, описаного в цьому документі, або його фармацевтичної композиції, як описано в цьому документі, причому вводять від близько 0,005 до близько 20 мг/кг антитіла до B7-H4 або антигензв'язуючого фрагмента, і (ii) пембролізумаба або його фармацевтичну композицію, як описано в цьому документі, причому вводять близько 200 мг пембролізумаба, і при цьому (i) і (ii) вводять одночасно або послідовно з частотою, наприклад, приблизно один раз на три тижні.

[illegible]

В одному аспекті спосіб лікування онкологічного захворювання у людини включає введення суб'єкту, який цього потребує, (i) антитіла до B7-H4 або його антигензв'язуючого фрагмента, описаного в цьому документі, або його фармацевтичної композиції, як описано в цьому документі, причому вводять 0,1 мг/кг антитіла до B7-H4 або його антигензв'язуючого фрагмента, і (ii) пембролізумаба або його фармацевтичної композиції, як описано в цьому документі, причому вводять близько 200 мг пембролізумаба, і при цьому (i) і (ii) вводять одночасно або послідовно з частотою один раз кожні три тижні. В одному аспекті спосіб лікування онкологічного захворювання у людини включає введення суб'єкту, який цього потребує, (i) антитіла до B7-H4 або його антигензв'язуючого фрагмента, описаного в цьому документі, або його фармацевтичної композиції, як описано в цьому документі, причому вводять 0,3 мг/кг антитіла до B7-H4 або його антигензв'язуючого фрагмента, і (ii) пембролізумаба або його фармацевтичної композиції, як описано в цьому документі, причому вводять близько 200 мг пембролізумаба, і при цьому (i) і (ii) вводять одночасно або послідовно з частотою один раз кожні три тижні. В одному аспекті спосіб лікування онкологічного захворювання у людини включає введення суб'єкту, який цього потребує, (i) антитіла до B7-H4 або його антигензв'язуючого фрагмента, описаного в цьому документі, або його фармацевтичної композиції, як описано в цьому документі, причому вводять 1 мг/кг антитіла до B7-H4 або його антигензв'язуючого фрагмента, і (ii) пембролізумаба або його фармацевтичної композиції, як

описано в цьому документі, причому вводять близько 200 мг пембролізумаба, і при цьому (i) і (ii) вводять одночасно або послідовно з частотою один раз кожні три тижні. В одному аспекті спосіб лікування онкологічного захворювання у людини включає введення суб'єкту, який цього потребує, (i) антитіла до B7-H4 або його антигензв'язуючого фрагмента, описаного в цьому документі, або його фармацевтичної композиції, як описано в цьому документі, причому вводять 3 мг/кг антитіла до B7-H4 або його антигензв'язуючого фрагмента, і (ii) пембролізумаба або його фармацевтичної композиції, як описано в цьому документі, причому вводять близько 200 мг пембролізумаба, і при цьому (i) і (ii) вводять одночасно або послідовно з частотою один раз кожні три тижні. В одному аспекті спосіб лікування онкологічного захворювання у людини включає введення суб'єкту, який цього потребує, (i) антитіла до B7-H4 або його антигензв'язуючого фрагмента, описаного в цьому документі, або його фармацевтичної композиції, як описано в цьому документі, причому вводять 10 мг/кг антитіла до B7-H4 або його антигензв'язуючого фрагмента, і (ii) пембролізумаба або його фармацевтичної композиції, як описано в цьому документі, причому вводять близько 200 мг пембролізумаба, і при цьому (i) і (ii) вводять одночасно або послідовно з частотою один раз кожні три тижні. В одному аспекті спосіб лікування онкологічного захворювання у людини включає введення суб'єкту, який цього потребує, (i) антитіла до B7-H4 або його антигензв'язуючого фрагмента, описаного в цьому документі, або його фармацевтичної композиції, як описано в цьому документі, причому вводять 20 мг/кг антитіла до B7-H4 або його антигензв'язуючого фрагмента, і (ii) пембролізумаба або його фармацевтичної композиції, як описано в цьому документі, причому вводять близько 200 мг пембролізумаба, і при цьому (i) і (ii) вводять одночасно або послідовно з частотою один раз кожні три тижні.

У деяких варіантах здійснення способів, представлених у цьому документі, антитіло до B7-H4 або його антигензв'язуючий фрагмент або фармацевтична композиція, що містить антитіла до B7-H4 або їх антигензв'язуючі фрагменти, вводять внутрішньовенно. У деяких варіантах здійснення способів, представлених у цьому документі, пембролізумаб або його фармацевтична композиція вводиться внутрішньовенно.

У деяких варіантах здійснення в цьому документі представлені способи лікування онкологічного захворювання, вибраного з групи, що складається з: раку молочної залози (наприклад, прогресуючого раку молочної залози, тричі негативного раку молочної залози, раку молочної залози, позитивного за рецепторами гормонів (HR) або протокової карциноми), карциноми ендометрію, раку яєчників, уротеліального раку, недрібноклітинного раку легені (наприклад, плоскоклітинного раку), плоскоклітинного раку голови і шиї (HNSCC), лімфоми Ходжкіна (наприклад, класична лімфома Ходжкіна), меланоми, раку підшлункової залози, раку щитоподібної залози, раку нирки (наприклад, нирково-клітинна карцинома), раку сечового міхура (наприклад, уротеліальна карцинома), раку шлунка, раку шийки матки та раку з високою мікросателітною нестабільністю. У певному варіанті здійснення в цьому документі представлені способи лікування поширеного раку молочної залози (включаючи тричі негативний рак молочної залози, рак молочної залози, позитивний за рецепторами гормонів (HR)), рак яєчників, рак ендометрію або уротеліальний рак. У певному варіанті здійснення в цьому документі представлені способи лікування раку молочної залози. У певному варіанті здійснення рак молочної залози являє собою тричі негативний рак молочної залози. У певному варіанті здійснення в цьому документі представлені способи лікування раку молочної залози, позитивного за рецепторами гормонів (HR). У певному варіанті здійснення в цьому документі представлений спосіб лікування раку яєчників. У певному варіанті здійснення в цьому документі представлений спосіб лікування раку ендометрію. У певному варіанті здійснення в цьому документі представлений спосіб лікування уротеліального раку. У певному варіанті здійснення в цьому документі представлені способи лікування раку шлунково-кишкового тракту. У певному варіанті здійснення в цьому документі представлені способи лікування гінекологічного онкологічного захворювання. У певному варіанті здійснення в цьому документі представлені способи лікування раку голови і шиї. У певному варіанті здійснення в цьому документі представлені способи лікування раку сечостатевої системи. У певному варіанті здійснення, представленому в цьому документі, суб'єкт раніше не отримував терапію антагоністом PD-1/PD-L1. У деяких варіантах здійснення такі способи включають введення антитіла до B7-H4 або його антигензв'язуючого фрагмента, представленого в цьому документі, або фармацевтичної композиції, що містить антитіла до B7-H4 або їх антигензв'язуючі фрагменти, представлені в цьому документі, в комбінації з інгібітором PD-1/PD-L1 або його фармацевтичною композицією, представленою в цьому документі, пацієнту (наприклад, пацієнту-людині), який цього потребує.

У деяких варіантах здійснення зазначений рак являє собою онкологічне захворювання, що експресує B7-H4. У деяких варіантах здійснення зазначений рак являє собою солідну пухлина,

що експресує B7-H4. У деяких варіантах здійснення B7-H4 був виявлений (наприклад, за допомогою імуногістохімії (ІГХ)) в біологічному зразку, отриманому від суб'єкта.

Біологічний зразок може бути будь-яким біологічним зразком, отриманим від суб'єкта, лінії клітин, тканини або іншого джерела клітин, які потенційно експресують B7-H4. Способи отримання біопсій тканин і біологічних рідин людини добре відомі в цій області техніки. Біологічні зразки включають периферичні мононуклеарні клітини крові. Біологічний зразок також може бути зразком крові, в якому циркулюють пухлинні клітини (або "СТС") можуть експресувати B7-H4 і виявлятися.

Аналіз рівня експресії білка B7-H4 призначений для включення якісного або кількісного вимірювання або оцінки рівня білка B7-H4 в першому біологічному зразку або безпосередньо (наприклад, шляхом визначення або оцінки абсолютного рівня білка), або відносно (наприклад, порівнюючи з рівнем білка в другому біологічному зразку). Рівень експресії поліпептиду B7-H4 в першому біологічному зразку можна виміряти або оцінити, і порівняти зі стандартним рівнем білка B7-H4, при цьому стандартний рівень визначається з другого біологічного зразка, який не пошкоджений, або визначається шляхом усереднення рівнів із популяції, зразки якої не пошкоджені. Як буде зрозуміло в цій області техніки, як тільки "стандартний" рівень поліпептиду B7-H4 відомий, його можна повторно використовувати в якості стандарту для порівняння.

В іншому варіанті здійснення антитіло до B7-H4 або його антигензв'язуючий фрагмент, або фармацевтичну композицію, як описано в цьому документі, вводять пацієнту (наприклад, пацієнту-людині) з діагнозом онкологічне захворювання для збільшення проліферації Т-клітин, CD4+ Т-клітин або CD8+ Т-клітин у пацієнта. У такому варіанті здійснення пацієнту також вводять антагоніст PD-1/PD-L1, наприклад пембролізумаб, для блокування зв'язування PD-1 з PD-L1 і PD-L2 і активації Т-клітин. В іншому варіанті здійснення антитіло до B7-H4 або його антигензв'язуючий фрагмент, або фармацевтичну композицію вводять пацієнту (наприклад, пацієнту-людині) з діагнозом онкологічне захворювання для збільшення продукції інтерферону-гамма (IFN γ) у пацієнта. У такому варіанті здійснення пацієнту також вводять антагоніст PD-1/PD-L1, наприклад, пембролізумаб, для блокування зв'язування PD-1 з PD-L1 і PD-L2, і активації Т-клітин. В іншому варіанті здійснення антитіло до B7-H4, або його антигензв'язуючий фрагмент, або фармацевтичну композицію вводять пацієнту (наприклад, пацієнту-людині) з діагнозом онкологічне захворювання для блокування інгібуючої активності B7-H4 проти Т-клітин у пацієнта. У такому варіанті здійснення пацієнту також вводять антагоніст PD-1/PD-L1, наприклад, пембролізумаб, для блокування зв'язування PD-1 з PD-L1 і PD-L2, і активації Т-клітин. В іншому варіанті здійснення антитіло до B7-H4, або його антигензв'язуючий фрагмент, або фармацевтичну композицію вводять пацієнту (наприклад, пацієнту-людині) з діагнозом онкологічне захворювання для виснаження у пацієнта ракових клітин, що експресують B7-H4. У такому варіанті здійснення пацієнту також вводять антагоніст PD-1/PD-L1, наприклад, пембролізумаб, для блокування зв'язування PD-1 з PD-L1 і PD-L2, і активації Т-клітин.

У деяких варіантах здійснення цей винахід стосується антитіла до B7-H4 або його антигензв'язуючого фрагменту, або фармацевтичної композиції, представленої в цьому документі, для використання в комбінації з антагоністом PD-1/PD-L1, як-от пембролізумаб, або його фармацевтичної композиції в якості лікарського засобу, причому лікарський засіб призначений для введення в кількості від близько 0,1 мг/кг до близько 20 мг/кг (наприклад, близько 0,1 мг/кг, близько 0,3 мг/кг, близько 1 мг/кг, близько 3 мг/кг, близько 10 мг/кг або близько 20 мг/кг) антитіла або його антигензв'язуючого фрагмента, і близько 200 мг пембролізумаба. У таких варіантах здійснення антитіло або його антигензв'язуючий фрагмент, і пембролізумаб можуть бути складені спільно або окремо для введення одночасно або послідовно. У деяких аспектах цей винахід стосується антитіла до B7-H4 або його антигензв'язуючого фрагменту, або фармацевтичної композиції, представленої в цьому документі, для використання в комбінації з антагоністом PD-1/PD-L1, таким як пембролізумаб, або його фармацевтичної композиції в способі лікування раку, причому вводять від близько 0,1 мг/кг до близько 20 мг/кг (наприклад, близько 0,1 мг/кг, близько 0,3 мг/кг, близько 1 мг/кг, близько 3 мг/кг, близько 10 мг/кг або близько 20 мг/кг) антитіла або його антигензв'язуючого фрагмента, і вводять близько 200 мг пембролізумаба, і причому введення здійснюють послідовно або одночасно. У деяких аспектах цей винахід стосується антитіла до B7-H4 або його антигензв'язуючого фрагменту, або фармацевтичної композиції, представленої в цьому документі, для використання в комбінації з антагоністом PD-1/PD-L1, як-от пембролізумаб, в способі для лікування раку у суб'єкта, що включає введення суб'єкту від близько 0,1 мг/кг до близько 20 мг/кг (наприклад, близько 0,1 мг/кг, близько 0,3 мг/кг, близько 1 мг/кг, близько 3 мг/кг, близько 10 мг/кг або близько 20 мг/кг) антитіла або його антигензв'язуючого фрагмента, або фармацевтичної композиції, представленої в цьому документі, і введення близько 200 мг пембролізумаба або

фармацевтичної композиції, представленої в цьому документі, причому введення здійснюють послідовно або одночасно.

У деяких варіантах здійснення цей винахід стосується антитіла до B7-H4 або його антигензв'язуючого фрагменту, або фармацевтичної композиції, представленої в цьому документі, для використання в комбінації з антагоністом PD-1/PD-L1, як-от пембролізумаб, або його фармацевтичної композиції в якості лікарського засобу, причому лікарський засіб призначений для введення в дозах від 0,1 мг/кг до 20 мг/кг (наприклад, 0,1 мг/кг, 0,3 мг/кг, 1 мг/кг, 3 мг/кг, 10 мг/кг або 20 мг/кг) антитіла або його антигензв'язуючого фрагмента, і 200 мг пембролізумаба. У таких варіантах здійснення антитіло або його антигензв'язуючий фрагмент, і пембролізумаб можуть бути складені спільно або окремо для введення одночасно або послідовно. У деяких аспектах цей винахід стосується антитіла до B7-H4 або його антигензв'язуючого фрагменту, або фармацевтичної композиції, представленої в цьому документі, для використання в комбінації з антагоністом PD-1/PD-L1, таким як пембролізумаб, або його фармацевтичної композиції в способі лікування раку, при якому вводять від 0,1 мг/кг до 20 мг/кг (наприклад, 0,1 мг/кг, 0,3 мг/кг, 1 мг/кг, 3 мг/кг, 10 мг/кг або 20 мг/кг) антитіла або його антигензв'язуючого фрагмента, і вводять 200 мг пембролізумаба, і причому введення здійснюють послідовно або одночасно. У деяких аспектах цей винахід стосується антитіла до B7-H4 або його антигензв'язуючого фрагменту, або фармацевтичної композиції, представленої в цьому документі, для використання в комбінації з антагоністом PD-1/PD-L1, як-от пембролізумаб, в способі для лікування раку у суб'єкта, що включає введення суб'єкту від 0,1 мг/кг до 20 мг/кг (наприклад, 0,1 мг/кг, 0,3 мг/кг, 1 мг/кг, 3 мг/кг, 10 мг/кг або 20 мг/кг) антитіла або його антигензв'язуючого фрагмента, або фармацевтичної композиції, представленої в цьому документі, і введення 200 мг пембролізумаба або фармацевтичної композиції, представленої в цьому документі, причому введення здійснюють послідовно або одночасно.

У певних аспектах амінокислотна послідовність PD-1 людини являє собою:

MQIPQAPWPVWVAVLQLGWRPGWFLDSPDRPWNPTTFSPALLVTEGDNATFTCSFSNTSESF
VLNWWYRMSPSNQTDKLAAPEDRSQPGQDCFRVTQLPNGRDFHMSVVRARRNDSGTLYLCAISL
APKAQIKESLRAELRVTERRAEVPTAHPSPPRAGQFQTLVVGVGGLLSLVLLVWVLAVICSRAA
RGITIGARRTGQPLKEDPSAVPVFSVDYGELEDFQWREKTPEPPVPCVPEQTEYATIVFPSGMGTSSPA
RRGSADGPRSAQPLRPEDGHCSWPL (SEQ ID NO:40).

У певних аспектах амінокислотна послідовність PD-L1 людини являє собою:

MRIFAVFIFMTYWHLLNAFTVTVPKDLVVEYGSNMETIECKFPVEKQLDLAALIVWEMEDKNIIQF
VHGEEDLKVQHSSYRQARLLKDQLSLGNAALQITDVKLQDAGVYRCMISYGGADYKRITVKVNAPY
NKNQIRILVVDPTSEHETCQAEGYPKAEVIWTSDDHQVLSGKTTTTNSKREEKLFNVTSTLRINTTT
NEIFYCTFRRLDPEENHTAELVIPELPLANPPNERTHLVILGAILLCLGVALTFIFRLRKGRMMMDVKKCGI
QDTNSKKQSDTHLEET (SEQ ID NO:41).

4.3 Антитіла до B7-H4 та їх антигензв'язуючі фрагменти

У цьому документі представлені способи лікування раку у людини, які включають введення суб'єкту антитіл (наприклад, моноклональних антитіл, як-от химерні, гуманізовані антитіла або антитіла людини) і їх антигензв'язуючих фрагментів, які специфічно зв'язуються з B7-H4 (наприклад, B7-H4 людини) в поєднанні з антагоністом PD-1/PD-L1, як-от пембролізумаб. Типові антитіла B7-H4 та їх антигензв'язуючі фрагменти, які можна використовувати у способах, представлених в цьому документі, відомі в цій області техніки. Амінокислотні послідовності B7-H4 людини, яванського макака, миші і щура відомі в цій області техніки і також представлені в цьому документі, як представлено SEQ ID NO: 1-4 відповідно.

B7-H4 людини:

MASLGQILFWSIISIIILAGAIALIIGFGISGRHSITVTTVASAGNIGEDGILSCTFEPDIKLSDIVIQWLK
EGVLGLVHEFKEGKDELSEQDEMFRGRTAVFADQVIVGNASRLKNVQLTDAGTYKCYIITSKGKGN
NLEYKTGAFSMPENVVDYNASSETLRCEAPRWFPQPTVWVASQVDQGANFSEVSNTSFELNSENVT
MKVVSVLYNVTINNTYSCMIENDIAKATGDIKVTESEIKRRSHLQLLNSKASLCVSSFFAISWALLPLSP
YLMLK (SEQ ID NO:1).

B7-H4 яванського макака:

MASLGQILFWSIISIIIFILAGAIALIIGFGISGRHSITVTTVASAGNIGEDGILSCTFEPDIKLSDIVIQWLK
EGVIGLVHEFKEGKDELSEQDEMFRGRTAVFADQVIVGNASRLKNVQLTDAGTYKCYIITSKGKGN
NLEYKTGAFSMPENVVDYNASSETLRCEAPRWFPQPTVWVASQVDQGANFSEVSNTSFELNSENVT
MKVVSVLYNVTINNTYSCMIENDIAKATGDIKVTESEIKRRSHLQLLNSKASLCVSSFLAISWALLPLAP
YLMLK (SEQ ID NO:2).

B7-H4 миші

MASLGQIIFWSSIINIIILAGAIALIIGFGISGKHFITVTTFTSAGNIGEDGTLSCFEPDIKLNGIVIQWLK
EGIKGLVHEFKEGKDDLSQQHEMFRGRTAVFADQVVVGNASRLKNVQLTDAGTYTCYIRTSKGKGN

ANLEYKTGAFSMPEINVDYNASSESLRCEAPRWFPQPTVAWASQVDQGANFSEVSNTSFELNSEN
 TMKVSVLYNVTINNTYSCMIENDIAKATGDIKVTDSSEVKRRSQLQLLNSGSPSPCVSSAFVAGWALL
 SLSCCLMLR (SEQ ID NO:3).

B7-H4 щура

5 MASLGQIIFWSIINVIIILAGAIVLIGFGISGKHFTVTTFTSAGNIGEDGTLSCTFEPDIKLNIGIVIQWLK
 EGIKGLVHEFEKGGKDDLSQQHEMFRGRTAVFADQVVVGNASRLKKNVQLTDAGTYTCYIHTSKGKGN
 ANLEYKTGAFSMPEINVDYNASSESLRCEAPRWFPQPTVAWASQVDQGANFSEVSNTSFELNSEN
 TMKVSVLYNVTINNTYSCMIENDIAKATGDIKVTDSSEVKRRSQLLELLNSGSPSPCVSSVSAAGWALLSL
 SCCLMLR (SEQ ID NO:4).

10 У деяких варіантах здійснення антитіло або його антигензв'язуючий фрагмент для
 використання в способах, описаних у цьому документі, специфічно зв'язується з B7-H4 людини.
 У деяких варіантах здійснення антитіло або його антигензв'язуючий фрагмент для використання
 в способах, описаних у цьому документі, специфічно зв'язується з B7-H4 людини і яванського
 макака. У деяких варіантах здійснення антитіло або його антигензв'язуючий фрагмент для
 15 використання в способах, описаних у цьому документі, специфічно зв'язується з B7-H4 людини,
 миші і щура. У деяких варіантах здійснення антитіло або його антигензв'язуючий фрагмент для
 використання в способах, описаних у цьому документі, специфічно зв'язується з B7-H4 людини,
 яванського макака, миші і щура.

20 B7-H4 містить ектодомен IgC (амінокислоти 153-241 з SEQ ID NO: 1) і ектодомен IgV
 (амінокислоти 35-146 з SEQ ID NO: 1). У деяких варіантах здійснення антитіло або його
 антигензв'язуючий фрагмент для використання в способах, описаних у цьому документі,
 специфічно зв'язується з доменом IgV B7-H4 людини. Відповідно, в цьому документі
 представлені способи введення антитіл та їх антигензв'язуючих фрагментів, які специфічно
 зв'язуються з поліпептидом, що складається з амінокислот 35-146 SEQ ID NO: 1.

25 У деяких варіантах здійснення антитіло або його антигензв'язуючий фрагмент для
 використання в способах, описаних у цьому документі, специфічно зв'язується з B7-H4 людини і
 містить шість CDR антитіла 20502, перерахованих у Таблицях 1 і 2. "20502" стосується антитіла
 20502, описаного в цьому документі.

Таблиця 1

Амінокислотні послідовності VH CDR¹

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

¹ VH CDR в Таблиці 1 визначені за Кабатом.

30

Таблиця 2

Амінокислотні послідовності VL CDR²

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

² VL CDR в Таблиці 2 визначені за Кабатом.

У деяких варіантах здійснення антитіло або його антигензв'язуючий фрагмент для
 використання в способах, описаних у цьому документі, специфічно зв'язується з B7-H4 людини і
 містить VH антитіла 20502, зазначеного в Таблиці 3.

35

Таблиця 3

Амінокислотні послідовності варіабельного важкого ланцюга (VH)

Антитіло	Амінокислотна послідовність VH (SEQ ID NO)
20502	QLQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSIKSGSYWGWIRQPP GKGLEWIGNIYYSGSTYYNPSLRSRVTISVDTSKNQFSLKLSSV TAADTAVYYCAREGSYPNQFDPWGQGTLTVSS (SEQ ID NO:11)

У деяких варіантах здійснення антитіло або його антигензв'язуючий фрагмент для використання в способах, описаних у цьому документі, специфічно зв'язується з B7-H4 людини і містить VL антитіла 20502, зазначеного в Таблиці 4.

Таблиця 4:

Амінокислотні послідовності варіабельного легкого ланцюга (VL)

Антитіло	Амінокислотна послідовність VL (SEQ ID NO)
20502	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSNLAWYQQKPGQA PRLIYGASTRATGIPARFSGSGSGTEFTLTISLQSEDFAVYYC QQYHSFPFTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:12)

У деяких варіантах здійснення антитіло або його антигензв'язуючий фрагмент для використання в способах, описаних у цьому документі, специфічно зв'язується з B7-H4 людини і містить VH і VL антитіла 20502, перерахованих у Таблицях 3 і 4.

Таблиця 5

Амінокислотні послідовності VH FR³

Антитіло	VH FR1 (SEQ ID NO:)	VH FR2 (SEQ ID NO:)	VH FR3 (SEQ ID NO:)	VH FR4 (SEQ ID NO:)
20502	QLQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSG (SEQ ID NO:13)	WIRQPPGKGLEWIG (SEQ ID NO:14)	RVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYC (SEQ ID NO:15)	WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:16)

³ Каркасні області VH, описані в Таблиці 5, визначені на основі меж системи нумерації за Кабатом для CDR. Відповідно, CDR VH визначаються за Кабатом, а каркасні області являють собою амінокислотні залишки, що оточують CDR у варіабельній області у форматі FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 і FR4.

У деяких варіантах здійснення антитіло або його антигензв'язуючий фрагмент для використання в способах, описаних у цьому документі, специфічно зв'язується з B7-H4 людини і містить каркасні області VL антитіла 20502, перераховані в Таблицях 6.

Таблиця 6

Амінокислотні послідовності VL FR ⁴

Антитіло	VL FR1 (SEQ ID NO:)	VL FR2 (SEQ ID NO:)	VL FR3 (SEQ ID NO:)	VL FR4 (SEQ ID NO:)
20502	EIVMTQSPATLS VSPGERATLSC (SEQ ID NO:17)	WYQQKPGQAPRL LIY (SEQ ID NO:18)	GIPARFSGSGSG TEFTLTISSLQSE DFAVYYC (SEQ ID NO:19)	FGGGTKVEIK (SHQ ID NO:20)

⁴ Каркасні області VL, описані в Таблиці 6, визначені на основі меж системи нумерації за Кабатом для CDR. Відповідно, CDR VL визначаються за Кабатом, а каркасні області являють собою амінокислотні залишки, що оточують CDR у варіабельній області у форматі FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 і FR4.

У деяких варіантах здійснення антитіло або його антигензв'язуючий фрагмент для використання в способах, описаних у цьому документі, специфічно зв'язується з B7-H4 людини і містить чотири каркасні області VH і чотири каркасні області VL антитіла 20502, перераховані в Таблицях 5 та 6.

У деяких варіантах здійснення антитіло або його антигензв'язуючий фрагмент для використання в способах, описаних у цьому документі, специфічно зв'язується з B7-H4 людини і містить послідовність важкого ланцюга антитіла 20502, перераховану в Таблиці 7.

Таблиця 7

Амінокислотні послідовності повнорозмірного важкого ланцюга

Антитіло	Амінокислотна послідовність повнорозмірного важкого ланцюга (SEQ ID NO)
20502	QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSIKSGSYWGWIRQPPG KGLEWIGNIYYSGSTYYNPSLRSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTA ADTAVYYCAREGSYPNQFDPWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLA PSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAV LQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEP KSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHN HYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:21)

У деяких варіантах здійснення антитіло або його антигензв'язуючий фрагмент для використання в способах, описаних у цьому документі, специфічно зв'язується з B7-H4 людини і містить послідовність легкого ланцюга антитіла 20502, перераховану в Таблиці 8.

Таблиця 8:

Амінокислотні послідовності повнорозмірного легкого ланцюга

Антитіло	Амінокислотна послідовність повнорозмірного легкого ланцюга (SEQ ID NO)
20502	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSNLAWYQQKPGQ APRLLIYGASTRATGIPARFSGSGSGTEFTLTISSLQSEDAVYY CQQYHSFPFTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTAS VVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDST YSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:22)

У деяких варіантах здійснення антитіло або антигензв'язуючий фрагмент для використання в способах, описаних у цьому документі, специфічно зв'язується з B7-H4 людини і містить послідовність важкого ланцюга і послідовність легкого ланцюга антитіла 20502, перераховані в Таблицях 7 і 8.

У певних аспектах антитіло або його антигензв'язуючий фрагмент для використання в способах, описаних у цьому документі, описується одним його доменом VL або одним його доменом VH або однією його CDR 3 VL або однією його 3 CDR VH. Див., наприклад, публікацію Rader C et al., (1998) PNAS 95: 8910-8915, яка повністю включена в цей документ шляхом посилання, яка описує гуманізацію мишачого антитіла до $\alpha\beta 3$ шляхом ідентифікації комплементарного легкого ланцюга або важкого ланцюга, відповідно, з бібліотеки легкого ланцюга або важкого ланцюга людини, що призводить до варіантів гуманізованого антитіла, які мають спорідненість вище або ще вище, ніж спорідненість вихідного антитіла. Див. також Clackson T et al., (1991) Nature 352: 624-628, яка повністю включена в цей опис шляхом посилання, і описує способи отримання антитіл, які специфічно зв'язуються з конкретним антигеном, з використанням певного домену VL (або домену VH) і скринінг бібліотеки на додатковий домен VH або домен VL. Скринінг виявив 14 нових партнерів для певного домену VH і 13 нових партнерів для певного домену VL, які були сильними зв'язуючими, як визначено за допомогою ІФА. Див. також Kim SJ & Hong HJ, (2007) J Microbiol 45: 572-577, яка повністю включена в цей документ шляхом посилання і описує способи отримання антитіл, які специфічно зв'язуються зі специфічним антигеном, з використанням специфічного домену VH і скринінгу бібліотеки (наприклад, бібліотеки VL людини) щодо комплементарних доменів VL; вибрані VL домени, в свою чергу, можна використовувати для вибору додаткових комплементарних (наприклад, людини) доменів VH.

У деяких аспектах вказані CDR антитіла або його антигензв'язуючого фрагмента можуть бути визначені відповідно до схеми нумерації за Чотіа, яка стосується місцезонашування структурних петель імунoglobulinу (див., наприклад, 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; і патент США № 7709226). Зазвичай при використанні системи нумерації за Кабатом петля за Чотіа CDR-H1 присутня на амінокислотах важкого ланцюга з 26 по 32, 33 або 34, петля за Чотіа CDR-H2 присутня на амінокислотах важкого ланцюга з 52 по 56, і петля за Чотіа CDR-H3 присутня в амінокислотах важкого ланцюга з 95 по 102, в той час як петля за Чотіа CDR-L1 присутня в амінокислотах легкого ланцюга з 24 по 34, петля за Чотіа CDR-L2 присутня в амінокислотах легкого ланцюга з 50 по 56 і петля за Чотіа CDR-L3 присутня на амінокислотах легкого ланцюга з 89 по 97. Кінець петлі CDR-H1 за Чотіа при нумерації відповідно до системи нумерації за Кабатом варіюється між H32 і H34 залежно від довжини петлі (це пов'язано з тим, що в схемі нумерації за Кабатом в H35A і H35B розміщуються вставки; якщо ані 35A, ані 35B не присутні, петля закінчується на 32, якщо присутній тільки 35A, петля закінчується на 33, якщо присутні обидва 35A і 35B, петля закінчується на 34).

У певних аспектах у цьому документі представлені способи введення антитіл і антигензв'язуючих фрагментів, які специфічно зв'язуються з B7-H4 (наприклад, з B7-H4 людини) і містять за Чотіа CDR VH і VL антитіла 20502, перераховані в Таблицях 3 та 4. У певних варіантах здійснення в цьому документі запропоновані способи введення антитіл і їх антигензв'язуючих фрагментів, які специфічно зв'язуються з B7-H4 (наприклад, з B7-H4 людини)

і містять одну або більше CDR, в яких CDR за Чотіа і Кабатом мають однакову амінокислотну послідовність. У деяких варіантах здійснення в цьому документі представлені способи введення антитіла та їх антигензв'язуючих фрагментів, які специфічно зв'язуються з B7-H4 (наприклад, з B7-H4 людини) і складаються з комбінацій CDR за Кабатом і CDR за Чотіа.

5 У деяких аспектах CDR антитіла або його антигензв'язуючого фрагмента можуть бути визначені відповідно до системи нумерації IMGT, як описано в Lefranc M-P, (1999) *The Immunologist* 7: 132-136 and Lefranc M-P et al., (1999) *Nucleic Acids Res* 27: 209-212. Відповідно до схеми нумерації IMGT, VH-CDR1 знаходиться в положеннях з 26 по 35, VH-CDR2 знаходиться в положеннях з 51 по 57, VH-CDR3 знаходиться в положеннях з 93 по 102, VL-CDR1 знаходиться в положеннях з 27 по 32, VL-CDR2 знаходиться в положеннях з 50 по 52, і 10 VL-CDR3 знаходиться в положеннях з 89 по 97. У конкретному варіанті здійснення в цьому документі представлені способи введення антитіл та їх антигензв'язуючих фрагментів, які специфічно зв'язуються з B7-H4 (наприклад, з B7-H4 людини) і містять за IMGT CDR VH і VL антитіла 20502, перераховані в Таблицях 3 та 4, наприклад, як описано в Lefranc M-P (1999) 15 вище і Lefranc M-P et al., (1999) вище).

У деяких аспектах CDR антитіла або його антигензв'язуючого фрагмента можуть бути визначені відповідно до MacCallum RM et al., (1996) *J Mol Biol* 262: 732-745. Див. також, наприклад, Martin A. "Protein Sequence and Structure Analysis of Antibody Variable Domains," в *Antibody Engineering*, Kontermann and Dübel, eds., Chapter 31, pp. 422-439, Springer-Verlag, Berlin 20 (2001). У конкретному варіанті здійснення в цьому документі представлені способи введення антитіл або їх антигензв'язуючих фрагментів, які специфічно зв'язуються з B7-H4 (наприклад, з B7-H4 людини) і містять CDR VH і VL антитіла 20502, перераховані в Таблицях 3 та 4, як визначено методом у MacCallum RM et al.

У певних аспектах CDR антитіла або його антигензв'язуючого фрагмента можуть бути визначені відповідно до схеми нумерації AbM, яка стосується гіперваріабельних областей AbM, що являють собою компромісний варіант між CDR за Кабатом і структурними петлями за Чотіа, і використовуються в програмному забезпеченні для моделювання антитіл Oxford Molecular's AbM(Oxford Molecular Group, Inc.). У конкретному варіанті здійснення в цьому документі запропоновані способи введення антитіл або антигензв'язуючих фрагментів, які специфічно 30 зв'язуються з B7-H4 (наприклад, з B7-H4 людини) і містять CDR VH і VL антитіла 20502, перераховані в Таблицях 3 та 4, як визначено схемою нумерації за AbM.

У конкретних аспектах у цьому документі представлені способи введення антитіла, які містять важкий ланцюг і легкий ланцюг.

35 Що стосується легкого ланцюга, в конкретному варіанті здійснення легкий ланцюг антитіла, описаного в цьому документі, являє собою легкий каппа-ланцюг. Константна область легкого каппа-ланцюга людини може містити таку амінокислотну послідовність:

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCCLNMFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS
TYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:23).

Константна область легкого каппа-ланцюга людини може кодуватися такою нуклеотидною 40 послідовністю:

CGGACCGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCC GCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGG
AACTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGG
TGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACCTCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACA
GCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTA
45 CGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGA
GTGT (SEQ ID NO:24).

У конкретному варіанті здійснення антитіло, яке імуноспецифічно зв'язується з поліпептидом B7-H4 (наприклад, B7-H4 людини), для використання в способах, описаних у цьому документі, містить легкий ланцюг, в якому амінокислотна послідовність домену VL містить послідовність, 50 викладену в Таблиці 4, де константна область легкого ланцюга містить амінокислотну послідовність константної області легкого каппа-ланцюга людини.

У конкретному варіанті здійснення антитіло, яке імуноспецифічно зв'язується з B7-H4 (наприклад, з B7-H4 людини) для використання в способах, описаних у цьому документі, містить важкий ланцюг, в якому амінокислотна послідовність домену VH містить амінокислотну 55 послідовність, зазначену в Таблиці 3, де константна область важкого ланцюга містить амінокислотну послідовність константної області гамма (γ) важкого ланцюга людини.

Константна область важкого ланцюга IgG1 людини може містити таку амінокислотну послідовність:

60 ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL
SSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDT

LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG
KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN
GQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVSMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
(SEQ ID NO:25).

5 Константна область важкого ланцюга IgG1 людини може кодуватися такою нуклеотидною послідовністю:

GCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGG
GCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGA
ACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTA
10 CTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAAC
GTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAATCTTGTGACAAAA
CTCACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCC
CCCCAAAACCCAGACACCCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGGAC
GTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGCGGTGAGGTGCATAAT
15 GCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGGGTGGTCAAGCGTCTCACC
GTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCC
CAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACAC
CCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTACGCTGACCTGCCTGGTCAAAGG
CTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACCTACAA
20 GACCACGCCTCCCGTGTCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGAC
AAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACC
ACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAA (SEQ ID NO:26).

У конкретному варіанті здійснення антитіло, яке імуноспецифічно зв'язується з B7-H4
(наприклад, B7-H4 людини), для використання в способах, описаних у цьому документі, містить
25 домен VH і домен VL, що містить амінокислотну послідовність будь-якого домену VH і VL,
описаного в цьому документі, і де константні області містять амінокислотні послідовності
константних областей молекули імуноглобуліну IgG (наприклад, IgG людини). В іншому
конкретному варіанті здійснення антитіло, яке імуноспецифічно зв'язується з B7-H4 (наприклад,
B7-H4 людини) для використання у способах, описаних у цьому документі, містять домен VH і
30 домен VL, що містить амінокислотну послідовність будь-якого домену VH і VL, описаного в
цьому документі, і де константні області містять амінокислотні послідовності константних
областей молекули імуноглобуліну IgG1 (наприклад, IgG1 людини).

Повідомлялося, що антитіла зі зниженим вмістом фукози мають підвищену спорідненість до
рецепторів Fc, як-от, наприклад, FcγRIIIA. Відповідно, у деяких варіантах здійснення антитіло
35 або його антигензв'язуючий фрагмент для використання в способах, описаних у цьому
документі, має знижений вміст фукози або не має фукози (тобто є "афукозильованим"). Такі
антитіла або антигензв'язуючі фрагменти можна отримати з використанням методик, відомих
фахівцям в цій області техніки. Наприклад, вони можуть експресуватися в клітинах, дефіцитних
або позбавлених здатності до фукозилування. У конкретному прикладі клітинні лінії з нокаутом
40 обох алелей гена α1,6-фукозилтрансферази (FUT8) можна використовувати для отримання
антитіл або їх антигензв'язуючих фрагментів зі зниженим вмістом фукози. Система Potelligent®
(Lonza) є прикладом такої системи, яку можна використовувати для отримання антитіл і їх
антигензв'язуючих фрагментів зі зниженим вмістом фукози. Альтернативно, антитіла або їх
антигензв'язуючі фрагменти зі зниженим вмістом фукози або без вмісту фукози можуть бути
45 отримані, наприклад: (i) культивуванням клітин в умовах, які запобігають або знижують
фукозилювання; (ii) посттрансляційним видаленням фукози (наприклад, ферментом
фукозидазою); (iii) посттрансляційним додаванням бажаного вуглеводу, наприклад, після
рекомбінантної експресії неглікозильованого глікопротеїну; або (iv) очищенням глікопротеїну
для відбору антитіл або їх антигензв'язуючих фрагментів, які не є фукозильованими. Див.,
50 наприклад, Longmore GD & Schachter H (1982) Carbohydr Res 100: 365-92 and Imai-Nishiya H et
al., (2007) BMC Biotechnol. 7: 84 для способів отримання антитіл без вмісту фукози або зі
зниженим вмістом фукози.

У деяких варіантах здійснення афукозильоване антитіло B7-H4 або його антигензв'язуючий
фрагмент має підвищену активність ADCC in vitro в порівнянні з фукозильованими антитілами
55 B7-H4 або їх антигензв'язуючими фрагментами, що мають таку саму амінокислотну
послідовність. У деяких варіантах здійснення афукозильовані антитіла B7-H4 або їх
антигензв'язуючі фрагменти викликають специфічний лізис, який становить щонайменше 10,
щонайменше 15, щонайменше 20, щонайменше 25, щонайменше 30, щонайменше 35,
щонайменше 40, щонайменше 45, щонайменше 50, щонайменше 60, щонайменше 65,
60 щонайменше 70 або щонайменше 75 відсоткових пунктів, ніж специфічний лізис, викликаний

фукозильованими антитілами B7-H4. Специфічний лізис можна визначити, як описано в Прикладі 2 в цьому документі.

У деяких варіантах здійснення антитіло B7-H4 або його антигензв'язуючий фрагмент має підвищену активність до Fc гамма RIIIA в порівнянні з фукозильованими антитілами B7-H4 або їх антигензв'язуючими фрагментами, що мають таку саму амінокислотну послідовність. У деяких варіантах здійснення афукозильовані антитіла B7-H4 або їх антигензв'язуючі фрагменти зв'язуються з Fc гамма RIIIA щонайменше в 2 рази, щонайменше в 3 рази, щонайменше в 4 рази, щонайменше в 5 разів, щонайменше в 7 разів, щонайменше в 10 разів, щонайменше в 12 разів, щонайменше в разів, щонайменше в 17 разів або щонайменше в разів 15 більшу афінність, ніж фукозильовані антитіла B7-H4 або їх антигензв'язуючі фрагменти. У деяких варіантах здійснення афінність до Fc гамма RIIIA визначають з використанням поверхневого плазмонного резонансу. У деяких варіантах здійснення Fc гамма RIIIA вибраний з Fc гамма RIIIA (V158) і Fc гамма RIIIA (F158). У деяких варіантах здійснення Fc гамма RIIIA являє собою Fc гамма RIIIA (V158).

У деяких варіантах здійснення присутність фукози можна визначити способом, що включає вискоєфективну рідинну хроматографію (ВЕРХ), капілярний електрофорез або мас-спектрометрію MALDI-TOF.

У конкретних варіантах здійснення антитіло або його антигензв'язуючий фрагмент (i) містить послідовності CDR 20502, послідовності VH і VL 20502 або послідовності важкого та легкого ланцюгів 20502 і (ii) є афукозильованим.

У конкретних варіантах здійснення композиція містить антитіло або їх антигензв'язуючі фрагменти, які (i) містять послідовності CDR 20502, послідовності VH і VL 20502 або послідовності важкого і легкого ланцюгів 20502 і (ii) є афукозильованими, наприклад, де щонайменше 95 % антитіл у композиції є афукозильованими або де фукозильовання не виявляється в композиції.

Сконструйовані глікоформи можуть бути корисні для безлічі цілей, включаючи, крім іншого, посилення або зниження ефекторної функції. Способи створення сконструйованих глікоформ у антитілі або його антигензв'язуючому фрагменті, описані в цьому документі, включають, але не обмежуються ними, способи, розкриті, наприклад, у 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; і 7214775; патентних публікаціях США №№ 2007/0248600; 2007/0178551; 2008/0060092; і 2006/0253928; публікаціях міжнародних заявках на патент WO 00/61739; WO 01/292246; WO 02/311140; і WO 02/30954; технології Potelligent™ (Biowa, Inc. Принстон,); і технологія глікозильовання GlycoMAb® (Glycart biotechnology AG, Цюрих, Швейцарія). Див., також, наприклад, Ferrara C et al., (2006) Biotechnol Bioeng 93: 851-861; міжнародні публікації №№ WO 07/039818; WO 12/130831; WO 99/054342; WO 03/011878; і WO 04/065540.

У деяких варіантах здійснення будь-яка з мутацій або модифікацій константної області, описаних у цьому документі, може бути введена в одну або обидві константні області важкого ланцюга антитіла або його антигензв'язуючого фрагмента, описаного в цьому документі, що має дві константні області важкого ланцюга.

В іншому конкретному варіанті здійснення антитіло або його антигензв'язуючий фрагмент, описані в цьому документі, які імуноспецифічно зв'язуються з B7-H4 (наприклад, з B7-H4 людини), містить важкий ланцюг і легкий ланцюг, де (i) важкий ланцюг містить домен VH, що містить амінокислотні послідовності VH CDR1, VL CDR2 і VL CDR3 антитіла 20502, перераховані в Таблиці 1 (SEQ ID NO: 5, 6 і 7 відповідно); (ii) легкий ланцюг містить домен VL, що містить амінокислотні послідовності VL CDR1, VH CDR2 і VH CDR3 антитіла 20502, перераховані в Таблиці 2 (SEQ ID NO: 8, 9 і 10 відповідно); (iii) важкий ланцюг додатково містить константний домен важкого ланцюга, що містить амінокислотну послідовність константного домену важкого ланцюга IgG1 людини; і (iv) легкий ланцюг додатково містить константний домен легкого ланцюга, що містить амінокислотну послідовність константного домену легкого каппа-ланцюга людини.

В іншому конкретному варіанті здійснення антитіло або його антигензв'язуючий фрагмент, описані в цьому документі, які імуноспецифічно зв'язуються з B7-H4 (наприклад, з B7-H4 людини), містить важкий ланцюг і легкий ланцюг, де (i) важкий ланцюг містить домен VH, що містить амінокислотну послідовність домену VH антитіла 20502, перераховану в Таблиці 3 (SEQ ID NO: 11); (ii) легкий ланцюг містить домен VL, що містить амінокислотну послідовність домену VL антитіла 20502, перераховану в Таблиці 4 (SEQ ID NO: 12); (iii) важкий ланцюг додатково

містить константний домен важкого ланцюга, що містить амінокислотну послідовність константного домену важкого ланцюга IgG1 людини; і (iv) легкий ланцюг додатково містить константний домен легкого ланцюга, що містить амінокислотну послідовність константного домену легкого каппа-ланцюга людини.

У конкретних варіантах здійснення антитіло або його антигензв'язуючий фрагмент, описані в цьому документі, які імуноспецифічно зв'язуються з B7-H4 (наприклад, з B7-H4 людини), проявляють активність блокади контрольних точок Т-клітин. У конкретних варіантах здійснення антитіло або його антигензв'язуючий фрагмент, описані в цьому документі, які імуноспецифічно зв'язуються з B7-H4 (наприклад, з B7-H4 людини), збільшує вироблення інтерферону-гамма (IFN γ) в Т-клітинах. У конкретних варіантах здійснення антитіло або його антигензв'язуючий фрагмент, описані в цьому документі, які імуноспецифічно зв'язуються з B7-H4 (наприклад, з B7-H4 людини), збільшує проліферацію Т-клітин. У конкретних варіантах здійснення антитіло або його антигензв'язуючий фрагмент, описані в цьому документі, які імуноспецифічно зв'язуються з B7-H4 (наприклад, з B7-H4 людини), збільшує проліферацію CD4+ Т-клітин. У конкретних варіантах здійснення антитіло або його антигензв'язуючий фрагмент, описані в цьому документі, які імуноспецифічно зв'язуються з B7-H4 (наприклад, з B7-H4 людини), збільшує проліферацію CD8+ Т-клітин.

У конкретних варіантах здійснення антитіло або його антигензв'язуючий фрагмент, описані в цьому документі, які імуноспецифічно зв'язуються з B7-H4 (наприклад, з B7-H4 людини), проявляє антитіло-залежну клітинну цитотоксичність (АЗКЦ). У конкретних варіантах здійснення антитіло або його антигензв'язуючий фрагмент, описані в цьому документі, які імуноспецифічно зв'язуються з B7-H4 (наприклад, з B7-H4 людини), проявляє антитіло-залежну клітинну цитотоксичність (АЗКЦ) у клітинних лініях, що містять щонайменше 300000 B7-H4 молекул на їх клітинній поверхні (наприклад, клітини SK-BR-3). У конкретних варіантах здійснення антитіло або його антигензв'язуючий фрагмент, описані в цьому документі, які імуноспецифічно зв'язуються з B7-H4 (наприклад, з B7-H4 людини), проявляє антитіло-залежну клітинну цитотоксичність (АЗКЦ) у клітинних лініях, що містять щонайменше 100000 B7-H4 молекул на їх клітинній поверхні (наприклад, клітини HCC1569). У конкретних варіантах здійснення антитіло або його антигензв'язуючий фрагмент, описані в цьому документі, які імуноспецифічно зв'язуються з B7-H4 (наприклад, з B7-H4 людини), проявляє антитіло-залежну клітинну цитотоксичність (АЗКЦ) у клітинних лініях, що містять щонайменше 50000 B7-H4 молекул на їх клітинній поверхні (наприклад, клітини ZR-75-1). У конкретних варіантах здійснення антитіло або його антигензв'язуючий фрагмент, описані в цьому документі, які імуноспецифічно зв'язуються з B7-H4 (наприклад, з B7-H4 людини), проявляє антитіло-залежну клітинну цитотоксичність (АЗКЦ) у клітинних лініях, що містять щонайменше 30000 B7-H4 молекул на їх клітинній поверхні (наприклад, клітини MDA-MB-468). У конкретних варіантах здійснення антитіло або його антигензв'язуючий фрагмент, описані в цьому документі, які імуноспецифічно зв'язуються з B7-H4 (наприклад, з B7-H4 людини), проявляє антитіло-залежну клітинну цитотоксичність (АЗКЦ) у клітинних лініях, що містять щонайменше 15000 B7-H4 молекул на їх клітинній поверхні (наприклад, клітини HCC1964).

У конкретному аспекті описаний в цьому документі антигензв'язуючий фрагмент, який імуноспецифічно зв'язується з B7-H4 (наприклад, з B7-H4 людини), вибраний з групи, що складається з Fab, Fab', F(ab')₂ і ScFv, де зазначений Fab, Fab', F(ab')₂ або ScFv містить послідовність варіабельної області важкого ланцюга і послідовність варіабельної області легкого ланцюга антитіла до B7-H4 або його антигензв'язуючого фрагмента, як описано в цьому документі. Fab, Fab', F(ab')₂ або scFv можна отримати будь-яким способом, відомим фахівцям у цій області техніки. У деяких варіантах здійснення зазначений Fab, Fab', F(ab')₂ або ScFv додатково містить фрагмент, який збільшує період напіввиведення антитіла *in vivo*. Зазначений фрагмент також називають "фрагмент, що збільшує період напіввиведення". Може використовуватися будь-який фрагмент, відомий фахівцям у цій області техніки для збільшення періоду напіввиведення Fab, Fab', F(ab')₂ або scFv *in vivo*. Наприклад, фрагмент, що збільшує період напіввиведення, може включати Fc-область, полімер, альбумін або зв'язуючий альбумін білок або сполуку. Зазначений полімер може включати природний або синтетичний, необов'язково заміщений поліалкілен з лінійним або розгалуженим ланцюгом, поліалкенілен, поліоксиполіетиленгліколь, полісахарид, поліетиленгліколь, поліпропіленгліколь, полівініловий спирт, метоксиполіетиленгліколь, лактозу, амілозу, декстран, глікоген або їх похідні. Замісники можуть включати одну або більше гідроксильних, метильних або метоксигруп. У деяких варіантах здійснення зазначений Fab, Fab', F(ab')₂ або ScFv можна модифікувати додаванням однієї або більше С-кінцевих амінокислот для приєднання фрагмента, що збільшує період напіввиведення. У деяких варіантах здійснення зазначений фрагмент, що збільшує період

напіввиведення, являє собою поліетиленгліколь або сироватковий альбумін людини. У деяких варіантах здійснення зазначений Fab, Fab', F(ab')₂ або ScFv злитий з Fc-областю.

4.4 Фармацевтичні композиції

У цьому документі запропоновані способи введення композицій, що містять антитіло до B7-H4 або його антигензв'язуючий фрагмент, що має бажану ступінь чистоти в фізіологічно прийнятному носії, допоміжній речовині або стабілізаторі (Remington's Pharmaceutical Sciences (1990) Mack Publishing Co., Easton, PA). Прийнятні носії, допоміжні речовини або стабілізатори нетоксичні для реципієнтів у використовуваних дозах і концентраціях. Див., наприклад, Gennaro, Remington: The Science and Practice of Pharmacy with Facts and Comparisons: Drugfacts Plus, 20th ed. (2003); Ansel et al., Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, 7th ed., Lippencott Williams and Wilkins (2004); Kibbe et al., Handbook of Pharmaceutical Excipients, 3rd ed., Pharmaceutical Press (2000)). Композиції, які використовуються для введення *in vivo*, можуть бути стерильними. Цю умову легко можна досягти за допомогою фільтрування крізь, наприклад, мембрани для стерильного фільтрування.

У деяких варіантах здійснення запропоновані способи введення фармацевтичної композиції, в яких зазначена фармацевтична композиція містить афукозильовані антитіла до B7-H4 або їх антигензв'язуючі фрагменти, і фармацевтично прийнятний носій. У конкретних варіантах здійснення запропоновані способи введення фармацевтичної композиції, в яких зазначена фармацевтична композиція містить афукозильовані антитіла до B7-H4 або антигензв'язуючі фрагменти, наприклад, в яких щонайменше 80 % зазначених антитіл у зазначеній композиції є афукозильованими. У конкретних варіантах здійснення запропоновані способи введення фармацевтичної композиції, в яких зазначена фармацевтична композиція містить афукозильовані антитіла до B7-H4 або антигензв'язуючі фрагменти, наприклад, в яких щонайменше 85 % зазначених антитіл у зазначеній композиції є афукозильованими. У конкретних варіантах здійснення запропоновані способи введення фармацевтичної композиції, в яких зазначена фармацевтична композиція містить афукозильовані антитіла до B7-H4 або антигензв'язуючі фрагменти, наприклад, в яких щонайменше 90 % зазначених антитіл у зазначеній композиції є афукозильованими. У конкретних варіантах здійснення запропоновані способи введення фармацевтичної композиції, в яких зазначена фармацевтична композиція містить афукозильовані антитіла до B7-H4 або антигензв'язуючі фрагменти, наприклад, в яких щонайменше 95 % зазначених антитіл у зазначеній композиції є афукозильованими. У конкретних варіантах здійснення запропоновані способи введення фармацевтичної композиції, в яких зазначена фармацевтична композиція містить афукозильовані антитіла до B7-H4 або антигензв'язуючі фрагменти, наприклад, в яких щонайменше 96 % зазначених антитіл у зазначеній композиції є афукозильованими. У конкретних варіантах здійснення запропоновані способи введення фармацевтичної композиції, в яких зазначена фармацевтична композиція містить афукозильовані антитіла до B7-H4 або антигензв'язуючі фрагменти, наприклад, в яких щонайменше 97 % зазначених антитіл у зазначеній композиції є афукозильованими. У конкретних варіантах здійснення запропоновані способи введення фармацевтичної композиції, в яких зазначена фармацевтична композиція містить афукозильовані антитіла до B7-H4 або антигензв'язуючі фрагменти, наприклад, в яких щонайменше 98 % зазначених антитіл у зазначеній композиції є афукозильованими. У конкретних варіантах здійснення запропоновані способи введення фармацевтичної композиції, в яких зазначена фармацевтична композиція містить афукозильовані антитіла до B7-H4 або антигензв'язуючі фрагменти, наприклад, в яких щонайменше 99 % зазначених антитіл у зазначеній композиції є афукозильованими. У конкретних варіантах здійснення запропоновані способи введення фармацевтичної композиції, в яких зазначена фармацевтична композиція містить афукозильовані антитіла до B7-H4 або їх антигензв'язуючі фрагменти, наприклад, в яких фукоза є такою, що неможливо визначити в зазначеній композиції.

У деяких варіантах здійснення способи введення фармацевтичної композиції, в яких зазначена фармацевтична композиція містить (i) виділене антитіло або його антигензв'язуючий фрагмент, який специфічно зв'язується з B7-H4 людини, що містить (a) область (CDR), що визначає комплементарність, варіабельної області важкого ланцюга (VH) 1, VH CDR2, VH CDR3 і послідовності варіабельної області легкого ланцюга (VL) CDR1, CDR2 і CDR3 SEQ ID NO: 5-10, відповідно, (b) варіабельну область важкого ланцюга, що містить амінокислотну послідовність, наведену в SEQ ID NO: 11 і варіабельну область легкого ланцюга, що містить амінокислотну послідовність, наведену в SEQ ID NO: 12, або (c) важкий ланцюг, що містить амінокислотну послідовність, наведену в SEQ ID NO: 21, і легкий ланцюг, що містить амінокислотну послідовність, наведену в SEQ ID NO: 22, і (ii) фармацевтично прийнятний наповнювач.

У цьому документі також пропонується спосіб введення фармацевтичної композиції, в якому фармацевтична композиція містить (i) антитіла або їх антигензв'язуючі фрагменти, які специфічно зв'язуються з B7-H4 людини і містять область, що визначає компліментарність (CDR) 1, варіабельної області важкого ланцюга (VH), CDR2 VH, CDR3 VH і CDR1, CDR2 і CDR3 варіабельної області легкого ланцюга (VL) SEQ ID NO: 5-10, відповідно, і (ii) фармацевтично прийнятний наповнювач, причому щонайменше 80 %, щонайменше 85 %, щонайменше 90 %, щонайменше 95 %, щонайменше 96 %, щонайменше 97 %, щонайменше 98 % або щонайменше 99 % антитіл або їх антигензв'язуючих фрагментів у композиції є афукозильованими. В одному варіанті здійснення (i) антитіло або його антигензв'язуючий фрагмент містить варіабельну область важкого ланцюга, що містить амінокислотну послідовність, наведену в SEQ ID NO: 11, і варіабельну область легкого ланцюга, що містить амінокислотну послідовність, наведену в SEQ ID NO: 12, або (ii) антитіло містить важкий ланцюг, що містить амінокислотну послідовність, наведену в SEQ ID NO: 21, і легкий ланцюг, що містить амінокислотну послідовність, наведену в SEQ ID NO: 22.

У цьому документі також пропонується спосіб введення додаткової фармацевтичної композиції на додаток до фармацевтичної композиції, що містить антитіло до B7-H4 або його антигензв'язуючий фрагмент. У таких варіантах здійснення зазначена додаткова фармацевтична композиція містить антагоніст PD-1/PD-L1, як-от пембролізумаб. У таких варіантах здійснення зазначена додаткова фармацевтична композиція, що містить пембролізумаб, надається у вигляді 50 мг ліофілізованого порошку в ампулі з одноразовою дозою для відновлення або у вигляді розчину 100 мг/4 мл (25 мг/мл) в ампулі з одноразовою дозою. У таких варіантах здійснення надана кількість додаткової фармацевтичної композиції для введення 200 мг пембролізумаба вказаному пацієнту при даному введенні. Додаткову фармацевтичну композицію можна вводити одночасно або послідовно з фармацевтичною композицією, що містить антитіло до B7-H4 або його антигензв'язуючий фрагмент.

4.5 Виробництво антитіл і поліпептидів

Антитіла та їх антигензв'язуючі фрагменти, які імуноспецифічно зв'язуються з B7-H4 (наприклад, з B7-H4 людини), можуть бути отримані будь-яким способом, відомим у цій області техніки, для синтезу антитіл і їх антигензв'язуючих фрагментів, наприклад, шляхом хімічного синтезу або методами рекомбінантної експресії. В описаних у цьому документі способах використовують, якщо не вказано інше, звичайні методи молекулярної біології, мікробіології, генетичного аналізу, рекомбінантної ДНК, органічної хімії, біохімії, ПЛР, синтезу і модифікації олігонуклеотидів, гібридизації нуклеїнових кислот і суміжних областей, які відомі фахівцям у цій області техніки. Ці методи описані, наприклад, у посиланнях, цитованих в цьому документі, і повністю пояснені в літературі. Див., наприклад, 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.

У певних аспектах у цьому документі запропоновані способи введення антитіла до B7-H4 або його антигензв'язуючого фрагмента або фармацевтичної композиції, що містить такі антитіла або фрагменти, в яких антитіла або фрагменти отримують шляхом рекомбінантної експресії поліпептида, що містить нуклеотидну послідовність, в клітині-господарі.

У деяких аспектах антитіло до B7-H4 або антигензв'язуючий фрагмент, що вводиться згідно зі способами, запропонованими у цьому документі, включає варіабельну область важкого ланцюга, яка кодується поліпептидом, що містить нуклеотидну послідовність, представлену в Таблиці 9 (тобто SEQ ID NO: 27). У деяких аспектах антитіло до B7-H4 або антигензв'язуючий фрагмент, що вводиться згідно зі способами, запропонованими у цьому документі, включає варіабельну область важкого ланцюга, яка кодується поліпептидом, що містить нуклеотидну послідовність, представлену в Таблиці 9 (тобто SEQ ID NO: 27), і нуклеотидну послідовність, що кодує константну область важкого ланцюга гамма (γ) людини. У деяких аспектах антитіло до B7-H4 або антигензв'язуючий фрагмент, що вводиться згідно зі способами, запропонованими у цьому документі, включає варіабельну область важкого ланцюга, яка кодується поліпептидом, що містить нуклеотидну послідовність, представлену в Таблиці 9 (тобто SEQ ID NO: 27) і константний домен важкого ланцюга, який кодується поліпептидом, що містить нуклеотидну послідовність, наведену в SEQ ID NO: 26.

Таблиця 9

Полінуклеотидні послідовності, що кодують варіабельну область важкого ланцюга

Антитіло	Полінуклеотидна послідовність, що кодує варіабельну область важкого ланцюга (SEQ ID NO)
20502	CAGCTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCAGGACTGGTGAAGCCTTCGG AGACCCTGTCCCTCACCTGCACTGTCTCTGGTGGCTCCATCAAAAGT GGTAGTTACTACTGGGGCTGGATCCGCCAGCCCCCAGGGAAGGGGCT GGAGTGGATTGGGAACATCTATTATAGTGGGAGCACCTACTACAACC CGTCCCTCAGAAGTCGAGTCACCATATCCGTAGACACGTCCAAGAAC CAGTTCTCCCTGAAGCTGAGTTCTGTGACCGCCGCAGACACGGCGGT GTACTACTGCGCCAGAGAAGGATCTTACCCCAATCAGTTTGATCCAT GGGGACAGGGTACATTGGTCACCGTCTCCTCA (SEQ ID NO:27)

У деяких аспектах антитіло до B7-H4 або антигенов'язуючий фрагмент, що вводиться згідно зі способами, запропонованими у цьому документі, включає варіабельну область легкого ланцюга, яка кодується полінуклеотидом, що містить нуклеотидну послідовність, представлену в Таблиці 10 (тобто SEQ ID NO: 28). У деяких аспектах антитіло до B7-H4 або антигензв'язуючий фрагмент, що вводиться згідно зі способами, запропонованими у цьому документі, включає варіабельну область легкого ланцюга, яка кодується полінуклеотидом, що містить нуклеотидну послідовність, представлену в Таблиці 10 (тобто SHQ ID NO: 28), і нуклеотидну послідовність, що кодує константну область легкого ланцюга лямбда людини. У деяких аспектах антитіло до B7-H4 або антигензв'язуючий фрагмент, що вводиться згідно зі способами, запропонованими у цьому документі, включає варіабельну область легкого ланцюга, яка кодується полінуклеотидом, що містить нуклеотидну послідовність, представлену в Таблиці 10 (тобто SEQ ID NO: 28) і константний домен легкого ланцюга, який кодується полінуклеотидом, що містить нуклеотидну послідовність, наведену в SEQ ID NO: 24.

Таблиця 10

Полінуклеотидні послідовності, що кодують варіабельну область легкого ланцюга

Антитіло	Полінуклеотидна послідовність, що кодує варіабельну область легкого ланцюга (SEQ ID NO)
20502	GAAATAGTGATGACGCAGTCTCCAGCCACCCTGTCTGTGTCTCC AGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTT AGCAGCAACTTAGCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTC CCAGGCTCCTCATCTATGGTGCATCCACCAGGGCCACTGGTATC CCAGCCAGGTTCAAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGAGTTCACTC TCACCATCAGCAGCCTGCAGTCTGAAGATTTTGCAGTTTATTAC TGTCAGCAGTACCACTCCTTCCCTTTCACTTTTGGCGGAGGGAC CAAGGTTGAGATCAAA (SEQ ID NO:28)

У деяких аспектах зазначене антитіло до B7-H4 або антигензв'язуючий фрагмент, що вводиться згідно зі способами, запропонованими у цьому документі, включає варіабельну область важкого ланцюга, яка кодується полінуклеотидом, що містить нуклеотидну послідовність, яка кодує варіабельну область важкого ланцюга, представлену в Таблиці 9 (тобто SEQ ID NO: 27) і варіабельну область легкого ланцюга, яка кодується полінуклеотидом,

що містить нуклеотидну послідовність, яка кодує варіабельну область легкого ланцюга, представлена в Таблиці 10 (тобто, SEQ ID NO:28).

У деяких аспектах зазначене антитіло до B7-H4 або антигензв'язуючий фрагмент, що вводиться згідно зі способами, запропонованими у цьому документі, містить (i) важкий ланцюг, що кодується полінуклеотидом, який містить нуклеотидну послідовність, що кодує варіабельну область важкого ланцюга, представлена в Таблиці 9 (тобто SEQ ID NO: 27) і нуклеотидну послідовність, що кодує константну область важкого ланцюга гамма (γ) людини і (ii) легкий ланцюг, що кодується полінуклеотидом, який містить нуклеотидну послідовність, що кодує варіабельну область легкого ланцюга, представлена в Таблиці 10 (тобто, SEQ ID NO: 28) і нуклеотидну послідовність, яка кодує константну область легкого ланцюга лямбда людини.

У деяких аспектах зазначене антитіло до B7-H4 або антигензв'язуючий фрагмент, що вводиться згідно зі способами, запропонованими у цьому документі, містить (i) важкий ланцюг, що кодується полінуклеотидом, який містить нуклеотидну послідовність, що кодує варіабельну область важкого ланцюга, представлена в Таблиці 9 (тобто SEQ ID NO: 27) і нуклеотидну послідовність, що кодує константний домен зазначеного важкого ланцюга. SEQ ID NO: 26, і (ii) легкий ланцюг, що кодується полінуклеотидом, який містить нуклеотидну послідовність, що кодує варіабельну область легкого ланцюга, представлена в Таблиці 10 (тобто, SEQ ID NO: 28) і нуклеотидну послідовність, що кодує константний домен зазначеного легкого ланцюга, SEQ ID NO: 24.

У деяких аспектах зазначене антитіло до B7-H4 або антигензв'язуючі фрагменти, що вводяться згідно зі способами, представленими у цьому документі, кодуються полінуклеотидами, що кодують антитіла до B7-H4 або їх антигензв'язуючі фрагменти або їх домени, які оптимізовані, наприклад шляхом оптимізації кодонів/РНК, заміни гетерологічними сигнальними послідовностями та усуненням елементів нестабільності мРНК. Способи створення оптимізованих нуклеїнових кислот, які кодують антитіло до B7-H4 або його антигензв'язуючий фрагмент або його домен (наприклад, важкий ланцюг, легкий ланцюг, домен VH або домен VL), для рекомбінантної експресії шляхом внесення змін у кодони (наприклад, зміна колону, що кодує ту саму амінокислоту через виродженість генетичного коду) та/або усунення інгубуючої області в мРНК, можуть бути здійснені шляхом адаптації методів оптимізації, описаних, наприклад, у патентах США № 5965726; 6174666; 6291664; 6414132; і 6794498. відповідно.

Полінуклеотиди можуть бути, наприклад, у формі РНК або у формі ДНК. ДНК включає кДНК. геномну ДНК і синтетичну ДНК. ДНК може бути дволанцюговою або одностанцюговою. Якщо ДНК одностанцюгова, вона може бути кодуючим або некодуючим (антисенсовим) ланцюгом. У деяких варіантах здійснення зазначених полінуклео гід являє собою кДНК або ДНК, в якій відсутній один або більше інтронів. У деяких варіантах здійснення полінуклеотид являє собою полінуклеотид, що не зустрічається в природі. У деяких варіантах здійснення полінуклеотид отримують рекомбінантно. У певних варіантах здійснення зазначені полінуклеотиди виділяють. У певних варіантах здійснення зазначені полінуклеотиди є по суті чистими. У певних варіантах здійснення полінуклеотиди виділяють з природних компонентів.

У деяких аспектах вектори (наприклад, вектори експресії) містять нуклеотидні послідовності, що кодують антитіла до B7-H4 та їх антигензв'язуючі фрагменти або їх домени, для рекомбінантної експресії в клітинах-господарях, переважно в клітинах ссавців. У деяких аспектах клітини, наприклад, клітини-господарі, містять такі вектори для рекомбінантної експресії антитіла до B7-H4 або його антигензв'язуючих фрагментів, описаних у цьому документі (наприклад, антитіла людини або гуманізовані антитіла або їх антигензв'язуючі фрагменти). Таким чином, описаний в цьому документі спосіб отримання антитіла або його антигензв'язуючого фрагмента може включати експресію такого антитіла або його антигензв'язуючого фрагмента в клітині-господарі.

Вектор експресії може бути перенесений в клітину (наприклад, клітину-господар) за допомогою звичайних методик, і отримані клітини можуть бути потім культивовані за допомогою звичайних методів для отримання антитіла або його антигензв'язуючого фрагмента, описаного в цьому документі (наприклад, антитіла або його антигензв'язуючого фрагмента, що містить шість CDR, зазначений VH, зазначений VL, зазначений VH і зазначений VL, зазначений важкий ланцюг, зазначений легкий ланцюг, або зазначені важкий і легкий ланцюг 20502) або їх домени (наприклад, зазначений VH, зазначений VL, зазначений VH і зазначений VL, зазначений важкий або зазначений легкий ланцюг 20502).

У деяких варіантах здійснення антитіла до B7-H4 або їх антигензв'язуючі фрагменти (наприклад, антитіло або його антигензв'язуючий фрагмент, що містить CDR 20502), які вводяться згідно зі способами, запропонованими у цьому документі, виробляються в клітинах Potelligent® CHOK1SV.

У деяких варіантах здійснення антитіла до B7-114 або антигензв'язуючі фрагменти (наприклад, антитіло або його антигензв'язуючий фрагмент, що містить CDR 20502), які вводяться згідно зі способами, запропонованими у цьому документі, виробляються в клітині-господарі, в якій відсутній функціональний ген альфа-1,6-фукозилтрансферази (FUT8). У деяких варіантах здійснення зазначена клітина-господар являє собою клітину CHO.

У конкретних варіантах здійснення антитіло або його антигензв'язуючий фрагмент, які вводяться згідно зі способами, запропонованими у цьому документі, виділяють або очищають. Зазвичай, виділене антитіло або його антигензв'язуючий фрагмент являє собою антитіло, яке по суті не містить інших антитіл або їх антигензв'язуючих фрагментів з іншою антигенною специфічністю, ніж виділене антитіло або його антигензв'язуючий фрагмент. Наприклад, у конкретному варіанті здійснення композиція антитіла або його антигензв'язуючого фрагмента, описана в цьому документі, по суті не містить клітинного матеріалу та/або хімічних попередників.

Наступні приклади наведені з метою ілюстрації, а не з метою обмеження.

5. ПРИКЛАДИ

Приклади в цьому Розділі запропоновані в якості ілюстрації, а не з метою обмеження.

5.1 Приклад 1: Оцінка поширеності експресії B7-H4 при декількох показниках

Моноклональне антитіло B7-114 A57.1 миші (номер у каталозі ATCC PTA-5180) використовували для виявлення присутності B7-H4 в архівних зразках, суміші цільних зрізів і мікрочіпах пухлин. Зразки обробляли зазначеним первинним антитілом і детектували за допомогою системи виявлення полімерів, приєднаної до J)ЛВ (Ventana Medical Systems).

B7-114 легко виявляли в мембрані і цитозолі пухлинних тканин, чібраних у річних онкологічних хворих, включаючи інвазивну протокову карциному, потрійний негативний рак молочної залози, рак яєчників, недрібноклітинний рак легені та рак ендометрію. Більше того, частота експресії також була високою при показаннях, перерахованих у Таблиці 11.

Таблиця 11:

Виявлення B7-H4 в пухлинах

Тип пухлини	# Всього	# Позитивний	Відсоток позитивного
Потрійний негативний рак молочної залози	74	58	78 %
Інвазивна протокова карцинома	51	38	74,50 %
Ендометріальна карцинома	77	54	70 %
Рак яєчників	141	85	60 %
Недрібноклітинний рак легені (плоскоклітинний)	47	19	40 %

B7-H4 експресується при інших видах онкологічних захворювань, як-от рак молочної залози, рак нирки (наприклад, нирково-клітинна карцинома), рак сечового міхура (наприклад, уротеліально-клітинна карцинома), рак підшлункової залози і рак щитоподібної залози. Див. наприклад, Zhu, J., et al., Asian Pacific J. Cancer Prev. 14: 301 1-3015 (2011). Krambeck A. et al., PNAS 103: 10391-10396(2006), Fan, M. et al. Int. J. Clin. Exp. Pathol. 7: 6768-6775 (2014), Xu. H., et al. Oncology Letters 11: 1841-1846 (2016) і Liu, W., et al., Oncology Letters 8: 2527-2534 (2014).

5.2 Приклад 2: Афукозильовані та фукозильовані антитіла 20502

Антитіла з Fc областями, що мають знижений вміст фукози в фрагментах гліканів можуть проявляти більш високу АЗКЦ у порівнянні з повністю фукозильованим антитілом (Niwa R et al. Clinical Cancer Research 11(6): 2327-36 (2005)). Антитіла B7-H4 отримували в клітинах CHO-х (Yamane-Ohnuki N. et al. Biotechnology and Bioengineering 87(5): 614-22 (2004)) для отримання нормально фукозильованих антитіл і в клітинній лінії CHO, сконструйованій для отримання афукозильованих антитіл (клітини CHO-y) (id.).

Фукозильовані та афукозильовані антитіла 20502 характеризували поверхневим плазмонним резонансом (SPR). Якщо коротко, антитіла до Fab людини іммобілізували на поверхні SPR чіпа, дериватизованого карбоксильними групами, і антитіла до B7-H4 були захоплені на отриманій поверхні при 5 мкг/мл протягом 30 секунд. B7-H4 IgV-hulglG1 при різних концентраціях (0 нМ, 3,7 нМ, 11,1 нМ, 33,3 нМ, 100 нМ і 300 нМ) потім пропускали через поверхню і залишали для зв'язування з антитілами до B7-H4 під час фази асоціації з подальшим промиванням буфером під час фази дисоціації.

B7-H4 IgV-hulgG1:

MASLGQILFWSIIIIILAGAIALIIIGFGISGRHSITVTTVASAGNIGEDGILSCTFEPDIKLSDIVIQWLK
HGVFGLVIIHFKFGKDHLEQDRMFRGRTAVFADQVIVGNASRLKNVQLTDAGTYKCYIITSKGKGNA
NLHYKTGAFSGSEPKSSDKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDP
5 EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK
AKGQPREPQVYTLPPSRDEETKNQVSETCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGGSF
FLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:29).

Дані аналізували з використанням моделі зв'язування 1:1, і фукозильоване і
афукозильоване 20502 показали схоже зв'язування з білком B7-H4 людини. Таким чином,
10 глікозилювання не впливає на зв'язування.

Афінності зв'язування областей Fc фукозильованого 20502 (Ab-F) і афукозильованого 20502
(Ab-A) з FcγRIIIa (V158) також характеризували поверхневим плазмонним резонансом (SPR).
Якщо коротко, білок A ковалентно приєднували до декстранового чіпу з використанням набору
для сполучення амінів, що містить 100 мМ етилендіаміну в 100 мМ натрій-боратному буфері, pH
15 8,0 в якості блокуючого реагента. Ab-A або Ab-F захоплювали при 2 щільностях на окремих
проточних лунках, і потік дериватизованого білка A служив у якості контролю. Fc гамма RIIIa
(V158) розводили в робочому буфері FIBS-P+ і вводили в 6 концентраціях (0 нМ, 1,37 нМ, 12,3
нМ, 37 нМ, 111 нМ, 333 нМ і 1000 нМ) в двох повторностях. Константу асоціації, константу
дисоціації і афінність зв'язування Ab-A розраховували з використанням моделі зв'язування
20 Biacore T200 Evaluation Software 1:1. Константу афінності для зв'язування Ab-A і Ab-F визначали
з використанням моделі афінності в рівноважному стані Biacore T200 Evaluation Software.
Афукозильоване антитіло B7-H4 мало афінність до Fc-гамма-рецептора IIIA (V158) в 140 разів
вище, ніж таке саме антитіло з фукозильованим Fc (Ab-F) (Таблиця 12).

Таблиця 12

Зв'язування алелю V158 рецептора Fcγ IIIa (FcγRIIIa)

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

Також характеризували активність відносно блокади Т-клітинної контрольної точки
фукозильованими і афукозильованими антитілами 20502. У цих експериментах первинні Т-
клітини людини збагачували з МКПК з використанням набору для збагачення Т-клітин людини
NasySep™ відповідно до інструкцій виробника. Збагачені Т-клітини інкубували при концентрації
30 2×10^5 клітин/мл з анти-CD3/анти-CD28 Dynabeads, при співвідношенні одна намистина на
клітину, при 37 °С. Через шість днів намистини видаляли за допомогою магніту. Т-клітини
промивали і інкубували при концентрації 1×10^6 клітин/мл з 10 од./мл IL-2 при 37 °С. Через
чотири дні Т-клітини промивали та інкубували при концентрації 1×10^6 клітин/мл разом зі
штучними антигенпрезентуючими клітинами (аАРС) при концентрації 2×10^6 клітин/мл при 37 °С
35 при титруванні дози антитіла B7-H4. аАРС обробляли мітоміцином С протягом однієї години при
37 °С, а потім ретельно промивали перед додаванням до спільної культури Т-клітин. Через 72
години після спільного культивування Т-клітин, аАРС і B7-H4 антитіл, планшети
центрифугували і супернатант збирали і оцінювали рівень вироблення IFNγ за допомогою ІФА.
Рівень вироблення IFNγ наносили на графік відносно концентрації антитіла і EC50 активність
40 розраховували з використанням нелінійної моделі побудови кривої (GraphPad Prism).

Антитіла до B7-H4 продемонстрували сильну активність відносно блокади контрольних
точок Т-клітин, що вимірювалося за збільшенням вироблення IFNγ. Більше того, не було
очевидної різниці в ефективності між афукозильованими і фукозильованими антитілами
(Таблиця 13).

Таблиця 13

Ефективність блокади контрольних точок Т-лімфоцитів

Антитіло	BIN	Аналіз аАРС (EC50 +/- СBC; нМ)	
		Афукозильоване	Фукозильоване
20502	3	0,89 +/-0,44	0,74 +/-0,39

У додаткових експериментах АЗКЦ активність фукозильованих і афукозильованих антитіл 20502 також була охарактеризована відносно В7-Н4-експресуючої лінії клітин-мішені. Зокрема, первинні МКПК людини активували цитокином при 1×10^6 клітин/мл з 200 МО/мл IL-2 при 37 °С. Наступного дня клітини промивали і інкубували при співвідношенні ефектор:мішень 40:1 з клітинами-мішенями SK-BR-3, які були помічені кальпеїном-АМ. Через 4 години після інкубації лізис клітин-мішеней визначали кількісно за допомогою флуориметра. Зразок, оброблений Triton/X, служив в якості контрольного зразка для максимального лізису, тоді як зразок, оброблений тільки середовищем, служив в якості контрольного зразка для фонового лізису. Відсоток (%) специфічного лізису розраховували в такий спосіб: $[1 - ((\text{зразок} - \text{контроль середовища}) / (\text{максимальний лізис} - \text{контроль середовища}))] \times 100$. Відсоток (%) специфічного лізису наносили на графік відносно концентрації антитіла і EC50 активності розраховували з використанням нелінійної моделі побудови кривої (GraphPad Prism).

Антитіла до В7-Н4 продемонстрували сильну дозозалежну АЗКЦ активність проти ендогенноекспресуючої В7-Н4 лінії клітин молочної залози SK-BR-3. Більше того, афукозильовані антитіла продемонстрували значно сильнішу АЗКЦ активність в порівнянні з фукозильованими антитілами (Таблиця 14).

Таблиця 14

Активність АЗКЦ

Антитіло	BIN	Аналіз АЗКЦ (EC50 +/- CVC; нМ)	
		Афукозильоване	Фукозильоване
20502	3	0,0007 +/-1,1 x 10E-3	0,0370 +/-6,2E-2

5.3 Приклад 3: Кореляція АЗКЦ активності зі щільністю рецепторів

Щільність В7-Н4 визначали кількісно на клітинній поверхні SK-BR-3, HCC1569, ZR-75-1, MDA-MB-48 і HCC1964 за допомогою FACS згідно зі специфікаціями виробника. Зокрема, 1×10^5 клітин інкубували з 15 мкг/мл антитіла до В7-Н4 на льоду протягом 25 хвилин. Паралельно одну краплю Quantum™ Simply Cellular (QSC) мікросфер (попередньо покритих концентраціями, що збільшу захоплюючих антимишачих антитіл IgG) також інкубували з 15 мкг/мл антитіла до В7-Н4 на льоду протягом 25 хвилин. Після інкубації клітини і мікросфери QSC осаджали і промивали, а зразки збирали на проточному цитометрі. Дані аналізували з використанням програмного забезпечення FlowJo. Розраховували середню інтенсивність флуоресценції (MFI) і вносили її до електронної таблиці QuickCal®. Регресія, що зв'язує значення каналу флуоресценції кожної намистини з наперед заданим значенням здатності зв'язування антитіла (ABC), буде розрахована автоматично. Значення ABC було присвоєно після того, як значення MFI для помічених лунок також були додані в шаблон).

Антитіла до В7-Н4 оцінювали на АЗКЦ активність відносно ліній клітин-мішеней, що експресують В7-Н4, з різними рівнями щільності В7-Н4 на клітинній поверхні. Зокрема, 1×10^4 SK-BR-3, HCC1569, ZR-75-1, MDA-MB-468 або HCC1964 клітини - мішені спільно інкубували з титруванням дози антитіла до В7-Н4 при 4 °С. 25 хвилин потім, один із флаконів з репортерними клітинами Jurkat-huCD16 від Promega відтавали і $7,5 \times 10^4$ клітин додавали до суміші клітини-мішені/антитіла до В7-Н4 і інкубували при 37 °С. Через 24 години зразки нагрівали до кімнатної температури (КТ) і інкубували з буфером Bio-Glo. Субстрат і люмінесценцію визначали кількісно на рідері для мульти-міток EnVision. Дані наносили на графік у вигляді залежності люмінесценції відносно концентрації антитіла і EC50 активності розраховували з використанням нелінійної моделі побудови кривої (GraphPad Prism).

АЗКЦ активність антитіла до В7-Н4 залежала від щільності В7-Н4 на клітинній поверхні: коли кількість молекул на клітинній поверхні зменшувалася, рівень максимальної АЗКЦ активності також зменшувався. Більше того, афукозильовані антитіла продемонстрували поліпшену АЗКЦ активність в порівнянні з фукозильованими антитілами, особливо відносно клітин-мішеней з більш низькими рівнями щільності В7-Н4 на клітинній поверхні (Фіг. 1).

5.4 Приклад 4: Протипухлинна ефективність In vivo в комбінації з антитілом до PD-1

Способи: Восьмитижневі самиці мишей BALB/c були придбані в лабораторіях Чарльз Рівер (Холлістер, Каліфорнія) і були акліматизовані протягом двох тижнів перед початком дослідження. Клітинна лінія 4Т1 карциноми молочної залози миші була сконструйована для експресії химерного білка, що містить позаклітинний домен В7-Н4 миші і трансмембранний домен В7Н3 миші. Пухлинні клітини імплантували ортотопічно в жирову подушку молочної залози мишей в кількості $0,5 \times 10^5$ клітин/50 мкл/миша. Перед введенням клітини культивували до

не більше ніж третього пасажу в середовищі RPMI 1640, доповненому 10 % фетальною бичачою сироваткою (ФБС), інактивованою нагріванням. Клітини вирощували при 37 °С в зволоженій атмосфері з 5 % CO₂. При досягненні 80-85 % злиття клітини збирали і ресуспендували в безсироватковому середовищі RPMI 1640, і вводили в 5 жирову подушку

молочної залози на вентральному боці кожної миші.

Після імплантації клітин мишей перевіряли два рази на тиждень щодо зростання пухлини. Довжину і ширину кожної пухлини вимірювали штангенциркулем, а об'єм розраховували за формулою: Об'єм пухлини (мм³) = (ширина (мм) x довжина (мм) x 2)/2. У день початку введення пухлини були виміряні, викиди були виключені, і мишей випадковим чином розподіляли по групах введення. Для введення антитіла до B7-H4 використовували сурогат миші 20502, названий 20502-msIgG2a-F, який містить варіабельну область 20502, злику з фукозильованим IgG2a, миші. В якості контролю мишам вводили mslgG2a (анти-HEL). 20502-msIgG2a-F або mslgG2a вводили чотири рази за допомогою внутрішньовенної (в/в) ін'єкції два рази на тиждень, починаючи з 11 дня після імплантації клітин. Антитіло до PD-1 (модифікована версія RMP1-14 (Bio X Cell), що містить мовчазний Fc домен mslgG2a) вводили тричі за допомогою внутрішньоочеревинної (в/о) ін'єкції двічі на тиждень, починаючи з 11 дня після імплантації клітин. Пухлини продовжували вимірювати не рідше двох разів на тиждень до тих пір, поки об'єм пухлини не перевищив 10 % маси тіла тварини або близько 2000 мм³.

Результати: Зміна розміру пухлини, зміна середнього об'єму пухлини і відсоток виживаності показані на Фіг. 1A, 1B і 1C відповідно. Введення 20502-msIgG2a-F або антитіла до PD-1 значно знижувало зростання пухлини в порівнянні з контролем mslgG2a (p <0,05). Спільне введення 20502-msIgG2a-F і антитіла до PD-1 значно посилювало інгібування зростання пухлини в порівнянні з будь-якою з монотерапій (p <0,05). Більше того, комбінована терапія призвела до повної регресії пухлини у 5 з 12 мишей. Р-значення були розраховані з використанням однофакторного аналізу ANOVA розрахованих об'ємів пухлин в кожен день дослідження з множинними порівняннями між кожною групою.

У додаткових експериментах 20502-msIgG2a-F продемонструвало дозозалежну протипухлинну активність у вигляді монотерапії в сконструйованій моделі 4T1 при таких низьких дозах, як 1 і 3 мг/кг (Фіг. 2). Комбінація 20502-msIgG2a-F в дозах 0,3 мг/кг, 3 мг/кг або 30 мг/кг з антитілом до PD-1 (5 мг/кг) призвела до синергетичної протипухлинної активності в обох - сконструйованій моделі 4T1 і аналогічним чином сконструйованій моделі B16 (меланома) майже при всіх випробуваних дозах 20502-msIgG2a-F (Фіг. 3). (Антитіло до PD-1 вводили в моделі 4T1 три рази в ті самі дні, що й перші три дози 20502-msIgG2a-F, і в моделі B16 два рази в ті самі дні, що й другу і четверту дози 20502-msIgG2a-F.) Цей синергетичний ефект був особливо несподіваним для дози 0,3 мг/кг, враховуючи, що введення тільки 20502-msIgG2a-F в цій дозі значно не впливало на об'єм пухлини (Фіг. 2). Більше того, ефективність (відсоток виживаності), що спостерігається при дозі 0,3 мг/кг 20502-msIgG2a-F у поєднанні з антитілом до PD1, була несподівано зіставна або навіть перевершувала ефективність, що спостерігається при дозі 3 мг/кг або 30 мг/кг в комбінації з антитілом до PD1. Таким чином, ці результати показують, що антитіла до PD1 синергетично поєднуються з антитілом до B7-H4 в дозах останнього, які є неефективними в якості монотерапії, і це може мати переваги не тільки з точки зору ефективності, але й безпеки.

5.5 Приклад 5: Доклінічна фармакокінетика 15

Фармакокінетику (ФК) і токсикокінетику (ТК) афукозильованого 20502 оцінювали після одноразового та/або повторного щотижневого внутрішньовенного (в/в) введення мишам, щурам і яванським макакам. Спостережувані ФК-характеристики були однаковими в усіх дослідженнях. У всіх видів афуколізоване 20502 продемонструвало лінійну ФК і дозопропорційне збільшення експозиції (площа під кривою концентрація в сироватці-час [AUC]) зі збільшенням дози. Щотижневий вплив збільшився в близько 2 рази (AUC_{0-7 днів}) після 4 щотижневих введень 20502 між першою і останньою дозою; проте стану рівноваги досягти не вдалося. Жодних істотних гендерних відмінностей в профілях концентрації афукозильованого 20502 в сироватці-час виявлено не було. У яванських макак (в двох різних дослідженнях) період напіввиведення, оцінений на тваринах, що видужали, становив від близько 8,8 до близько 12 днів, а рівні доз становили від 1 до 100 мг/кг. Розрахунковий період напіввиведення у щурів після одноразового в/в вливання в дозі 40 мг/кг склав близько 13,2 дня. ФК-характеристики афукозильованого 20502 у тварин підтримують в/в вливання у людей зі схемою введення один раз на 3 тижні (Q3W).

5.6 Приклад 6: Токсикологія

Токсикологічні дослідження афукозильованого 20502 були виконані на щурах і яванських макаках. Дослідження включали пілотне дослідження фармакокінетики (ФК)/переносимості

одноразової дози на щурах, пілотне дослідження токсичності повторних доз на яванських макаках і дослідження токсичності повторних доз нових лікарських препаратів (IND), що забезпечують належну лабораторну практику (НЛП), на щурах і яванських макаках, а також дослідження з НЛП перехресної реактивності тканини з тканинами людини, щура та яванського макака.

У пілотному дослідженні переносимості одноразової дози на щурах тварини отримували дози до 40 мг/кг у вигляді 30-хвилинної внутрішньовенної (в/в) інфузії. Афукозильоване 20502 не впливало на клінічні спостереження, масу тіла, споживання їжі, оцінку клінічної патології (хімічний або гематологічний аналіз сироватки), загальні спостереження, масу органів або гістопатологічну оцінку.

У пілотному токсикологічному дослідженні з повторною дозою яванські макаки отримували 4 щотижневих в/в дози афукозильованого 20502 до 100 мг/кг у вигляді 30-хвилинної в/в інфузії. Усі дози добре переносилися яванськими макаками. Під час оцінки клінічних спостережень, маси тіла, клінічної патології, розкриття, маси органів або параметрів гістопатології не було зареєстровано незапланованої смертності, пов'язаної з досліджуваним лікарським засобом, або змін, пов'язаних із введенням афукозильованого 20502.

У НЛП токсикологічних дослідженнях з повторною дозою афукозильоване 20502 вводили в/в в дозах 1, 10 і 100 мг/кг/доза щурам і яванським макакам протягом 4 щотижневих доз. Оборотної токсичності оцінювали протягом 6-тижневого періоду відновлення після останнього введення. Параметри для оцінки включали офтальмологічні огляди, клінічні спостереження, зміни температури тіла, маси тіла, спостереження за споживанням їжі, гематологією, коагуляцією, клінічною хімією, загальний аналіз сечі, вимірювання маси органів, макроскопічне і мікроскопічне дослідження. У дослідженні на яванських макаках також оцінювалися електрокардіограми (ЕКГ) для оцінки потенційної серцевої токсичності.

Під час оцінки дослідження НЛП на щурах афукозильоване 20502 в цілому добре переносилося, і не було жодних токсичних ефектів, приписуваних афукозильованому 20502. Рівень відсутності спостережуваних побічних ефектів (NOAEL) у щурів Sprague Dawley вважався рівним 100 мг/кг/дозу.

У дослідженні НЛП на яванських макаках афукозильоване 20502 в цілому добре переносилося, і жодних небажаних явищ (НЯ), пов'язаних із афукозильованим 20502, не спостерігалось за жодним із оцінюваних параметрів. Під час дослідження більш висока частота діареї спостерігалася в кінці фази дозування в групах із більш високими дозами. Через більш високої частоти уражених тварин в середній і високій дозі, а також через початок на більш пізній стадії періоду дозування, можливий зв'язок із впливом афукозильованого 20502. Не було жодних мікроскопічних змін у кишковому тракті у тварин, які отримували афукозильоване 20502, включаючи тварин із діареєю; таким чином, це спостереження було визнано не небажаним явищем, але, можливо, пов'язаним із досліджуваним лікарським засобом. У дослідженні був зареєстрований одиничний смертельний результат. Одну тварину в групі відновлення середньої дози було виявлено мертвою на 35 день дослідження, через 14 днів після останньої дози. Клінічні спостереження, макроскопічна і мікроскопічна оцінка відповідали діагнозу заворот кишечника. Заворот кишечника іноді виникає у яванських макак, і це вважалось спонтанним захворюванням у цієї тварини, і не пов'язаним із досліджуваним лікарським засобом. NOAEL у яванських макак становив 100 мг/кг/дозу.

На додаток до токсикологічних досліджень *in vivo* було проведено дослідження перехресної реактивності НЛП-сумісних тканин для порівняння зв'язування афукозильованого 20502 з панеллю з 36 тканин щура, яванського макака і людини. Результати показали, що характер зв'язування афукозильованого 20502 був подібним серед 3 видів і обмежувався епітелієм молочної залози.

Таким чином, афукозильоване 20502 добре переносилося яванським макаком і щуром. NOAEL у обох видів був визнаний рівним 100 мг/кг/дозу, це найвища доза, яку випробували в 4 щотижневих в/в дозах.

5.7 Приклад 7: Фаза 1a збільшення дози/вступна фаза для оцінки безпеки і Фаза 1b збільшення дози афукозильованого 20502 в комбінації з пембролізумабом

Для зручності афукозильоване 20502 в цьому Прикладі позначено як А-20502.

Назва: Фаза 1a/1b дослідження антитіла до B7-H4 в комбінації з пембролізумабом (антитілом до PD1) у пацієнтів із солідними пухлинами на пізній стадії.

Фаза 1а цілі і кінцеві критерії оцінки:

ЦІЛІ	КІНЦЕВІ КРИТЕРІЇ ОЦІНКИ
ПЕРВИННА	
Безпека	

ЦІЛІ	КІНЦЕВІ КРИТЕРІЇ ОЦІНКИ
A-20502 в комбінації з пембролізумабом	A-20502 в комбінації з пембролізумабом
- Оцінити безпеку і переносимість A-20502 в комбінації з пембролізумабом у пацієнтів із солідними пухлинами на нічній стадії.	- Частота виникнення НЯ, відхилень від норми в результатах клініко-лабораторних аналізів, а також відхилень від норми на електрокардіограмі (ЕКГ).
- Визначити максимально переносиму дозу (МПД) і/або рекомендовану дозу (РД) A-20502 в комбінації з пембролізумабом у пацієнтів із солідними пухлинами на пізній стадії.	- Частота НЯ 3 і 4 ступеню і відхилень від норми в результатах клініко-лабораторних аналізів, які визначаються як DLT (токсичність, що обмежує дозу, ОДТ)
ВТОРИННА	
Фармакокінетика	
A-20502 в комбінації з пембролізумабом	A-20502 в комбінації з пембролізумабом
- Охарактеризувати ФК профіль A-20502 в комбінації з пембролізумабом у пацієнтів із солідними пухлинами на пізній стадії.	Наступні параметри ФК будуть отримані з даних концентрація-час для A-20502 в комбінації з пембролізумабом, коли це необхідно і може бути застосовано: - AUC (площа під кривою залежності концентрації лікарського засобу в сироватці-час) - C _{max} (максимальна концентрація лікарського засобу в сироватці) - C _{залишкова} (залишкова концентрація лікарського засобу в сироватці в кінці інтервалу дози) - CL (Кліренс)

ЦІЛІ	КІНЦЕВІ КРИТЕРІЇ ОЦІНКИ
	- t _{1/2} (період напіввиведення) - V _{ss} (обсяг розподілу в стійкому стані) - Інші параметри, як-от пропорційність дози, коефіцієнт накопичення, досягнення рівноважного стану, також будуть розраховані для A-20502 за наявності даних. - За наявності даних можна розрахувати співвідношення C _{max} і C _{залишкова} для пембролізумаба.
Імуногенність	
A-20502 в комбінації з пембролізумабом	A-20502 в комбінації з пембролізумабом
- Охарактеризувати імуногенність A-20502 в комбінації з пембролізумабом у пацієнтів із солідними пухлинами на пізній стадії.	- Імунна відповідь (ADA) на A-20502 - Імунна відповідь (ADA) на пембролізумаб
ПОШУКОВА	
Ефективність	
A-20502 в комбінації з пембролізумабом	A-20502 в комбінації з пембролізумабом

Оцінити клінічну користь А-20502 в поєднанні з пембролізумабом.	- Частота об'єктивної відповіді (ЧОВ) визначається як загальна кількість пацієнтів із підтвердженою відповіддю як ПВ, так і ЧВ, згідно RECIST v1.1. поділена на загальну кількість пацієнтів, у яких можна оцінити відповідь.
	- Тривалість відповіді (DOR), що визначається як час від початку відповіді (ПВ або ЧВ), який згодом підтверджується, до першого

ЦІЛІ	КІНЦЕВІ КРИТЕРІЇ ОЦІНКИ
	спостереження прогресуючого захворювання або смерті з будь-якої причини.
	- Виживаність без прогресування (ВБП), що визначається як час від першої дози пацієнта до першого спостереження прогресуючого захворювання або смерті з будь-якої причини
Фармакодинамічні маркери	
А-20502 в комбінації з пембролізумабом	А-20502 в комбінації з пембролізумабом
- Охарактеризувати фармакодинамічний профіль А-20502 в комбінації з пембролізумабом за допомогою аналізу інфільтрату імунних клітин при біопсіях пухлини до лікування і під час лікування.	- Зміни маркерів імунного інфільтрату пухлин (наприклад, можуть включати природні клітини-кілери (NK), CD4, CD8 і/або інші обрані імунні біомаркери) за даними ІГХ і/або аналізу РНК у пацієнтів, які отримували А-20502 в поєднанні з пембролізумабом.
- Охарактеризувати фармакодинамічний профіль А-20502 в комбінації з пембролізумабом за допомогою оцінки дослідницьких біомаркерів у зразках периферичної крові.	- Зміни рівнів цитокінів (наприклад, можуть включати IL-2, 1L-6, IL-10, INF, IFN γ), визначені за допомогою мультиплексного аналізу, у пацієнтів, які отримували А-20502 у поєднанні з пембролізумабом.
	- Зміни окремих додаткових фармакодинамічних маркерів периферичної крові у пацієнтів, які отримували А-20502 в комбінації з пембролізумабом.

Фаза 1в цілі і кінцеві критерії оцінки:

ЦІЛІ	КІНЦЕВІ КРИТЕРІЇ ОЦІНКИ
ПЕРВИННА	
Безпека	
А-20502 в комбінації з пембролізумабом	А-20502 в комбінації з пембролізумабом
- Оцінити безпеку і переносимість А-20502 в комбінації з пембролізумабом у вибраних пацієнтів із солідними пухлинами В7-Н4+ на пізній стадії, які отримували лікування при МПД і/або РД	- Частота виникнення НЯ, відхилень від норми в результатах клініко-лабораторних аналізів, а також відхилень від норми на електрокардіограмі ЕКГ у пацієнтів, які отримували А-20502 в комбінації з пембролізумабом.

ВТОРИННА	
Ефективність	
A-20502 в комбінації з пембrolізумабом	A-20502 в комбінації з пембrolізумабом
- Оцінити клінічну користь A-20502 в комбінації з пембrolізумабом у вибраних пацієнтів із солідними пухлинами B7-H4+ на пізній стадії, які отримували лікування при МПД і/або РД	- ЧОВ визначається як загальна кількість пацієнтів із підтвердженою відповіддю як ПВ, так і ЧВ, згідно RECIST v1.1, поділена на загальну кількість пацієнтів, у яких можна оцінити відповідь на A-20502 в комбінації з пембrolізумабом.
	- DOR визначається як час від початку відповіді (ПВ або ЧВ), яка згодом підтверджується, до першого спостереження прогресуючого захворювання або смерті з будь-якої причини через введення A-20502 в комбінації з пембrolізумабом.
	- ВБП визначається як час від першої дози пацієнта до першого

ЦІЛІ	КІНЦЕВІ КРИТЕРІЇ ОЦІНКИ
	спостереження прогресуючого захворювання або смерті з будь-якої причини через введення А-20502 в комбінації з пембrolізумабом.
Фармакокінетика	
А-20502 в комбінації з пембrolізумабом	А-20502 в комбінації з пембrolізумабом
- Оцінити профіль ФК А-20502 в комбінації з пембrolізумабом у пацієнтів із солідними пухлинами В7-Н4+ на пізній стадії, які отримували лікування при МПД і/або РД	- Наступні параметри ФК будуть отримані з даних концентрація-час для А-20502 в комбінації з пембrolізумабом, коли це необхідно і може бути застосовано: - AUC - C _{max} - C _{залишкова} - CL - t _{1/2} - V _{ss} - Інші параметри, як-от коефіцієнт накопичення, досягнення рівноважного стану, також будуть розраховані за наявності пацієнтів, які отримували лікування А-20502 в комбінації з пембrolізумабом. - C _{max} і C _{залишкова} , а також співвідношення накопичення C _{max} і C _{залишкової} для пембrolізумаба можуть бути розраховані за наявності даних.
- Охарактеризувати ФК профіль пембrolізумаба в комбінації з А-20502 у пацієнтів із солідними пухлинами на пізній стадії.	
Імуногенність	

ЦІЛІ	КІНЦЕВІ КРИТЕРІЇ ОЦІНКИ
A-20502 в комбінації з пембrolізумабом	A-20502 в комбінації з пембrolізумабом
- Охарактеризувати імуногенність A-20502 в комбінації з пембrolізумабом у вибраних пацієнтів із солідними пухлинами B7-H4+ на пізній стадії, які отримували лікування при МПД і/або РД	- Імунна відповідь (ADA) на A-20502
- Охарактеризувати імуногенність пембrolізумаба в комбінації з A-20502 у пацієнтів із солідними пухлинами B7-H4+ на пізній стадії, які отримували лікування при МПД і/або РД	- Імунна відповідь (ADA) на пембrolізумаб

ПОШУКОВА	
Фармакодинамічні маркери	
A-20502 в комбінації з пембролізумабом	A-20502 в комбінації з пембролізумабом
- Охарактеризувати фармакодинамічний профіль A-20502 в комбінації з пембролізумабом за допомогою аналізу інфільтрату імунних клітин при біопсіях пухлини до лікування і під час лікування.	- Зміни маркерів імунного інфільтрату пухлин (наприклад, можуть включати природні клітини-кілери (NK), CD4, CD8 і/або інші обрані імунні біомаркери) за даними ІГХ і/або аналізу РНК у пацієнтів. Які отримували A-20502 в комбінації з пембролізумабом
- Охарактеризувати фармакодинамічний профіль FP150 в комбінації з пембролізумабом за допомогою оцінки дослідницьких біомаркерів у зразках периферичної крові.	- Зміни рівнів цитокінів (наприклад, можуть включати IL-2, IL-6, IL-10, TNF, IFN γ), визначені за допомогою мультиплексного аналізу, у пацієнтів, які отримували A-20502 в комбінації з пембролізумабом
ЦІЛІ	КІНЦЕВІ КРИТЕРІЇ ОЦІНКИ
	пембролізумабом - Зміни окремих додаткових фармакодинамічних біомаркерів у зразках периферичної крові пацієнтів, які отримували A-20502 в комбінації з пембролізумабом
Ефективність	
A-20502 в комбінації з пембролізумабом	A-20502 в комбінації з пембролізумабом
- Оцінити клінічну користь A-20502 в комбінації з пембролізумабом у вибраних пацієнтів із солідними пухлинами B7-H4+ на пізній стадії, які отримували лікування при МПД і/або РД	- Загальна виживаність (ЗВ), яка визначається як час від першої дози пацієнта до смерті за будь-якої причини для пацієнтів, які отримували A-20502 в комбінації з пембролізумабом

У деяких варіантах здійснення пембролізумаб для ін'єкцій поставляється у вигляді стерильного ліофілізованого порошку, що не містить консервантів, від білого до жовтуватого кольору у флаконах для одноразової дози. Кожен флакон можна відновити і розвести для внутрішньовенної інфузії. Кожні 2 мл такого відновленого розчину містять 50 мг пембролізумаба і включають L-гістидин (3,1 мг), полісорбат 80 (0,4 мг) і сахарозу (140 мг). Може містити хлороводневу кислоту/гідроксид натрію для доведення рН до 5,5. Ліофілізований порошок відновлювали шляхом додавання 2,3 мл стерильної води для ін'єкцій, USP, шляхом уприскування води уздовж стінок флакона, а не безпосередньо на ліофілізований порошок (кінцева концентрація 25 мг/мл). Флакон повільно перемішували (без струшування) і чекали до 5 хвилин, щоб бульбашки зникли.

В інших варіантах здійснення пембролізумаб доступний для ін'єкцій у вигляді розчину 100 мг/4 мл (25 мг/мл) у флаконі для одноразового використання. Ін'єкція являє собою стерильний прозорий або злегка опалесцентний розчин, який не містить консервантів, від безбарвного до злегка жовтуватого кольору, який потребує розведення для внутрішньовенної інфузії. Кожен флакон містить 100 мг пембролізумаба в 4 мл розчину. Кожен 1 мл розчину містить 25 мг пембролізумаба і складений в: L-гістидин (1,55 мг), полісорбат 80 (0,2 мг), сахарозу (70 мг) і воду для ін'єкцій, USP.

Дизайн дослідження: Це Фаза 1a/1b відкритого, багатоцентрового дослідження з метою оцінки дозування, безпеки, переносимості, фармакокінетики (ФК), фармакодинаміки і попередньої ефективності A-20502 в комбінації з пембролізумабом у солідних пухлинах на пізній стадії.

Це дослідження включає в себе стадію підвищення дози/вступну фазу для оцінки безпеки в Фазі 1a (Фаза 1a підвищення дози) і стадію застосування раніше встановленої максимальної переносимої дози в розширеній популяції в Фазі 1b (Фаза 1b застосування раніше встановленої максимальної переносимої дози в розширеній популяції) для A-20502 в комбінації з пембролізумабом.

Архівна пухлинна тканина (або свіжа біопсія, отримана, якщо архівна тканину недоступна) може бути попередньо перевірена на рівні експресії B7-H4 (трансмембранний білок сімейства B7, також відомий як B7S1, B7x або VTCN1) за допомогою імуногістохімії (ІГХ) в центральній

лабораторії для пацієнтів у фазі 1a визначення дози та фазі 1b застосування раніше встановленої максимальної переносимої дози в розширеній популяції і для аналізу біомаркерів.

У деяких варіантах здійснення архівні пухлинні тканини і/або свіжі біопсії надаються наступним чином:

5 Фаза 1a підвищення дози:

- Надання архівної пухлинної тканини (або свіжої біопсії, отриманої, якщо архівна тканину недоступна) для ретроспективного аналізу біомаркерів для пацієнтів.

Фаза 1a визначення дози:

10 - Архівна пухлинна тканина для оцінки рівнів експресії B7-H4 за допомогою випробувань ІГХ, проведених у центральній лабораторії для попереднього відбору та аналізу біомаркерів; свіжа тканина біопсії буде використовуватися для цього тесту, якщо архівна тканина недоступна.

- Свіжі біопсії будуть використовуватися під час скринінгу і після лікування.

Фаза 1b застосування раніше встановленої максимальної переносимої дози в розширеній популяції:

15 - Архівна пухлинна тканина для оцінки рівня експресії B7-H4 за допомогою випробувань ІГХ, проведених у центральній лабораторії для попереднього відбору та аналізу біомаркерів; свіжу тканину біопсії використовували для цього тесту, якщо архівна тканина недоступна.

20 - Свіжі біопсії будуть використовуватися для підгрупи пацієнтів (наприклад, не менше 10 пацієнтів на групу з 30 пацієнтів) під час скринінгу і після лікування для розширеного фармакодинамічного аналізу.

Додаткові відомості наведені нижче по кожній фазі дослідження в розділах "Фаза 1a підвищення дози" і "Фаза 1b застосування раніше встановленої максимальної переносимої дози в розширеній популяції" цього короткого опису.

25 Фаза 1a вступна фаза для оцінки безпеки (A-20502 в комбінації з пембролізумабом): Щонайменше 3 пацієнта будуть включені при максимальній переносимій дозі (МПД) і/або рекомендованій дозі (РД) A-20502 в якості монотерапії в комбінації з 200 мг пембролізумаба Q3W і оцінені щодо токсичності, 10 яка обмежує дозу (ОДТ). Додаткові пацієнти, в цілому до пацієнтів, можуть проходити курс лікування з РД A-20502 і пембролізумаба. За необхідності доза A-20502 може бути зменшена відповідно до алгоритму зменшення дози, описаному нижче.

30 Пропоновані рівні доз:

- 1aC1: A-20502 (РД) + пембролізумаб 200 мг в/в Q3W

- 1aC2: A-20502 (10 мг/кг) + пембролізумаб 200 мг в/в Q3W

- 1aC3: A-20502 (3 мг/кг) + пембролізумаб 200 мг в/в Q3W

Скорочення: в/в = внутрішньовенно; Q3W = один раз на 3 тижні; РД = рекомендована доза.

35 У деяких варіантах здійснення зазначена РД складає 20 мг/кг. У дослідженні монотерапії фази 1a/1b у пацієнтів із солідними пухлинами на пізній стадії A-20502 добре переносився в дозах до 20 мг/кг без токсичності, що обмежує дозу. На підставі фармакокінетичних досліджень пацієнтів у цьому дослідженні монотерапії фази 1a/1b прогнозується, що спостережувана мінімальна концентрація A-20502 при РД 20 мг/кг досягне $\geq 95\%$ насичення рецепторів як для 40 B7-H4, так і для FcγIIIa на основі афінностей. A-20502 досягало дозозалежного впливу при дозах $\geq 0,3$ мг/кг і мало період напіввиведення 1-2 тижні. Концентрація A-20502 в сироватці при дозі 20 мг/кг була однаковою в часі для різних типів пухлин (грудей, яєчників і ендометрію) і з пембролізумабом або без нього.

45 У комбінованому дослідженні можуть використовуватися інші рівні доз (наприклад, 0,1, 0,3, 1 або 20 мг/кг), наприклад, на основі безпеки, переносимості, об'єктивної відповіді, ФК і фармакодинаміки, а також оцінок ефективних дій, екстрапольованих із доклінічних даних. Наприклад, можна використовувати більш низькі або проміжні рівні доз A-20502 на підставі даних про безпеку. Критерії ОДТ для комбінації A-20502 і пембролізумаба будуть такими:

50 ОДТ під час фази 1a підвищення дози визначається як будь-яка з наступних подій, незалежно від їх походження (за винятком подій, явно викликаних основним захворюванням або сторонніми причинами):

- Будь-яка негематологічна токсичність 3 ступеню або вище (за винятком нудоти, блювоти і діареї 3 ступеню), що виникає протягом 21 дня лікування.

55 - Нудота, блювота, діарея 3 ступеню, що тривають > 72 годин, незважаючи на оптимальну підтримувальну терапію, що виникають протягом перших 21 дня лікування.

- Фебрильна нейтропенія та/або задокументована інфекція з абсолютним числом нейтрофілів (АЧН) $< 1,0 \times 10^9$ на л, нейтропенія 4 ступеню, що триває більше 7 днів, тромбоцитопенія 4 ступеню ($< 25,0 \times 10^9$ на л) або тромбоцитопенія 3 ступеню ($< 50,0 - 25,0 \times 10^9$ на л) з кровотечею протягом перших 21 дня лікування.

- Аспартатамінотрансфераза/аланінтрансаміназа (АСТ/АЛТ) > 3 × верхня межа норми (ВМН) і одночасно загальний білірубін > 2 × ВМН, не пов'язаний із залученням печінки в онкологічне захворювання.

- Будь-який лабораторний показник 4 ступеню незалежно від клінічних наслідків.

5 - Інші лабораторні показники 3 ступеню, що не мають клінічного значення згідно з угодою дослідника та спонсора, які не зникають протягом 72 годин.

Особливі рекомендації щодо ОДТ для комбінації А-20502 і пембролізумаба

10 - Оскільки пембролізумаб є відомим інгібітором імунних контрольних точок і одним із ймовірних механізмів дії А-20502 є блокада імунних контрольних точок, при використанні цієї комбінації очікуються імунні небажані явища (ІНЯ). ІНЯ визначається як клінічно значуще НЯ, яке пов'язане з впливом досліджуваного лікарського засобу, неясної етіології і відповідає імуніопосередкованому механізму. Виходячи з цього, перша поява наступних ІНЯ не вважатиметься ОДТ, тому що вони очікуються при імунотерапії:

15 - Загострення пухлини 3 ступеню (визначається як місцевий біль, подразнення або висип, локалізовані на ділянках відомої або ймовірної пухлини).

- Висип 3 ступеню.

- Імунне небажане явище 3 ступеню (ІНЯ), яке вирішилося до 1 ступеню або менше протягом 14 днів.

20 - Минуще (яке вирішується протягом 6 годин від початку) НЯ 3 ступеню, пов'язане з інфузією.

Повторна поява цих подій (за винятком загострення пухлини 3 ступеню) у одного і того самого або в іншого пацієнта буде вважатися ОДТ.

25 Інтервал оцінки ОДТ починається в перший день лікування після початку інфузії і триває протягом 21 дня. Алгоритм, описаний в таблиці нижче, застосовуватиметься для прийняття рішення про дозування. Доза А-20502 може бути знижена у міру необхідності в відповідь на ОДТ. МПД і/або РД А-20502 в комбінації з пембролізумабом будуть дозою, при якій ≤ 1/3-6 пацієнтів стикаються з ОДТ.

Алгоритм прийняття рішень про зниження дози для вступної фази для оцінки безпеки А-20502 в комбінації з пембролізумабом у фазі 1a:

Кількість пацієнтів із ОДТ при заданому рівні дози	Правило прийняття рішення про дозування
0/3	Продовжіть реєстрацію до 10 пацієнтів на цьому рівні дози для додаткової оцінки безпеки
1/3	Включіть 3 додаткових пацієнта з поточним рівнем дози (поточна когорта)
≥ 2/3	Припиніть реєстрацію в поточній когорті й знизьте дозу А-20502 на один рівень нижче поточної дози
1/6	Продовжіть реєстрацію до 10 пацієнтів на цьому рівні дози.
≥ 2/6	Припиніть реєстрацію в поточній когорті й знизьте дозу А-20502 на один рівень нижче поточної дози

30 Фаза 1b розширення когорти комбінації:

Фаза 1b може складатися з когорт, проспективно ідентифікованих як такі, що мають експресію В7-Н4 за допомогою ІГХ. У деяких варіантах здійснення буде дві когорти А-20502 в комбінації з пембролізумабом у наступних вибраних типах пухлин:

- Когорта 1bC1: TNBC (А-20502 в комбінації з пембролізумабом)

35 - Когорта 1bC2: Рак яєчників (А-20502 в комбінації з пембролізумабом)

В іншому варіанті здійснення комбінація фази 1b має одну вихідну когорт, і інші когорти, як-от TNBC, можуть бути згодом включені в дослідження фази 1b:

- Когорта 1bC1 : рак яєчників (А-20502 в комбінації з пембролізумабом)

У деяких варіантах здійснення може бути додано до 3 додаткові когорти комбінації.

40 На підставі доступних клінічних та трансляційних даних з дослідження, що з'являються, когорти для додаткових типів пухлин, які підлягають лікуванню за допомогою А-20502 в комбінації з пембролізумабом, можуть бути відкриті під час дослідження (наприклад, 30 пацієнтів або менше в будь-якій окремій когорті).

45 Дозування. У певних варіантах здійснення А-20502 буде вводиться у вигляді єдиного агента у вигляді 60-хвилинної (± 5 хвилин) в/в інфузії Q3W в 1 день кожного 21-денного циклу. Доза А-20502 буде залежати від маси тіла в 1 день 1 циклу (C1D1). Після 1 циклу доза А-20502 буде

перераховуватися при кожному відвідуванні для інфузії, тільки якщо маса пацієнта змінилася на > 10 % у порівнянні з 1 циклом 1 дня.

Пембролізумаб буде вводиться після завершення інфузії A-20502 в дозі 200 мг шляхом внутрішньовенної інфузії протягом 30 хвилин ($\pm$ 5 хвилин), починаючи з 1 циклу 1 дня і повторюючи Q3W в 1 день кожного 21-денного циклу.

Не існує заздалегідь визначеної максимальної кількості доз A-20502 в комбінації з пембролізумабом. Пацієнти можуть продовжувати отримувати обидва лікарські засоби в комбінації згідно з їх когортою/дозою, зазначеною в дослідженні, до тих пір, поки дослідник не оцінить прогресування захворювання або поки пацієнт не відповідатиме будь-якому з інших критеріїв скасування, визначених протоколом. Якщо пацієнт припиняє прийом одного з двох лікарських засобів, він може продовжувати приймати тільки інші ліки.

Лікування після прогресування захворювання може бути дозволено пацієнтам із прогресуючим захворюванням відповідно до критеріїв оцінки відповіді на солідні пухлини версії 1.1 (RECIST v1.1), якщо оцінка користі/ризиків сприяє продовженню призначення досліджуваного лікування (наприклад, якщо пацієнти продовжують відчувати клінічні прояви користі за оцінкою дослідника і переносимість лікування).

Тривалість лікування: Тривалість дослідження для окремого пацієнта включає скринінг (до 28 днів), лікування та період подальшого спостереження в кінці лікування (КЛ), який буде включати відвідування через близько 28 ($\pm$ 7) днів і 100 ($\pm$ 7) днів після останньої дози. Оскільки всі пацієнти мають право на лікування до прогресування захворювання, фактична тривалість лікування для кожного окремого пацієнта варіюватиметься в залежності від очікуваного часу до прогресування для відповідного типу пухлини.

Крім того, пацієнти, включені в Фазу 1b збільшення дози, відслідковуватимуться щодо виживаності (LTFU, включаючи сканування та статус виживаності Q12W) протягом до 2 років.

Кількість пацієнтів. Кількість пацієнтів, запланованих для цього дослідження, оцінюється в такий спосіб, але ця кількість може бути скоригована за необхідності.

У Фазу 1a можуть бути включені від 6 до 22 пацієнтів або від 10 до 22 пацієнтів, які отримають A-20502 в комбінації з пембролізумабом у рамках вступної фази для оцінки безпеки. Одна або дві додаткові когорти, що оцінюють A-20502 в комбінації з пембролізумабом, будуть включені, наприклад, з 30 пацієнтами або менше.

Критерії включення:

Критерії включення: Фаза 1a критерії включення

Критерії включення пацієнтів у фазу 1a такі:

1) Гістологічно підтверджені солідні пухлини, за винятком пухлин первинної центральної нервової системи (ЦНС).

2) Неоперабельне, місцевопоширене або метастатичне захворювання.

3) Здатність розуміти і підписувати форму інформованої згоди (ФІС), схвалену інституціональною контрольною радою/незалежним етичним комітетом (IRB/IEC), до проведення будь-якої оцінки конкретного дослідження.

4) Пацієнти повинні бути несприйнятливими або такими, що не можуть переносити існуючу терапію(і), яка, як відомо, приносить клінічну користь для їх стану.

5) Усі пацієнти повинні мати принаймні одне ураження, яке піддається вимірюванню, на вихідному рівні відповідно до RECIST v1.1; ділянки пухлини, розташовані в раніше опромінєній області або в області, підданій іншій локорегіональній терапії, не зважаються вимірюваними, якщо було продемонстровано прогресування ураження.

6) Адекватна стадія вимивання для попередньої протиракової терапії (тобто $\geq$ 5 періодів напіввиведення або 4 тижні з моменту останньої дози, залежно від того, що коротше).

7) Наявність архівної пухлинної тканини і згода на надання архівної пухлини для ретроспективного аналізу біомаркерів, або пацієнту необхідно пройти свіжу біопсію пухлини під час скринінгу, якщо архівна тканина недоступна (біопсія потрібна для пацієнтів у частині визначення дози Фази 1a).

8) Вік $\geq$ 18 років на момент підписання ФІС.

9) Статус за шкалою Східної кооперативної онкологічної групи (ECOG) 0 або 1.

10) Очікувана тривалість життя не менше 3 місяців на думку дослідника.

11) Готові і здатні дотримуватися всіх процедур дослідження.

12) Попередня променева терапія має бути завершена як мінімум за 2 тижні до першої дози досліджуваного лікарського засобу.

13) Прийом попередніх радіофармацевтичних лікарських засобів (наприклад, стронцій, самарій) має бути завершений як мінімум за 8 тижнів до першої дози досліджуваного лікарського засобу.

14) Попередня операція, що вимагає загальної анестезії, має бути завершена як мінімум за 1 тиждень до введення першої дози досліджуваного лікарського засобу. Операція, яка потребує місцевої/епідуральної анестезії, має бути завершена як мінімум за 72 години до введення першої дози досліджуваного лікарського засобу. Пацієнти повинні відновитися після будь-якої операції.

15) Значення скринінгових лабораторних аналізів мають відповідати таким критеріям:

Гематологічні

a. Нейтрофіли ≥ 1200 клітин/мкл

b. Тромбоцити $\geq 75 \times 10^3$ /мкл

c. Гемоглобін (Hb) $\geq 9,0$ г/дл

Ниркові:

Сироватковий креатинін $< 1,5 \times$ BMN або кліренс креатиніну (CrCl) від ≥ 40 мл/хв (з використанням Формули Кокрофта/Голта)

$$\text{Жіночий CrCl} = \frac{(140 - \text{вік у роках}) \times (\text{маса в кг}) \times 0,85}{72 \times (\text{креатинін сироватки в мг / дл})}$$

$$\text{Чоловічий CrCl} = \frac{(140 - \text{вік у роках}) \times (\text{маса в кг})}{72 \times (\text{креатинін сироватки в мг / дл})}$$

Печінкові:

d. АСТ і АЛТ $\leq 3 \times$ BMN (дозволені АСТ і АЛТ $< 5 \times$ BMN у пацієнтів із метастазами в печінці).

e. Білірубін $\leq 1,5 \times$ BMN (за винятком пацієнтів із синдромом Жильбера, у яких загальний білірубін має бути ≤ 3 мг/дл).

16) Негативний результат тесту на вагітність на β -хоріонічний гонадотропін людини (β -ХГЛ) в сироватці крові ≤ 96 годин до лікування в 1 циклі 1 дні (тільки для жінок дітородного віку).

17) У сексуально активних пацієнтів (жінки дітородного віку і чоловіки) готовність використовувати 2 ефективні методи контрацепції, з яких 1 має бути методом фізичного бар'єру (презерватив, діафрагма або шийний/склепінчастий ковпачок) протягом 6 місяців після останньої дози А-20502. Інші ефективні форми контрацепції такі:

Постійна стерилізація (гістеректомія і/або двостороння оваріектомія, двостороння перев'язка маткових труб із хірургічним втручанням або вазектомія) не менше ніж за 6 місяців до скринінгу.

Жінки дітородного віку, які отримують стабільну пероральну контрацептивну терапію, мають внутрішньоматкову спіраль або імплантат не менше 90 днів до дослідження або утримуються від статевих відносин як способу життя.

Критерії включення в фазу 1b наступні:

18) Усі критерії включення для фази 1a (виняток: Критерій включення № 1).

19) Позитивний результат на експресію В7-Н4 в архівному або свіжому зразку пухлини, що було оцінено супроводжувальним валідованим ІГХ аналізом у центральній лабораторії.

20) Допускається наявність в анамнезі інших злоякісних новоутворень за умови, що вони пройшли остаточне лікування без ознак рецидиву протягом останніх 2 років (виняток: дозволено остаточне лікування немеланомного раку шкіри, лобулярного раку in situ і раку шийки матки in situ протягом 2 років).

Додаткові критерії включення для конкретних когорт для фази 1b

Когорта 1bC1 рак яєчників:

- Гістологічно або цитологічно підтверджений діагноз рецидивуючої карциноми епітелію яєчників, карциноми первинної очеревини або карциноми маткової труби, яка не піддається лікуванню існуючою терапією (ями), яка, як відомо, забезпечує клінічну користь.

Прогресуюче захворювання на тлі або після як мінімум двох попередніх схем лікування, включаючи як мінімум одну платиновмісну схему, або непереносимість додаткової хіміотерапії.

- Відсутність попередньої терапії лікарськими засобами, спрямованими проти PD1 або PD-L1.

Когорта 1bC2 TNBC:

- Гістологічно або цитологічно підтверджений метастатичний TNBC.

- Щонайменше дві попередні лінії системної хіміотерапії, щонайменше одна з яких застосовувалася при метастатичному стані.

- Відсутність попередньої терапії лікарськими засобами, спрямованими проти PD1 або PD-L1.

Критерії включення: Критерії виключення (Фаза 1a і Фаза 1b)

Пацієнти, які відповідають будь-якому з наступних критеріїв, можуть бути виключені:

- 1) Імуносупресивні дози системних лікарських засобів, як-от стероїди або абсорбовані топічні стероїди (دوزи > 10 мг/день преднізону або його еквіваленти щодня) мають бути припинені щонайменше за 2 тижні до першої дози досліджуваного лікарського засобу. Дозволені короткі курси високих доз стероїдів, безперервні низькі дози (преднізон < 10 мг/день), інгаляційні, інтраназальні, внутрішньоочні і спільні ін'єкції стероїдів.
- 2) Зниження серцевої функції за шкалою Нью-Йоркської кардіологічної асоціації (NYHA) до > 2 класу при скринінгу.
- 3) Неконтрольоване або серйозне захворювання серця, як-от нестабільна стенокардія.
- 4) Інтервал QT з поправкою на частоту серцевих скорочень (QTc) згідно з керівними принципами установи > 450 мс для чоловіків або > 470 мс для жінок при скринінгу.
- 5) Історія наявності антитіл до лікарських препаратів (ADA), важкої алергічної, анафілактичної або іншої реакції, пов'язаної з інфузією, на попередній біологічний агент.
- 6) Відома гіперчутливість до будь-якого компонента композиції досліджуваного продукту (ДП) і/або до пембролізумабу.
- 7) Вакцини (наприклад, вакцина проти вірусу папіломи людини [ВПЛ]) протягом 4 тижнів до першої дози досліджуваного лікарського засобу. Інактивована вакцина проти сезонного грипу може вводитися пацієнтам до лікування і під час лікування без обмежень. Вакцини проти грипу, що містять живий вірус, або інші вакцини проти інфекційних захворювань (наприклад, пневмовакс, вітряна віспа, тощо) за клінічними показаннями можуть бути дозволені, але мають бути узгоджені з медичним спостерігачем спонсора і можуть потребувати періоду вимивання досліджуваного лікарського засобу до і після введення вакцини.
- 8) Поточна невіршена інфекція або історія хронічної, активної, клінічно значущої інфекції (вірусної, бактеріальної, грибкової або іншої), яка, на думку дослідника, може перешкоджати контакту пацієнта з біологічним агентом або може становити ризик для безпеки пацієнта.
- 9) Пацієнти з аномальними хімічними показниками сироватки, які, на думку дослідника, вважаються клінічно значущими. Сюди входять пацієнти, у яких проявляються клінічні ознаки і симптоми, пов'язані з аномальними хімічними показниками сироватки, а також пацієнти, у яких хімічні показники сироватки безсимптомні, але клінічно значущі, на думку дослідника (наприклад, гіпокаліємія або гіпонатріємія).
- 10) Будь-яке неконтрольоване захворювання або психічний розлад, яке, на думку дослідника, може становити ризик для безпеки пацієнта або заважати участі в дослідженні або інтерпретації результатів окремих пацієнтів.
- 11) Вагітні або жінки, які годують грудьми.
- 12) Активне, відоме або підозрюване аутоімунне захворювання, яке потребує лікування в останні 2 роки. До участі допускаються пацієнти з цукровим діабетом I типу, гіпотиреозом, що вимагає тільки замісної гормональної терапії, шкірними захворюваннями (як-от вітіліго, псоріаз або alopecija), що не вимагають системного лікування, або станами, повторення яких не очікується за відсутності зовнішнього тригера.
- 13) Відома історія позитивних результатів тестування на вірус імунодефіциту людини (ВІЛ) 1 або 2 або відомий синдром набутого імунодефіциту (СНІД).
- 14) Позитивний результат тестування на вірус гепатиту В з тестом на поверхневий антиген вірусу гепатиту В (HBsAg) або виявлення рибонуклеїнової кислоти вірусу гепатиту С (РНК HCV), які вказують на гостру або хронічну інфекцію.
- 15) Тривалі небажані явища від попереднього лікування > 1 ступеню (за винятком alopeciji 2 ступеню або периферичної нейропатії) на підставі загальних термінологічних критеріїв небажаних явищ (CTCAE) Національного інституту раку (NCI).
- 16) Симптоматичне інтерстиціальне захворювання легень або запальний пневмоніт.
- 17) Не ліковані або активні ЦНС або лептоменінгіальні метастази. Пацієнти мають право на участь у дослідженні, якщо метастази були вилікувані, і пацієнти неврологічно повернулися до вихідного рівня або неврологічно стабільні (за винятком залишкових ознак або симптомів, пов'язаних із лікуванням ЦНС), щонайменше, за 2 тижні до першої дози досліджуваного лікарського засобу.
- 18) Ознаки коагулопатії або діатезу, що кровоточить. Допускаються пацієнти, які отримують стабільні терапевтичні дози антикоагулянтів.
- 19) Переливання крові або тромбоцитів завершено за 72 години до першої дози досліджуваного лікарського засобу.
- 20) Будь-яке неконтрольоване запальне захворювання шлунково-кишкового тракту, включаючи хворобу Крона і виразковий коліт.

Випробування і спостереження: Оцінка безпеки включає оцінку показників життєво важливих функцій, масу тіла, фізичний огляд, оцінку ECOG, лабораторні тести (гематологія, хімічний аналіз сироватки і аналіз сечі), електрокардіограми (ЕКГ) і моніторинг небажаних явищ (НЯ) та супутніх ліків.

5 Архівна пухлинна тканина і згода надати архівну пухлину (або готовність пройти свіжу біопсію пухлини під час скринінгу) будуть зібрані для аналізу біомаркерів, щоб вивчити взаємозв'язок між вихідними рівнями мішені, імунним фенотипом пухлини і фармакодинамічною відповіддю.

10 Пухлинна тканина до і після лікування може бути зібрана в усіх пацієнтів у Фазі 1a визначення дози та у підгрупи пацієнтів (до 15 пацієнтів на когорті з 30 пацієнтів) в Фазі 1b застосування раніше встановленої максимальної переносимої дози в розширеній популяції для розширеного фармакодинамічного аналізу.

Оцінка ефективності може складатися з рентгенографії, яка виконується кожні 6 тижнів. Відповіді будуть оцінюватися відповідно до RECIST v1.1.

15 Статистичні методи:

Аналіз ефективності

20 ЧОВ може бути підсумовано за частотами і відсотками з 90 % довірчим інтервалом (ДІ) для кожної дози/когорти. Тривалість відповіді (DOR) для пацієнтів з повною відповіддю (ПВ) і частковою відповіддю (ЧВ) може бути підсумована з числом тих, хто відповів, числом і відсотком подій/цензурованих даних, а також оцінкою медіани DOR за Капланом-Мейєром з 95 % ДІ. Виживаність без прогресування (ВБП) для пролікованих пацієнтів можна підсумовувати з числом і відсотком пацієнтів із ВБП по кожній дозі/когорти. ВБП також можна підсумувати з використанням методу Каплана-Мейєра з 95 % ДІ. ЧОВ, DOR і ВБП можна визначити за допомогою RECIST v1.1.

25 Фармакокінетичний аналіз

Індивідуальні та середні ($\pm$ CBC) дані концентрації A-20502 в сироватці-час можуть бути зведені в таблицю і нанесені на графік за рівнем дози/когорти.

30 Параметри ФК можуть бути зведені в таблицю і підсумовані за рівнем дози/когорти, коли це необхідно і доречно. Вплив імуногенності на вплив A-20502 може бути оцінений, зведений в таблицю і підсумований за рівнем дози/когорти, якщо дозволяють дані. Індивідуальні та середні ($\pm$ CBC) з C_{max} і $C_{залишкова}$ дані концентрація пембролізумаба в сироватці-час можуть бути зведені в таблицю і нанесені на графік за когортою. Параметри ФК, як-от коефіцієнт накопичення та досягнення рівноважного стану, можуть бути зведені в таблицю і підсумовані за рівнем дози/когорти, якщо дані доступні.

35 Аналіз імуногенності

40 Вихідний ADA-позитивний суб'єкт визначається як суб'єкт, у якого на початковому рівні присутній ADA-позитивний зразок. ADA-позитивний суб'єкт являє собою суб'єкта з щонайменше одним ADA-позитивним зразком відносно вихідного рівня після початку лікування. Розподіл частот вихідних ADA-позитивних суб'єктів і ADA-позитивних суб'єктів після початку лікування можна підсумувати для A-20502 і пембролізумабу, відповідно.

Фармакодинамічний аналіз

Вибрані фармакодинамічні біомаркери оцінюватимуться щодо значущих змін між зразками пухлини і периферичної крові до і після лікування.

* * *

45 Обсяг цього винаходу не обмежується описаними в цьому документі конкретними варіантами здійснення. Дійсно, різні модифікації цього винаходу на додаток до описаних будуть очевидні фахівцям у цій області техніки з вищевказаного опису та супровідних фігур. Мається на увазі, що такі модифікації входять в обсяг формули винаходу, що додається.

50 Усі посилання (наприклад, публікації, патенти або патентні заявки), процитовані в цьому документі, включені в цей документ в якості посилання в усій своїй повноті і для всіх цілей, як якби кожне окреме посилання (наприклад, публікація, патент або заявка на патент) було конкретно й індивідуально включене шляхом посилання в усій своїй повноті для всіх цілей.

Інші варіанти здійснення знаходяться в межах нижченаведеної формули винаходу.

55

ПЕРЕЛІК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

<110> FIVE PRIME THERAPEUTICS, INC

<120> КОМБІНОВАНА ТЕРАПІЯ ОНКОЛОГІЧНОГО ЗАХВОРЮВАННЯ

<130> 3986.018PC03

<150> US 62/854 494

<151> 30.05.2019

<150> US 62/802 091

<151> 06.02.2019

<150> US 62/745 464

<151> 15.10.2018

<160> 41

<170> PatentIn версія 3.5

<210> 1

<211> 282

<212> БЕЛОК

<213> Homo sapiens

<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

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> Штучна послідовність

<220>

<223> B7-H4 яванського 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
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 Leu Ala Ile Ser Trp Ala Leu
260 265 270

Leu Pro Leu Ala Pro Tyr Leu Met Leu Lys
275 280

<210> 3

<211> 283

<212> БЕЛОК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> B7-H4 миші

<400> 3

Met Ala Ser Leu Gly Gln Ile Ile Phe Trp Ser Ile Ile Asn 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 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

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 Arg 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 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> Штучна послідовність

<220>

<223> B7-H4 шура

<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

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> Штучна послідовність

<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> Штучна послідовність

<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> Штучна послідовність

<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> Штучна послідовність

<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> Штучна послідовність

<220>

<223> VL CDR2

<400> 9

Gly Ala Ser Thr Arg Ala Thr

1 5

<210> 10

<211> 9

<212> БЕЛОК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> VL CDR3

<400> 10

Gln Gln Tyr His Ser Phe Pro Phe Thr

1 5

<210> 11

<211> 120

<212> БЕЛОК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> VH амінокислотна послідовність

<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> Штучна послідовність

<220>

<223> VL амінокислотна послідовність

<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> Штучна послідовність

<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> Штучна послідовність

<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> Штучна послідовність

<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> Штучна послідовність

<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> Штучна послідовність

<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> Штучна послідовність

<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> Штучна послідовність

<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> Штучна послідовність

<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> Штучна послідовність

<220>

<223> амінокислотна послідовність повнорозмірного важкого ланцюга

<400> 21

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

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> Штучна послідовність

<220>

<223> амінокислотна послідовність повнорозмірного легкого ланцюга

<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> Штучна послідовність

<220>

<223> константна область легкого ланцюга каппа людини

<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> Штучна послідовність

<220>

<223> константна область легкого ланцюга каппа людини

<400> 24

cggaccgtgg ctgcaccatc tgtcttcac ttcccgccat ctgatgagca gttgaaatct 60

ggaactgcct ctgttgtgtg cctgtgaat aactctatc ccagagagggc caaagtacag 120

tggaaggtgg ataacgcct ccaatcgggt aactcccagg agagtgtcac agagcaggac 180

agcaaggaca gcacctacag cctcagcagc accctgacgc tgagcaaagc agactacgag 240

aaacacaaag tctacgcctg cgaagtcacc catcagggcc tgagctcgcc cgtcacaag 300

agcttcaaca ggggagagtg t 321

<210> 25

<211> 330

<212> БЕЛОК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> важкий ланцюг IgG1 людини

<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

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> Штучна послідовність

<220>

<223> константний домен важкого ланцюга

<400> 26

gcctccacca agggcccatc ggtcttcccc ctggcacccct cctccaagag cacctctggg	60
ggcacagcgg cctgggctg cctgggtcaag gactacttcc ccgaaccggt gacgggtgctg	120
tggaactcag ggcacctgac cagcggcgtg cacaccttcc cggtgtctct acagtcctca	180
ggactctact cctcagcag cgtgggtgacc gtgacctcca gcagcttggg caccagacc	240
tacatctgca acgtgaatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagaa agttgagccc	300
aaatcttggt aaaaaactca cacatgccca cctgcccag cacctgaact cctgggggga	360
ccgtcagtct tctcttccc cccaaaaccc aaggacaccc tcatgatctc ccggaccct	420
gaggtcacat gcgtgggtgt ggacgtgagc cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg	480
tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc cgcgggagga gcagtacaac	540
agcacgtacc ggggtggtcag cgtcctcacc gtctgcacc aggactggct gaatggcaag	600
gagtacaagt gcaaggtctc caacaaagcc ctcccagccc ccatcgagaa aaccatctcc	660
aaagccaaag ggcagccccg agaaccacag gtgtacaccc tgccccatc ccgggatgag	720
ctgaccaaga accaggtcag cctgacctgc ctgggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc	780
gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctcccggtg	840
ctggactccg acggctcctt ctctctctac agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg	900

cagcagggga acgtcttctc atgtccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacag 960

cagaagagcc tctccctgtc tccgggtaaa 990

<210> 27

<211> 360

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> нуклеотидна послідовність, що кодує варіабельний важкий ланцюг

<400> 27

cagctgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcggagac cctgtccctc 60

acctgcactg tctctgggtg ctcacatcaa agtggtagtt actactgggg ctggatccgc 120

cagccccag ggaaggggct ggagtggtt gggaacatct attatagtgg gagcacctac 180

tacaaccgt cctcagaag tcgagtcacc atatccgtag acacgtcaa gaaccagttc 240

tcctgaagc tgagttctgt gaccgccga gacacggcgg tgtactactg cgccagagaa 300

ggatcttacc ccaatcagtt tgatccatgg ggacagggtta cattgggtcac cgtctctca 360

<210> 28

<211> 321

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> нуклеотидна послідовність, що кодує варіабельний легкий ланцюг

<400> 28

gaaatagtga tgacgcagtc tccagccacc ctgtctgtgt ctccagggga aagagccacc 60

ctctcctgca gggccagtca gagtgttagc agcaacttag cctggtacca gcagaaacct 120

ggccaggctc ccaggctcct catctatggt gcatccacca gggccactgg tatcccagcc 180

aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagag ttactctca ccatcagcag cctgcagtct 240

gaagattttg cagtttatta ctgtcagcag taccactcct tccctttcac ttttggcgga 300

gggaccaagg ttgagatcaa a 321

<210> 29

<211> 385

<212> БЕЛОК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> B7-H4 IgV-huIgG1

<400> 29

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

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 Gly Ser Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys
 145 150 155 160

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
165 170 175

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
180 185 190

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
195 200 205

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
210 215 220

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
225 230 235 240

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
245 250 255

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
260 265 270

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
275 280 285

Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr

290 295 300

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu

305 310 315 320

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu

325 330 335

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys

340 345 350

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu

355 360 365

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly

370 375 380

Lys

385

<210> 30

<211> 447

<212> БЕЛОК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> важкий ланцюг антитіла до PD-1

<400> 30

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

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

Tyr Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Gly Ile Asn Pro Ser Asn Gly Gly Thr Asn Phe Asn Glu Lys Phe
50 55 60

Lys Asn Arg Val Thr Leu Thr Thr Asp Ser Ser Thr Thr Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Lys Ser Leu Gln Phe Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Arg Asp Tyr Arg Phe Asp Met Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val

115	120	125	
Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser 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 Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys			
	195	200	205
Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro			
	210	215	220
Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val			
225	230	235	240
Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr			
	245	250	255

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu
260 265 270

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

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

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

Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile
325 330 335

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

Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
355 360 365

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
370 375 380

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

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

Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
420 425 430

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
435 440 445

<210> 31

<211> 218

<212> БЕЛОК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> легкий ланцюг антитіла до PD-1

<400> 31

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Lys Gly Val Ser Thr Ser
20 25 30

Gly Tyr Ser Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro
 35 40 45

Arg Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Tyr Leu Glu Ser Gly Val Pro Ala
 50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
 65 70 75 80

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

Asp Leu Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 100 105 110

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
 115 120 125

Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
 130 135 140

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
 145 150 155 160

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
 165 170 175

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

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

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215

<210> 32

<211> 120

<212> БЕЛОК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Амінокислотна послідовність VH антитіла до PD-1

<400> 32

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

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

Tyr Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45

Gly Gly Ile Asn Pro Ser Asn Gly Gly Thr Asn Phe Asn Glu Lys Phe
 50 55 60

Lys Asn Arg Val Thr Leu Thr Thr Asp Ser Ser Thr Thr Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Met Glu Leu Lys Ser Leu Gln Phe Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Arg Asp Tyr Arg Phe Asp Met Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 33

<211> 111

<212> БЕЛОК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Амінокислотна послідовність VL антитіла до PD-1

<400> 33

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Lys Gly Val Ser Thr Ser

20 25 30

Gly Tyr Ser Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro

35 40 45

Arg Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Tyr Leu Glu Ser Gly Val Pro Ala

50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser

65 70 75 80

Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln His Ser Arg

85 90 95

Asp Leu Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105 110

<210> 34

<211> 5

<212> БЕЛОК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> антитіло до PD-1 VH-CDR1

<400> 34

Asn Tyr Tyr Met Tyr

1 5

<210> 35

<211> 17

<212> БЕЛОК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> антитіло до PD-1 VH-CDR2

<400> 35

Gly Ile Asn Pro Ser Asn Gly Gly Thr Asn Phe Asn Glu Lys Phe Lys

1 5 10 15

Asn

<210> 36

<211> 11

<212> БЕЛОК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> антитіло до PD-1 VH-CDR3

<400> 36

Arg Asp Tyr Arg Phe Asp Met Gly Phe Asp Tyr

1 5 10

<210> 37

<211> 15

<212> БЕЛОК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> антитіло до PD-1 VL-CDR1

<400> 37

Arg Ala Ser Lys Gly Val Ser Thr Ser Gly Tyr Ser Tyr Leu His

1 5 10 15

<210> 38

<211> 7

<212> БЕЛОК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> антитіло до PD-1 VL-CDR2

<400> 38

Leu Ala Ser Tyr Leu Glu Ser

1 5

<210> 39

<211> 9

<212> БЕЛОК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> антитіло до PD-1 VL-CDR3

<400> 39

Gln His Ser Arg Asp Leu Pro Leu Thr

1 5

<210> 40

<211> 288

<212> БЕЛОК

<213> Homo sapiens

<400> 40

Met Gln Ile Pro Gln Ala Pro Trp Pro Val Val Trp Ala Val Leu Gln

1 5 10 15

Leu Gly Trp Arg Pro Gly Trp Phe Leu Asp Ser Pro Asp Arg Pro Trp

20 25 30

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

Asn Ala Thr Phe Thr Cys Ser Phe Ser Asn Thr Ser Glu Ser Phe Val
 50 55 60

Leu Asn Trp Tyr Arg Met Ser Pro Ser Asn Gln Thr Asp Lys Leu Ala
 65 70 75 80

Ala Phe Pro Glu Asp Arg Ser Gln Pro Gly Gln Asp Cys Arg Phe Arg
 85 90 95

Val Thr Gln Leu Pro Asn Gly Arg Asp Phe His Met Ser Val Val Arg
 100 105 110

Ala Arg Arg Asn Asp Ser Gly Thr Tyr Leu Cys Gly Ala Ile Ser Leu
 115 120 125

Ala Pro Lys Ala Gln Ile Lys Glu Ser Leu Arg Ala Glu Leu Arg Val
 130 135 140

Thr Glu Arg Arg Ala Glu Val Pro Thr Ala His Pro Ser Pro Ser Pro
 145 150 155 160

Arg Pro Ala Gly Gln Phe Gln Thr Leu Val Val Gly Val Val Gly Gly
165 170 175

Leu Leu Gly Ser Leu Val Leu Leu Val Trp Val Leu Ala Val Ile Cys
180 185 190

Ser Arg Ala Ala Arg Gly Thr Ile Gly Ala Arg Arg Thr Gly Gln Pro
195 200 205

Leu Lys Glu Asp Pro Ser Ala Val Pro Val Phe Ser Val Asp Tyr Gly
210 215 220

Glu Leu Asp Phe Gln Trp Arg Glu Lys Thr Pro Glu Pro Pro Val Pro
225 230 235 240

Cys Val Pro Glu Gln Thr Glu Tyr Ala Thr Ile Val Phe Pro Ser Gly
245 250 255

Met Gly Thr Ser Ser Pro Ala Arg Arg Gly Ser Ala Asp Gly Pro Arg
260 265 270

Ser Ala Gln Pro Leu Arg Pro Glu Asp Gly His Cys Ser Trp Pro Leu
275 280 285

<210> 41

<211> 290

<212> БЕЛОР

<213> Homo sapiens

<400> 41

Met Arg Ile Phe Ala Val Phe Ile Phe Met Thr Tyr Trp His Leu Leu

1 5 10 15

Asn Ala Phe Thr Val Thr Val Pro Lys Asp Leu Tyr Val Val Glu Tyr

20 25 30

Gly Ser Asn Met Thr Ile Glu Cys Lys Phe Pro Val Glu Lys Gln Leu

35 40 45

Asp Leu Ala Ala Leu Ile Val Tyr Trp Glu Met Glu Asp Lys Asn Ile

50 55 60

Ile Gln Phe Val His Gly Glu Glu Asp Leu Lys Val Gln His Ser Ser

65 70 75 80

Tyr Arg Gln Arg Ala Arg Leu Leu Lys Asp Gln Leu Ser Leu Gly Asn

85 90 95

Ala Ala Leu Gln Ile Thr Asp Val Lys Leu Gln Asp Ala Gly Val Tyr

100 105 110

Arg Cys Met Ile Ser Tyr Gly Gly Ala Asp Tyr Lys Arg Ile Thr Val
 115 120 125

Lys Val Asn Ala Pro Tyr Asn Lys Ile Asn Gln Arg Ile Leu Val Val
 130 135 140

Asp Pro Val Thr Ser Glu His Glu Leu Thr Cys Gln Ala Glu Gly Tyr
 145 150 155 160

Pro Lys Ala Glu Val Ile Trp Thr Ser Ser Asp His Gln Val Leu Ser
 165 170 175

Gly Lys Thr Thr Thr Thr Asn Ser Lys Arg Glu Glu Lys Leu Phe Asn
 180 185 190

Val Thr Ser Thr Leu Arg Ile Asn Thr Thr Thr Asn Glu Ile Phe Tyr
 195 200 205

Cys Thr Phe Arg Arg Leu Asp Pro Glu Glu Asn His Thr Ala Glu Leu
 210 215 220

Val Ile Pro Glu Leu Pro Leu Ala His Pro Pro Asn Glu Arg Thr His
 225 230 235 240

Leu Val Ile Leu Gly Ala Ile Leu Leu Cys Leu Gly Val Ala Leu Thr

245

250

255

Phe Ile Phe Arg Leu Arg Lys Gly Arg Met Met Asp Val Lys Lys Cys

260

265

270

Gly Ile Gln Asp Thr Asn Ser Lys Lys Gln Ser Asp Thr His Leu Glu

275

280

285

Glu Thr

290

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

- 5 1. Спосіб лікування солідної пухлини у суб'єкта-людини, за яким суб'єкту вводять:
(i) від 0,1 до 20 мг/кг антитіла до B7-H4, яке специфічно зв'язується з B7-H4 людини і містить варіабельну ділянку важкого ланцюга (VH), що містить амінокислотну послідовність, наведену в SEQ ID NO: 11, і варіабельну ділянку легкого ланцюга (VL), що містить амінокислотну послідовність, наведену в SEQ ID NO: 12; і
- 10 (ii) 200 мг антитіла до PD-1, яке містить VH, що містить амінокислотну послідовність, наведену в SEQ ID NO: 32, і VL, що містить амінокислотну послідовність, наведену в SEQ ID NO: 33.
2. Спосіб за п. 1, за яким (а) антитіла до B7-H4 присутні у фармацевтичній композиції, яка додатково містить фармацевтично прийнятний наповнювач, де 95-100 % антитіл до B7-H4 у композиції є афукозильованими, і
- 15 (b) антитіла до PD-1 присутні у фармацевтичній композиції, яка додатково містить фармацевтично прийнятний наповнювач.
3. Спосіб за п. 1 або 2, за яким суб'єкту вводять 20 мг/кг антитіла до B7-H4.
4. Спосіб за п. 1 або 2, за яким суб'єкту вводять 10 мг/кг антитіла до B7-H4.
5. Спосіб за п. 1 або 2, за яким суб'єкту вводять 3 мг/кг антитіла до B7-H4.
- 20 6. Спосіб за п. 1 або 2, за яким суб'єкту вводять 1 мг/кг антитіла до B7-H4.
7. Спосіб за п. 1 або 2, за яким суб'єкту вводять 0,3 мг/кг антитіла до B7-H4.
8. Спосіб за п. 1 або 2, за яким суб'єкту вводять 0,1 мг/кг антитіла до B7-H4.
9. Спосіб за будь-яким із пп. 1-8, за яким антитіло до B7-H4 і антитіло до PD-1 вводять одночасно.
- 25 10. Спосіб за п. 9, за яким антитіло до B7-H4 і антитіло до PD-1 вводять у вигляді окремих складів в один і той самий день.
11. Спосіб за будь-яким із пп. 1-8, за яким антитіло до B7-H4 і антитіло до PD-1 вводять послідовно.
12. Спосіб за п. 8, за яким антитіло до PD-1 вводять після антитіла до B7-H4.
- 30 13. Спосіб за будь-яким із пп. 1-12, за яким антитіло до B7-H4 вводять один раз на три тижні.
14. Спосіб за будь-яким із пп. 1-12, за яким антитіло до PD-1 вводять один раз на три тижні.
15. Спосіб за будь-яким із пп. 1-12, за яким антитіло до B7-H4 і антитіло до PD-1, кожне, вводять один раз на три тижні.
16. Спосіб за будь-яким із пп. 1-15, за яким антитіло до B7-H4 вводять внутрішньовенно.
- 35 17. Спосіб за будь-яким із пп. 1-16, за яким антитіло до PD-1 вводять внутрішньовенно.
18. Спосіб за будь-яким із пп. 1-17, за яким B7-H4 був виявлений в солідній пухлині з використанням імуногістохімії (ІГХ) до введення.

19. Спосіб за будь-яким із пп. 1-18, за яким антитіло до B7-H4 містить константну ділянку важкого ланцюга імуноглобуліну IgG1 людини і/або за яким антитіло до B7-H4 містить константну ділянку легкого ланцюга імуноглобуліну IgGκ людини.
20. Спосіб за будь-яким із пп. 1-19, за яким антитіло до B7-H4 містить константну ділянку важкого ланцюга, що містить амінокислотну послідовність, наведену в SEQ ID NO: 25, і константну ділянку легкого ланцюга, що містить амінокислотну послідовність, наведену в SEQ ID NO: 23.
21. Спосіб за будь-яким із пп. 1-20, за яким антитіло до B7-H4 містить важкий ланцюг, що містить амінокислотну послідовність, наведену в SEQ ID NO: 21, і легкий ланцюг, що містить амінокислотну послідовність, наведену в SEQ ID NO: 22.
22. Спосіб за будь-яким із пп. 1-21, за яким антитіло до B7-H4 являє собою антитіло людини.
23. Спосіб за будь-яким із пп. 1 і 3-22, за яким антитіло до B7-H4 є афукозильованим.
24. Спосіб за будь-яким із пп. 2-23, за яким рівень фукозилювання антитіла до B7-H4 не піддається визначенню в композиції.
25. Спосіб за будь-яким із пп. 1-24, за яким антитіло до PD-1 або антигензв'язувальний фрагмент являє собою пембролізумаб.
26. Спосіб за п. 25, що включає введення 200 мг пембролізумабу.
27. Спосіб за будь-яким із пп. 1-26, що включає введення суб'єкту (i) 3, 10 або 20 мг/кг антитіла до B7-H4, яке специфічно зв'язується з B7-H4 людини і містить VH, що містить амінокислотну послідовність, наведену в SEQ ID NO: 11, і VL, що містить амінокислотну послідовність, наведену в SEQ ID NO: 12, де рівень фукозилювання антитіла до B7-H4 не піддається визначенню; і (ii) 200 мг пембролізумабу; де (i) і (ii) вводять внутрішньовенно у вигляді окремих складів в один і той самий день.
28. Спосіб за п. 27, за яким антитіло до B7-H4 містить важкий ланцюг, що містить амінокислотну послідовність, наведену в SEQ ID NO: 21, і легкий ланцюг, що містить амінокислотну послідовність, наведену в SEQ ID NO: 22.
29. Спосіб за будь-яким із пп. 1-28, за яким солідна пухлина експресує B7-H4.
30. Спосіб за будь-яким із пп. 1-29, за яким солідна пухлина є неоперабельною, місцево поширеною або метастатичною.
31. Спосіб за будь-яким із пп. 1-30, за яким солідна пухлина вибрана з групи, що складається з раку молочної залози, протокової карциноми, раку ендометрія, раку яєчників, уротеліального раку, недрібноклітинного раку легень, раку підшлункової залози, раку щитоподібної залози, раку нирки і раку сечового міхура.
32. Спосіб за п. 31, за яким солідна пухлина являє собою рак молочної залози або рак яєчників.
33. Спосіб за п. 32, за яким солідна пухлина являє собою рак молочної залози.
34. Спосіб за п. 33, за яким рак молочної залози являє собою поширений рак молочної залози.
35. Спосіб за будь-яким із пп. 32-34, за яким рак молочної залози являє собою тричі негативний рак молочної залози.
36. Спосіб за будь-яким із пп. 32-34, за яким рак молочної залози являє собою рак молочної залози, позитивний щодо рецепторів гормонів (HR).
37. Спосіб за п. 31, за яким недрібноклітинний рак легень являє собою плоскоклітинний рак.
38. Спосіб за будь-яким із пп. 1-37, за яким пацієнт раніше не отримував терапію антагоністом PD-1/PD-L1.
39. Спосіб за будь-яким із пп. 1-38, що додатково включає здійснення моніторингу кількості імунних клітин у пухлині.
40. Спосіб за будь-яким із пп. 1-38, що додатково включає здійснення моніторингу кількості природних клітин-кілерів (NK), клітин CD4+ і/або клітин CD8+ в пухлині.
41. Спосіб за будь-яким із пп. 1-40, що додатково включає здійснення моніторингу рівнів цитокінів у суб'єкта.
42. Спосіб за будь-яким із пп. 1-41, що додатково включає здійснення моніторингу рівнів IL-2, IL-6, IL-10, TNF і/або гамма-інтерферону (IFN γ) у суб'єкта.
43. Спосіб лікування солідної пухлини у суб'єкта-людини, за яким суб'єкту вводять (i) 20 мг/кг антитіла до B7-H4, яке специфічно зв'язується з B7-H4 людини і містить VH, що містить амінокислотну послідовність, наведену в SEQ ID NO: 11 і VL, що містить амінокислотну послідовність, наведену в SEQ ID NO: 12; і (ii) 200 мг антитіла до PD-1, що містить VH, що містить амінокислотну послідовність, наведену в SEQ ID NO: 32, і VL, що містить амінокислотну послідовність, наведену в SEQ ID NO: 33, за яким антитіло до B7-H4 і антитіло до PD-1 вводять внутрішньовенно один раз на три тижні.
44. Спосіб за п. 43, за яким

(а) антитіла до В7-Н4 присутні у фармацевтичній композиції, яка додатково містить фармацевтично прийнятний наповнювач, де 95-100 % антитіл до В7-Н4 в композиції є афукозильованими; і

5 (b) антитіла до PD-1 присутні у фармацевтичній композиції, яка додатково містить фармацевтично прийнятний наповнювач.

45. Спосіб за п. 43 або 44, за яким антитіло до В7-Н4 містить важкий ланцюг, що містить амінокислотну послідовність, наведену в SEQ ID NO: 21, і легкий ланцюг, що містить амінокислотну послідовність, наведену в SEQ ID NO: 22.

10 46. Спосіб за будь-яким із пп. 43-45, за яким антитіло до PD-1 містить важкий ланцюг, що містить амінокислотну послідовність, наведену в SEQ ID NO: 30, і легкий ланцюг, що містить амінокислотну послідовність, наведену в SEQ ID NO: 31.

47. Спосіб за будь-яким із пп. 43-46, за яким солідна пухлина являє собою рак молочної залози, необов'язково, де рак молочної залози являє собою тричі негативний рак молочної залози або рак яєчників.

15 48. Застосування (i) від 0,1 до 20 мг/кг антитіла до В7-Н4, яке специфічно зв'язується з В7-Н4 людини і містить варіабельну ділянку важкого ланцюга (VH), що містить амінокислотну послідовність, наведену в SEQ ID NO: 11, і варіабельну ділянку легкого ланцюга (VL), що містить амінокислотну послідовність, наведену в SEQ ID NO: 12; і (ii) 200 мг антитіла до PD-1, яке містить VH, що містить амінокислотну послідовність, наведену в SEQ ID NO: 32, і VL, що
20 містить амінокислотну послідовність, наведену в SEQ ID NO: 33, для лікування солідної пухлини у суб'єкта-людини.

49. Застосування за п. 48, за яким

25 (а) антитіла до В7-Н4 присутні у фармацевтичній композиції, яка містить від 0,1 до 20 мг/кг антитіла до В7-Н4 і додатково містить фармацевтично прийнятний наповнювач, де 95-100 % антитіл до В7-Н4 у композиції є афукозильованими; і

(b) антитіла до PD-1 присутні у фармацевтичній композиції, яка містить 200 мг антитіла до PD-1 і фармацевтично прийнятний наповнювач.

50. Застосування за п. 48 або 49, за яким застосовують 20 мг/кг антитіла до В7-Н4.

51. Застосування за п. 48 або 49, за яким застосовують 10 мг/кг антитіла до В7-Н4.

30 52. Застосування за п. 48 або 49, за яким застосовують 3 мг/кг антитіла до В7-Н4.

53. Застосування за п. 48 або 49, за яким застосовують 1 мг/кг антитіла до В7-Н4.

54. Застосування за п. 48 або 49, за яким застосовують 0,3 мг/кг антитіла до В7-Н4.

55. Застосування за п. 48 або 49, за яким застосовують 0,1 мг/кг антитіла до В7-Н4.

35 56. Застосування за будь-яким із пп. 48-55, де антитіло до В7-Н4 і антитіло до PD-1 застосовують одночасно.

57. Застосування за п. 56, за яким антитіло до В7-Н4 і антитіло до PD-1 застосовують у вигляді окремих складів в один і той самий день.

58. Застосування за будь-яким із пп. 48-55, за яким антитіло до В7-Н4 і антитіло до PD-1 застосовують послідовно.

40 59. Застосування за п. 58, за яким антитіло до PD-1 застосовують після застосування антитіла до В7-Н4.

60. Застосування за будь-яким із пп. 48-59, за яким антитіло до В7-Н4 застосовують один раз на три тижні.

45 61. Застосування за будь-яким із пп. 48-59, за яким антитіло до PD-1 застосовують один раз на три тижні.

62. Застосування за будь-яким із пп. 48-59, за яким антитіло до В7-Н4 і антитіло до PD-1 кожне застосовують один раз на три тижні.

63. Застосування за будь-яким із пп. 48-62, за яким антитіло до В7-Н4 застосовують внутрішньовенно.

50 64. Застосування за будь-яким із пп. 48-63, за яким антитіло до PD-1 застосовують внутрішньовенно.

65. Застосування за будь-яким із пп. 48-64, за яким В7-Н4 був виявлений в солідній пухлині з використанням імуногістохімії (ІГХ) до застосування.

55 66. Застосування за будь-яким із пп. 48-65, за яким антитіло до В7-Н4 містить константну ділянку важкого ланцюга імуноглобуліну IgG1 людини і/або де антитіло до В7-Н4 містить константну ділянку легкого ланцюга імуноглобуліну IgGκ людини.

67. Застосування за будь-яким із пп. 48-66, за яким антитіло до В7-Н4 містить константну ділянку важкого ланцюга, що містить амінокислотну послідовність, наведену в SEQ ID NO: 25, і константну ділянку легкого ланцюга, що містить амінокислотну послідовність, наведену в SEQ ID NO: 23.

60

68. Застосування за будь-яким із пп. 48-67, за яким антитіло до B7-H4 містить важкий ланцюг, що містить амінокислотну послідовність, наведену в SEQ ID NO: 21, і легкий ланцюг, що містить амінокислотну послідовність, наведену в SEQ ID NO: 22.
69. Застосування за будь-яким із пп. 48-68, де антитіло до B7-H4 являє собою антитіло людини.
- 5 70. Застосування за будь-яким із пп. 48 і 50-69, за яким антитіло до B7-H4 є афукозильованим.
71. Застосування за будь-яким із пп. 49-70, за яким рівень фукозилювання антитіла до B7-H4 не піддається визначенню в композиції.
72. Застосування за будь-яким із пп. 48-71, за яким антитіло до PD-1 або антигензв'язувальний фрагмент являє собою пембролізумаб.
- 10 73. Застосування за п. 72, що включає застосування 200 мг пембролізумабу.
74. Застосування за будь-яким із пп. 48-73, що включає (i) 3, 10 або 20 мг/кг антитіла до B7-H4, яке специфічно зв'язується з B7-H4 людини і містить VH, що містить амінокислотну послідовність, наведену в SEQ ID NO: 11, і VL, що містить амінокислотну послідовність, наведену в SEQ ID NO: 12, де рівень фукозилювання антитіла до B7-H4 не піддається
- 15 визначенню; і (ii) 200 мг пембролізумабу; де (i) і (ii) застосовують внутрішньовенно у вигляді окремих складів в один і той самий день.
75. Застосування за п. 74, за яким антитіло до B7-H4 містить важкий ланцюг, що містить амінокислотну послідовність, наведену в SEQ ID NO: 21, і легкий ланцюг, що містить амінокислотну послідовність, наведену в SEQ ID NO: 22.
- 20 76. Застосування за будь-яким із пп. 48-75, за яким солідна пухлина експресує B7-H4.
77. Застосування за будь-яким із пп. 48-76, за яким солідна пухлина є неоперабельною, місцевопоширеною або метастатичною.
78. Застосування за будь-яким із пп. 48-77, за яким солідна пухлина вибрана з групи, що складається з раку молочної залози, протокової карциноми, раку ендометрія, раку яєчників,
- 25 уротеліального раку, недрібноклітинного раку легень, раку підшлункової залози, раку щитоподібної залози, раку нирки і раку сечового міхура.
79. Застосування за п. 78, за яким солідна пухлина являє собою рак молочної залози або рак яєчників.
80. Застосування за п. 79, за яким солідна пухлина являє собою рак молочної залози.
- 30 81. Застосування за п. 80, за яким рак молочної залози являє собою поширений рак молочної залози.
82. Застосування за будь-яким із пп. 79-81, за яким рак молочної залози являє собою тричі негативний рак молочної залози.
83. Застосування за будь-яким із пп. 79-81, за яким рак молочної залози являє собою рак
- 35 молочної залози, позитивний щодо рецепторів гормонів (HR).
84. Застосування за п. 78, за яким недрібноклітинний рак легень являє собою плоскоклітинний рак.
85. Застосування за будь-яким із пп. 48-84, за яким пацієнт раніше не отримував терапію антагоністом PD-1/PD-L1.
- 40 86. Застосування (i) 20 мг/кг антитіла до B7-H4, яке специфічно зв'язується з B7-H4 людини і містить VH, що містить амінокислотну послідовність, наведену в SEQ ID NO: 11, і VL, що містить амінокислотну послідовність, наведену в SEQ ID NO: 12; і (ii) 200 мг антитіла до PD-1, що містить VH, що містить амінокислотну послідовність, наведену в SEQ ID NO: 32, і VL, що містить амінокислотну послідовність, наведену в SEQ ID NO: 33, де антитіло до B7-H4 і антитіло до PD-
- 45 1 застосовують внутрішньовенно один раз на три тижні, для лікування солідної пухлини у суб'єкта-людини.
87. Застосування за п. 86, де (а) антитіла до B7-H4 присутні у фармацевтичній композиції, яка містить 20 мг/кг антитіл до B7-H4 і фармацевтично прийнятний наповнювач, де 95-100 % антитіл до B7-H4 у композиції є афукозильованими; і
- 50 (b) антитіла до PD-1 присутні у фармацевтичній композиції, що містить 200 мг антитіла до PD-1 і фармацевтично прийнятний наповнювач.
88. Застосування за п. 86 або 87, за яким антитіло до B7-H4 містить важкий ланцюг, що містить амінокислотну послідовність, наведену в SEQ ID NO: 21, і легкий ланцюг, що містить амінокислотну послідовність, наведену в SEQ ID NO: 22.
- 55 89. Застосування за будь-яким із пп. 86-88, за яким антитіло до PD-1 містить важкий ланцюг, що містить амінокислотну послідовність, наведену в SEQ ID NO: 30, і легкий ланцюг, що містить амінокислотну послідовність, наведену в SEQ ID NO: 31.
90. Застосування за будь-яким із пп. 86-89, за яким солідна пухлина являє собою рак молочної залози, необов'язково, де рак молочної залози являє собою тричі негативний рак молочної
- 60 залози або рак яєчників.

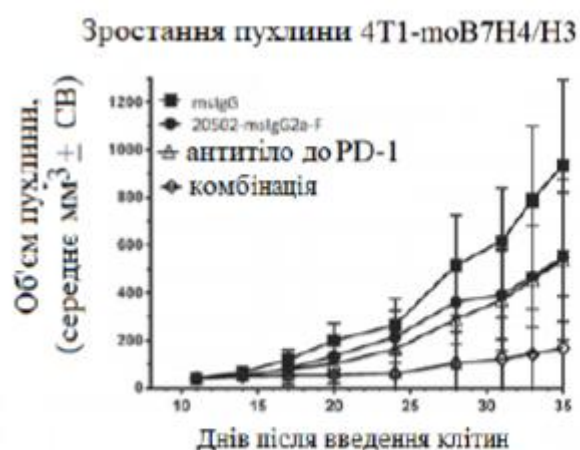


Fig. 1A

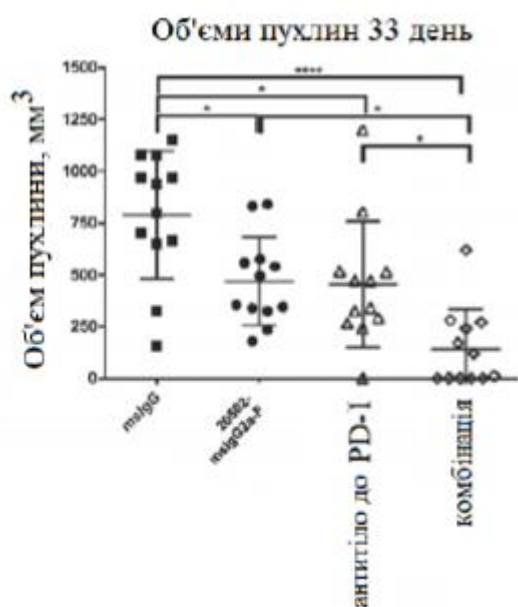


Fig. 1B

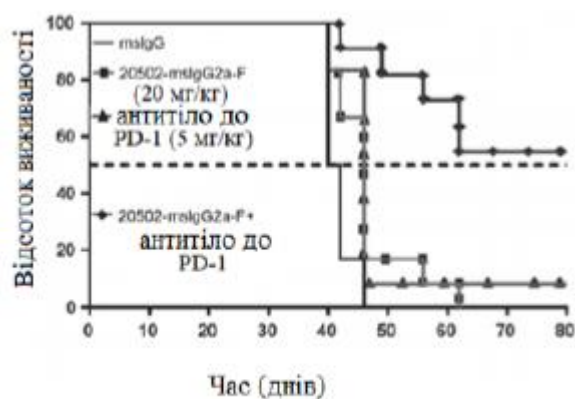


Fig. 1C

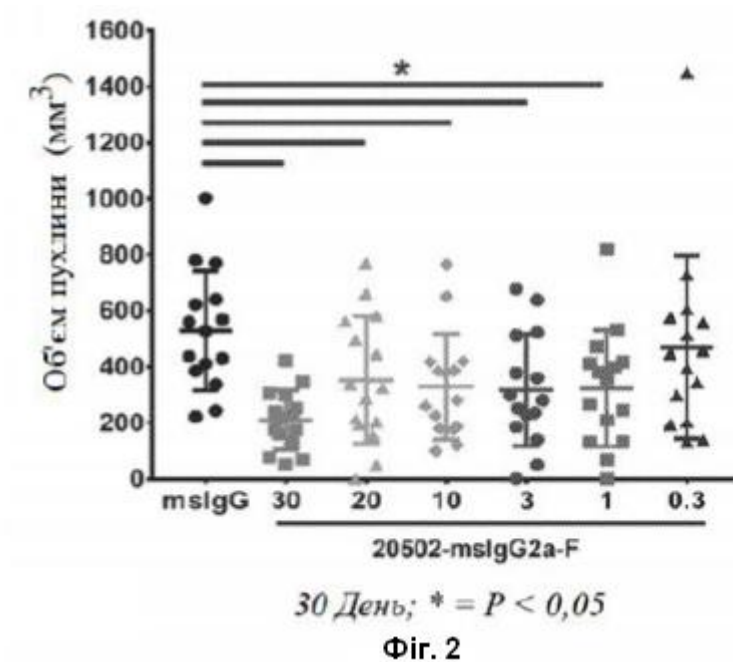


Fig. 2

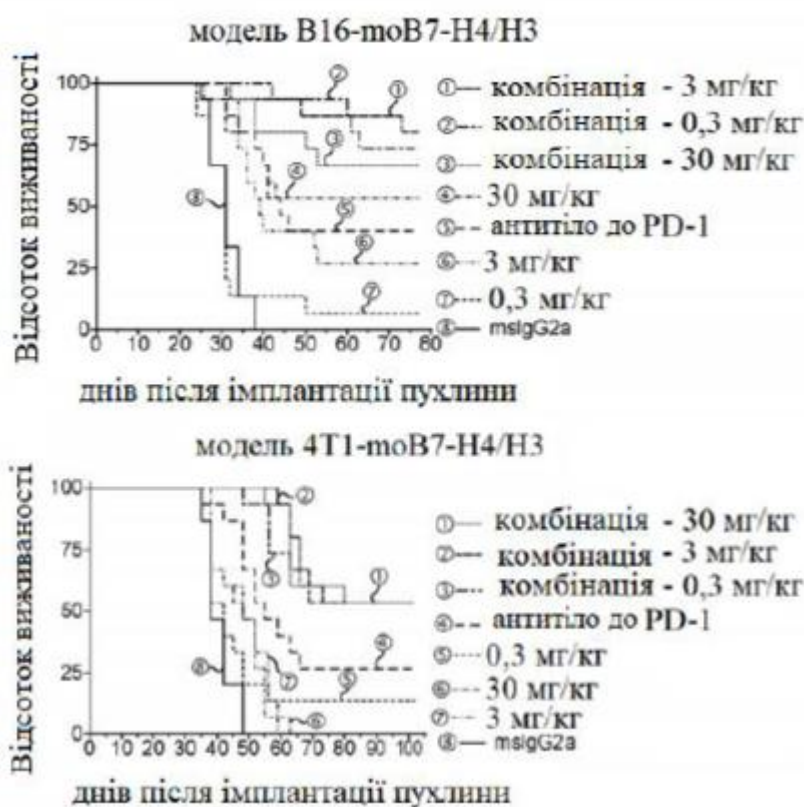


Fig. 3