



República Federativa do Brasil  
Ministério da Economia  
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) BR 112020003533-5 A2



(22) Data do Depósito: 23/08/2018

(43) Data da Publicação Nacional: 17/11/2020

(54) Título: ANTICORPOS B7-H4 E MÉTODOS DE USO DOS MESMOS

(51) Int. Cl.: C07K 16/28; A61P 35/00.

(30) Prioridade Unionista: 12/04/2018 US 62/656,789; 19/12/2017 US 62/607,810; 25/08/2017 US 62/550,173; 31/10/2017 US 62/579,774.

(71) Depositante(es): FIVE PRIME THERAPEUTICS, INC..

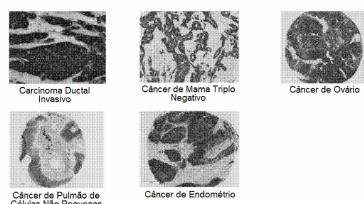
(72) Inventor(es): CHARLES KAPLAN; DERRICK HOUSER; LUIS BORGES; GLORIA BRATTICH; DAVID BELLOVIN; FELICIA KEMP; MAJID GHODDUSI; NELS P. NIELSON; KATHY MILLER; MAIKE SCHMIDT.

(86) Pedido PCT: PCT US2018047805 de 23/08/2018

(87) Publicação PCT: WO 2019/040780 de 28/02/2019

(85) Data da Fase Nacional: 20/02/2020

(57) Resumo: A presente divulgação fornece anticorpos e fragmentos de ligação ao antígeno dos mesmos que se ligam especificamente a B7-H4 humano (e opcionalmente B7-H4 de macaco cinomolgo, camundongo e/ou rato) e composições que compreendem tais anticorpos ou fragmentos de ligação ao antígeno dos mesmos. Num aspecto específico, os anticorpos ou fragmentos de ligação ao antígeno do mesmo que se ligam especificamente a B7-H4 humano aumentam a proliferação de célula T, aumentam a produção de interferon gama e/ou esgotam células que expressam B7-H4 por meio de atividade de ADCC. A presente divulgação também fornece métodos para tratar distúrbios, como câncer, administrando-se um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo que se liga especificamente a B7-H4 humano.



**“ANTICORPOS B7-H4 E MÉTODOS DE USO DOS MESMOS”**  
**REFERÊNCIA CRUZADA A PEDIDOS RELACIONADOS**

[001] Este pedido reivindica o benefício do pedido provisório nº U.S. 62/550.173, depositado em 25 de agosto de 2017, pedido provisório nº U.S. 62/579.774, depositado em 31 de outubro de 2017, pedido provisório nº U.S. 62/607.810, depositado em 19 de dezembro de 2017 e pedido provisório nº U.S. 62/656.789, depositado em 12 de abril de 2018, que estão aqui incorporados em sua totalidade a título de referência.

**REFERÊNCIA A UMA LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS ENVIADA ELETRONICAMENTE POR MEIO DE EFS-WEB**

[002] O conteúdo da listagem de sequências enviada eletronicamente (Nome: 3986.0090004\_SL\_ST25.txt; Tamanho: 331,354 bytes; Data de Criação: 3 de agosto de 2018) está aqui incorporado a título de referência em sua totalidade.

**ANTECEDENTES DA INVENÇÃO**

**CAMPO**

[003] A presente divulgação se a anticorpos que se ligam especificamente a composições B7-H4 humano que compreendem tais anticorpos, e métodos de produção e uso de anticorpos que se ligam especificamente a B7-H4.

**DESCRIÇÃO DA TÉCNICA RELACIONADA**

[004] B7-H4 (também conhecido como B7x, B7-S1 e VTCN1) é uma molécula reguladora imune que compartilha homologia com outros membros da família B7, incluindo PD-L1. O mesmo é uma proteína transmembranar do tipo I compreendida tanto de ectodomínios IgV como IgC. Embora a expressão de B7-H4 em tecidos saudáveis seja relativamente limitada no nível de proteína, B7-H4 é expresso em vários tumores sólidos, tais como carcinomas ginecológicos da mama, ovário e endométrio. A expressão de B7-H4 em tumores tende a se correlacionar com o prognóstico insatisfatório. O receptor para B7-H4 é desconhecido, porém, acredita-se que seja expresso em células T. Acredita-se que o B7-H4 iniba diretamente a atividade da célula T.

[005] Dada a expressão e a função de B7-H4, são fornecidos no presente documento anticorpos que se ligam especificamente ao B7-H4 e o uso destes para modular a atividade de B7-H4, incluindo, por exemplo, no tratamento de câncer.

## SUMÁRIO

[006] É fornecido no presente documento um anticorpo isolado ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo que se liga especificamente a B7-H4 humano, que compreende sequências de região determinante de complementaridade (CDR) 1 de região variável de cadeia pesada (VH), CDR2 de VH, CDR3 de VH e região variável de cadeia leve (VL) CDR1, CDR2 e CDR3 selecionadas do grupo que consiste em: SEQ ID NOs:5-10, respectivamente; SEQ ID NOs:15-20, respectivamente; SEQ ID NOs:25-30, respectivamente; SEQ ID NOs:35-40, respectivamente; SEQ ID NOs:458-463, respectivamente; SEQ ID NOs:45-50, respectivamente; SEQ ID NOs:55-60, respectivamente; SEQ ID NOs:65-70, respectivamente; SEQ ID NOs:75-80, respectivamente; SEQ ID NOs:85-90, respectivamente; SEQ ID NOs:95-100, respectivamente; SEQ ID NOs:105-110, respectivamente; SEQ ID NOs:115-120, respectivamente; SEQ ID NOs:125-130, respectivamente; SEQ ID NOs:135-140, respectivamente; SEQ ID NOs:145-150, respectivamente; SEQ ID NOs:155-160, respectivamente; SEQ ID NOs:165-170, respectivamente; SEQ ID NOs:175-180, respectivamente; SEQ ID NOs:185-190, respectivamente; e SEQ ID NOs:195-200, respectivamente.

[007] Numa modalidade, o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo compreende uma VH que compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:11, 21, 31, 41, 464, 51, 61, 71, 81, 91, 101, 111, 121, 131, 141, 151, 161, 171, 181, 191, ou 201.

[008] Numa modalidade, o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo compreende uma VL que compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:12, 22, 32, 42, 52, 62, 72, 82, 92, 102, 112, 122, 132, 142, 152, 162, 172, 182, 192 ou 202.

[009] Numa modalidade, o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo compreende uma região variável de cadeia pesada e uma região variável de cadeia leve, em que a região variável de cadeia pesada compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:11, 21, 31, 41, 464, 51, 61, 71, 81, 91, 101, 111, 121, 131, 141, 151, 161, 171, 181, 191 ou 201.

[010] É fornecido também no presente documento um anticorpo isolado ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo que se liga especificamente a B7-H4

humano, em que o anticorpo comprehende uma região variável de cadeia pesada e uma região variável de cadeia leve, em que a região variável de cadeia leve comprehende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:12, 22, 32, 42, 52, 62, 72, 82, 92, 102, 112, 122, 132, 142, 152, 162, 172, 182, 192 ou 202.

[011] É fornecido também no presente documento um anticorpo isolado ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo que se liga especificamente a B7-H4 humano, que comprehende uma região variável de cadeia pesada e uma região variável de cadeia leve que comprehende as sequências de aminoácidos das: SEQ ID Nos:11 e 12, respectivamente; SEQ ID NOs:21 e 22, respectivamente; SEQ ID NOs:31 e 32, respectivamente; SEQ ID NOs:41 e 42, respectivamente; SEQ ID NOs:464 e 42, respectivamente, SEQ ID NOs:51 e 52, respectivamente; SEQ ID NOs:61 e 62, respectivamente; SEQ ID NOs:71 e 72, respectivamente; SEQ ID NOs:81 e 82, respectivamente; SEQ ID NOs:91 e 92, respectivamente; SEQ ID NOs:101 e 102, respectivamente; SEQ ID NOs:111 e 112, respectivamente; SEQ ID NOs:121 e 122, respectivamente; SEQ ID NOs:131 e 132, respectivamente; SEQ ID NOs:141 e 142, respectivamente; SEQ ID NOs:151 e 152, respectivamente; SEQ ID NOs:161 e 162, respectivamente; SEQ ID NOs:171 e 172, respectivamente; SEQ ID NOs:181 e 182, respectivamente; SEQ ID NOs:191 e 192, respectivamente; ou SEQ ID NOs:201 e 202, respectivamente.

[012] Numa modalidade, o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo comprehende ainda uma região constante de cadeia pesada. Numa modalidade, a região constante de cadeia pesada é selecionada do grupo que consiste em regiões constantes de cadeia pesada de imunoglobulinas humanas IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub>, IgG<sub>4</sub>, IgA<sub>1</sub> e IgA<sub>2</sub>.

[013] Numa modalidade, o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno comprehende ainda uma região constante de cadeia leve. Numa modalidade, a região constante de cadeia leve é selecionada do grupo que consiste em regiões constantes de cadeia leve de imunoglobulinas humanas IgGκ e IgGλ.

[014] Numa modalidade, o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno comprehende ainda uma região constante de cadeia pesada e uma região constante de cadeia leve, em que a região constante de cadeia pesada é uma região constante de cadeia pesada IgG<sub>1</sub> humana, e em que a região constante de cadeia

leve é uma região constante de cadeia leve IgGκ humana.

[015] Numa modalidade, o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo compreende uma cadeia pesada que compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:13, 23, 33, 43, 469, 53, 63, 73, 83, 93, 103, 113, 123, 133, 143, 153, 163, 173, 183, 193 ou 203.

[016] Numa modalidade, o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo compreende uma cadeia leve que compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:14, 24, 34, 44, 54, 64, 74, 84, 94, 104, 114, 124, 134, 144, 154, 164, 174, 184, 194 ou 204.

[017] Numa modalidade, o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo compreende uma cadeia pesada e uma cadeia leve que compreendem as sequências de aminoácidos das: SEQ ID NOs:13 e 14, respectivamente; SEQ ID NOs:23 e 24, respectivamente; SEQ ID NOs:33 e 34, respectivamente; SEQ ID NOs:43 e 44, respectivamente; SEQ ID NOs:469 e 44, respectivamente; SEQ ID NOs:53 e 54, respectivamente; SEQ ID NOs:63 e 64, respectivamente; SEQ ID NOs:73 e 74, respectivamente; SEQ ID NOs:83 e 84, respectivamente; SEQ ID NOs:93 e 94, respectivamente; SEQ ID NOs:103 e 104, respectivamente; SEQ ID NOs:113 e 114, respectivamente; SEQ ID NOs:123 e 124, respectivamente; SEQ ID NOs:133 e 134, respectivamente; SEQ ID NOs:143 e 144, respectivamente; SEQ ID NOs:153 e 154, respectivamente; SEQ ID NOs:163 e 164, respectivamente; SEQ ID NOs:173 e 174, respectivamente; SEQ ID NOs:183 e 184, respectivamente; SEQ ID NOs:193 e 194, respectivamente; ou SEQ ID NOs:203 e 204, respectivamente.

[018] É fornecido também no presente documento um anticorpo isolado ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo que se liga especificamente a B7-H4 humano, em que o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo compreende a CDR1 de VH, CDR2 de VH, CDR3 de VH, CDR1 de VL, CDR2 de VL e CDR3 de VL de um anticorpo selecionado do grupo que consiste em 15461, 20500, 20501, 20502, 20502.1, 22208, 15462, 22213, 15465, 20506, 15483, 20513, 22216, 15489, 20516, 15472, 15503, 15495, 15478, 15441 e 20496. Numa modalidade, as CDRs são CDRs definidas por Kabat, as CDRs definidas por Chothia ou as CDRs definidas por AbM.

[019] É fornecido também no presente documento um anticorpo isolado ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo que se liga especificamente a B7-H4 humano, que compreende as sequências de região determinante de complementaridade (CDR) 1 de região variável de cadeia pesada (VH), CDR2 de VH, CDR3 de VH e de região variável de cadeia leve (VL) CDR1, CDR2 e CDR3 das SEQ ID NOs:458-463, respectivamente. Numa modalidade, (i) o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo compreende uma região de cadeia pesada variável que compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:464 e uma região de cadeia leve variável que compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:42 ou (ii) o anticorpo compreende uma cadeia pesada que compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:469 e uma cadeia leve que compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:44.

[020] É fornecido também no presente documento um anticorpo isolado ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo que se liga especificamente a B7-H4 humano, que compreende as sequências de região determinante de complementaridade (CDR) 1 de região variável de cadeia pesada (VH), CDR2 de VH, CDR3 de VH e de região variável de cadeia leve (VL) CDR1, CDR2 e CDR3 das SEQ ID NOs:35-40, respectivamente. Numa modalidade, (i) o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo compreende uma região de cadeia pesada variável que compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:41 e uma região de cadeia leve variável que compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:42 ou (ii) o anticorpo compreende uma cadeia pesada que compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:43 e uma cadeia leve que compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:44.

[021] É fornecido também no presente documento um anticorpo isolado ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo que se liga especificamente a B7-H4 humano, que compreende as sequências de região determinante de complementaridade (CDR) 1 de região variável de cadeia pesada (VH), CDR2 de VH, CDR3 de VH e de região variável de cadeia leve (VL) CDR1, CDR2 e CDR3 das SEQ ID NOs:65-70, respectivamente. Numa modalidade, (i) o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo compreende uma região de cadeia pesada variável que compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:71 e

uma região de cadeia leve variável que comprehende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:72 ou (ii) em que o anticorpo comprehende uma cadeia pesada que comprehende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:73 e uma cadeia leve que comprehende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:74.

[022] É fornecido também no presente documento um anticorpo isolado ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo que se liga ao mesmo epítopo do B7-H4 humano que o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 20. Numa modalidade, o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo se liga ao mesmo epítopo do B7-H4 humano, conforme determinado por SPR.

[023] Numa modalidade, o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo é um anticorpo humano ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo. Numa modalidade, o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo é um anticorpo murino, humanizado ou quimérico ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo.

[024] Numa modalidade, o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo induz a proliferação de células T. Numa modalidade, o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno aumenta a proliferação de células T em pelo menos 21% em comparação com o tratamento com um anticorpo de controle. Numa modalidade, o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno aumenta a proliferação de células T em cerca de 5% a cerca de 35% em comparação com o tratamento com um anticorpo de controle. Numa modalidade, o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo induz a proliferação de células T CD4+. Numa modalidade, o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo aumenta a proliferação de células T CD4+ em pelo menos 9% em comparação com o tratamento com um anticorpo de controle. Numa modalidade, o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo aumenta a proliferação de células T CD4+ em cerca de 5% a cerca de 15% em comparação com o tratamento com um anticorpo de controle. Numa modalidade, o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo induz a proliferação de células T CD8+. Numa modalidade, o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo aumenta a proliferação de células T CD8+ em pelo menos 11% em

comparação com o tratamento com um anticorpo de controle. Numa modalidade, o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo aumenta a proliferação de células T CD8+ em cerca de 5% a cerca de 15% em comparação com o tratamento com um anticorpo de controle.

[025] Numa modalidade, o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo induz a produção de interferon gama (IFN $\gamma$ ). Numa modalidade, o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo é capaz de aumentar a produção de IFN $\gamma$  em pelo menos 2 vezes, pelo menos 3 vezes, pelo menos 4 vezes, e pelo menos 5 vezes, pelo menos 6 vezes, pelo menos 7 vezes, pelo menos 8 vezes, cerca de 2 vezes a cerca de 10 vezes, ou cerca de 3 vezes a cerca de 10 vezes.

[026] Numa modalidade, o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo é capaz de induzir a citotoxicidade mediada por célula dependente de anticorpo (ADCC) numa célula que expressa B7-H4. Numa modalidade, o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo induz a lise específica em pelo menos 20%, pelo menos 30%, pelo menos 40%, cerca de 20% a cerca de 50%, ou cerca de 30% a cerca de 50% das células que expressam B7-H4.

[027] Numa modalidade, o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo inibe o crescimento de tumor num modelo de carcinoma colorretal CT26 murino, um modelo de 4T1 carcinoma de mama murino, ou um modelo B16-moB7-H4/H3 de linhagem de célula de melanoma. Numa modalidade, o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo reduz o crescimento de tumor em pelo menos 25%, pelo menos 30%, pelo menos 40%, pelo menos 45%, ou pelo menos 50% em comparação com o tratamento com um anticorpo de controle.

[028] Numa modalidade, a indução da proliferação de células T, a indução da proliferação de células T CD4+, a indução da proliferação de células T CD8+, a indução da produção de IFN $\gamma$ , a atividade de ADCC e/ou a inibição do crescimento de tumor é dependente de dose.

[029] Numa modalidade, o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo se liga a B7-H4 de macaco cinomolgo. Numa modalidade, o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo se liga a B7-H4 de rato. Numa modalidade, o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo se liga a

B7-H4 de camundongo. Numa modalidade, o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo se liga a B7-H4 humano, B7-H4 de macaco cinomolgo, B7-H4 de rato e B7-H4 de camundongo.

[030] Numa modalidade, o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo se liga ao domínio IgV de B7-H4 humano.

[031] Numa modalidade, o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo é afucosilado.

[032] Numa modalidade, o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo é um anticorpo de comprimento total. Numa modalidade, o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo é um fragmento de ligação ao antígeno. Numa modalidade, o fragmento de ligação ao antígeno comprehende um Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fv de cadeia única (scFv), Fv ligado por dissulfeto, domínio V-NAR, IgNar, intracorpo, IgGΔCH2, minicorpo, F(ab')<sub>3</sub>, tetracorpo, triacorpo, diacorpo, anticorpo de domínio único, DVD-Ig, Fcab, mAb<sup>2</sup>, (scFv)<sub>2</sub> ou scFv-Fc.

[033] Numa modalidade, o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo comprehende ainda uma identificação detectável.

[034] É fornecido também no presente documento um polinucleotídeo isolado que comprehende uma molécula de ácido nucleico que codifica a região variável de cadeia pesada ou a cadeia pesada de um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo fornecido no presente documento. Numa modalidade, a molécula de ácido nucleico codifica a VH da SEQ ID NO:11, 21, 31, 41, 464, 51, 61, 71, 81, 91, 101, 111, 121, 131, 141, 151, 161, 171, 181, 191 ou 201 ou a cadeia pesada da SEQ ID NO:13, 23, 33, 43, 469, 53, 63, 73, 83, 93, 103, 113, 123, 133, 143, 153, 163, 173, 183, 193 ou 203. Numa modalidade, a molécula de ácido nucleico comprehende a sequência da SEQ ID NO:213, 223, 233, 243, 470, 253, 263, 273, 283, 293, 303, 313, 323, 333, 343, 353, 363, 373, 383, 393 ou 403. Numa modalidade, a molécula de ácido nucleico comprehende (i) a sequência da SEQ ID NO:213, 223, 233, 243, 470, 253, 263, 273, 283, 293, 303, 313, 323, 333, 343, 353, 363, 373, 383, 393 ou 403 e (ii) a sequência da SEQ ID NO:408.

[035] É fornecido também no presente documento um polinucleotídeo isolado que comprehende uma molécula de ácido nucleico que codifica a região variável de cadeia leve ou a cadeia leve de um anticorpo ou fragmento de ligação

ao antígeno do mesmo fornecido no presente documento. Numa modalidade, a molécula de ácido nucleico codifica a VL da SEQ ID NO:12, 22, 32, 42, 52, 62, 72, 82, 92, 102, 112, 122, 132, 142, 152, 162, 172, 182, 192 ou 202 ou a cadeia leve da SEQ ID NO:14, 24, 34, 44, 54, 64, 74, 84, 94, 104, 114, 124, 134, 144, 154, 164, 174, 184, 194 ou 204. Numa modalidade, a molécula de ácido nucleico compreende a sequência da SEQ ID NO:214, 224, 234, 244, 254, 264, 274, 284, 294, 304, 314, 324, 334, 344, 354, 364, 374, 384, 394 ou 404. Numa modalidade, a molécula de ácido nucleico compreende (i) a sequência da SEQ ID NO:214, 224, 234, 244, 254, 264, 274, 284, 294, 304, 314, 324, 334, 344, 354, 364, 374, 384, 394 ou 404 e (ii) a sequência da SEQ ID NO:406.

[036] É fornecido também no presente documento um polinucleotídeo isolado que compreende uma molécula de ácido nucleico que codifica a região variável de cadeia pesada ou cadeia pesada de um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno fornecido no presente documento e a região variável de cadeia leve ou cadeia leve do anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo.

[037] É fornecido também no presente documento um vetor isolado que compreende um polinucleotídeo fornecido no presente documento.

[038] É fornecida também no presente documento uma célula hospedeira que compreende um polinucleotídeo fornecido no presente documento, um vetor fornecido no presente documento, um primeiro vetor que compreende um polinucleotídeo fornecido no presente documento (por exemplo, um polinucleotídeo que compreende uma cadeia pesada variável ou ácido nucleico que codifica cadeia pesada) e um segundo vetor que compreende outro polinucleotídeo fornecido no presente documento (por exemplo, um polinucleotídeo que compreende cadeia leve variável ou ácido nucleico que codifica cadeia leve). Numa modalidade, a célula hospedeira é uma célula selecionada do grupo que consiste em *E. coli*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Streptomyces*, levedura, CHO, YB/20, NS0, PER-C6, HEK-293T, NIH-3T3, HeLa, BHK, Hep G2, SP2/0, R1.1, B-W, L-M, COS 1, COS 7, BSC1, BSC40, célula BMT10, célula vegetal, célula de inseto e célula humana em cultura de tecido. Numa modalidade, a célula hospedeira é uma célula CHO. Numa modalidade, a célula hospedeira (por exemplo, uma célula hospedeira de mamífero, tal como uma célula CHO) não tem um gene alfa-1,6-fucosiltransferase (FUT8)

funcional.

[039] É fornecido também no presente documento um método (por exemplo, um método *in vitro*) de produção de um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo que se liga a B7-H4 humano que compreende cultivar uma célula hospedeira fornecida no presente documento, de modo que a molécula de ácido nucleico seja expressada e o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo seja produzido.

[040] É fornecido também no presente documento um anticorpo isolado ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo que se liga especificamente a B7-H4 humano e é codificado por um polinucleotídeo fornecido no presente documento.

[041] É fornecida também no presente documento uma composição farmacêutica que compreende um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo fornecido no presente documento, um polinucleotídeo fornecido no presente documento, um vetor fornecido no presente documento, ou uma célula hospedeira fornecida no presente documento; e um excipiente farmaceuticamente aceitável.

[042] É fornecida também no presente documento uma composição farmacêutica que compreende (i) anticorpos ou fragmentos de ligação ao antígeno fornecidos no presente documento e (ii) um excipiente farmaceuticamente aceitável, em que pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98% ou pelo menos 99% dos anticorpos ou fragmentos de ligação ao antígeno dos mesmos na composição são afucosilados.

[043] É fornecida também no presente documento uma composição farmacêutica que compreende (i) anticorpos ou fragmentos de ligação ao antígeno fornecidos no presente documento e (ii) um excipiente farmaceuticamente aceitável, em que pelo menos 95% dos anticorpos ou fragmentos de ligação ao antígeno dos mesmos na composição são afucosilados.

[044] É fornecida também no presente documento uma composição farmacêutica que compreende (i) anticorpos ou fragmentos de ligação ao antígeno dos mesmos que se ligam especificamente a B7-H4 humano e compreendem sequências de região determinante de complementaridade (CDR) 1 de região

variável de cadeia pesada (VH), CDR2 de VH, CDR3 de VH e região variável de cadeia leve (VL) CDR1, CDR2 e CDR3 das SEQ ID NOs:458-463, respectivamente e (ii) um excipiente farmaceuticamente aceitável, em que pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98% ou pelo menos 99% dos anticorpos ou fragmentos de ligação ao antígeno dos mesmos na composição são afucosilados. Numa modalidade, (i) o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo compreende uma região de cadeia pesada variável que compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:464 e uma região de cadeia leve variável que compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:42 ou (ii) o anticorpo compreende uma cadeia pesada que compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:469 e uma cadeia leve que compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:44.

[045] É fornecida também no presente documento uma composição farmacêutica que compreende (i) anticorpos ou fragmentos de ligação ao antígeno dos mesmos que se ligam especificamente a B7-H4 humano e compreendem as sequências de região determinante de complementaridade (CDR) 1 de região variável de cadeia pesada (VH), CDR2 de VH, CDR3 de VH e região variável de cadeia leve (VL) CDR1, CDR2 e CDR3 das SEQ ID NOs: 458-463, respectivamente e (ii) um excipiente farmaceuticamente aceitável, em que pelo menos 95% dos anticorpos ou fragmentos de ligação ao antígeno dos mesmos na composição são afucosilados. Numa modalidade, (i) o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo compreende uma região de cadeia pesada variável que compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 464 e uma região de cadeia leve variável que compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:42 ou (ii) o anticorpo compreende uma cadeia pesada que compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 469 e uma cadeia leve que compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:44.

[046] É fornecida também no presente documento uma composição farmacêutica que compreende (i) anticorpos ou fragmentos de ligação ao antígeno dos mesmos que se ligam especificamente a B7-H4 humano e compreendem sequências de região determinante de complementaridade (CDR) 1 de região variável de cadeia pesada (VH), CDR2 de VH, CDR3 de VH e região variável de

cadeia leve (VL) CDR1, CDR2 e CDR3 das SEQ ID NOs:35-40, respectivamente e (ii) um excipiente farmaceuticamente aceitável, em que pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98% ou pelo menos 99% dos anticorpos ou fragmentos de ligação ao antígeno dos mesmos na composição são afucosilados. Numa modalidade, (i) o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo compreende uma região de cadeia pesada variável que compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:41 e uma região de cadeia leve variável que compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:42 ou (ii) o anticorpo compreende uma cadeia pesada que compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:43 e uma cadeia leve que compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:44.

[047] É fornecida também no presente documento uma composição farmacêutica que compreende (i) anticorpos ou fragmentos de ligação ao antígeno dos mesmos que se ligam especificamente a B7-H4 humano e compreendem as sequências de região determinante de complementaridade (CDR) 1 de região variável de cadeia pesada (VH), CDR2 de VH, CDR3 de VH e região variável de cadeia leve (VL) CDR1, CDR2 e CDR3 das SEQ ID NOs:35-40, respectivamente e (ii) um excipiente farmaceuticamente aceitável, em que pelo menos 95% dos anticorpos ou fragmentos de ligação ao antígeno dos mesmos na composição são afucosilados. Numa modalidade, (i) o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo compreende uma região de cadeia pesada variável que compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:41 e uma região de cadeia leve variável que compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:42 ou (ii) o anticorpo compreende uma cadeia pesada que compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:43 e uma cadeia leve que compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:44.

[048] É fornecida também no presente documento uma composição farmacêutica que compreende (i) anticorpos ou fragmentos de ligação ao antígeno dos mesmos que se ligam especificamente a B7-H4 humano e compreendem as sequências de região determinante de complementaridade (CDR) 1 de região variável de cadeia pesada (VH), CDR2 de VH, CDR3 de VH e região variável de cadeia leve (VL) CDR1, CDR2 e CDR3 das SEQ ID NOs:65-70, respectivamente e

(ii) um excipiente farmaceuticamente aceitável, em que pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98% ou pelo menos 99% dos anticorpos ou fragmentos de ligação ao antígeno dos mesmos na composição são afucosilados. Numa modalidade, (i) o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo compreende uma região de cadeia pesada variável que compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:71 e uma região de cadeia leve variável que compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:72 ou (ii) em que o anticorpo compreende uma cadeia pesada que compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:73 e uma cadeia leve que compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:74.

[049] É fornecida também no presente documento uma composição farmacêutica que compreende (i) anticorpos ou fragmentos de ligação ao antígeno dos mesmos que se ligam especificamente a B7-H4 humano e compreendem as sequências de região determinante de complementaridade (CDR) 1 de região variável de cadeia pesada (VH), CDR2 de VH, CDR3 de VH e região variável de cadeia leve (VL) CDR1, CDR2 e CDR3 das SEQ ID NOs:65-70, respectivamente e (ii) um excipiente farmaceuticamente aceitável, em que pelo menos 95% dos anticorpos ou fragmentos de ligação ao antígeno dos mesmos na composição são afucosilados. Numa modalidade, (i) o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo compreende uma região de cadeia pesada variável que compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:71 e uma região de cadeia leve variável que compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:72 ou (ii) em que o anticorpo compreende uma cadeia pesada que compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:73 e uma cadeia leve que compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:74.

[050] Numa modalidade, a fucosilação é indetectável na composição.

[051] É fornecido também no presente documento um método para induzir a proliferação de células T que compreende colocar uma célula T em contato com um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo fornecido no presente documento, um polinucleotídeo fornecido no presente documento, um vetor fornecido no presente documento, uma célula hospedeira fornecida no presente documento ou uma composição farmacêutica fornecida no presente documento.

Numa modalidade, a proliferação de células T é reduzida em pelo menos 30%, pelo menos 40%, pelo menos 50%, pelo menos 60%, pelo menos 70% ou pelo menos 80% (por exemplo, em comparação com o tratamento com um anticorpo de controle).

[052] É fornecido também no presente documento um método para induzir a proliferação de células T CD4+ que compreende colocar uma célula T CD4+ em contato com um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo fornecido no presente documento, um polinucleotídeo fornecido no presente documento, um vetor fornecido no presente documento, uma célula hospedeira fornecida no presente documento ou uma composição farmacêutica fornecida no presente documento. Numa modalidade, a proliferação de células T CD4+ é reduzida em pelo menos 30%, pelo menos 40%, pelo menos 50%, pelo menos 60%, pelo menos 70% ou pelo menos 80% (por exemplo, em comparação com o tratamento com um anticorpo de controle).

[053] É fornecido também no presente documento um método para induzir a proliferação de células T CD8+ que compreende colocar uma célula T CD8+ em contato com um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo fornecido no presente documento, um polinucleotídeo fornecido no presente documento, um vetor fornecido no presente documento, uma célula hospedeira fornecida no presente documento ou uma composição farmacêutica fornecida no presente documento. Numa modalidade, a proliferação de células T CD8+ é reduzida em pelo menos 30%, pelo menos 40%, pelo menos 50%, pelo menos 60%, pelo menos 70% ou pelo menos 80% (por exemplo, em comparação com o tratamento com um anticorpo de controle).

[054] É fornecido também no presente documento um método para induzir a produção de interferon gama que compreende colocar uma célula T em contato com um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo fornecido no presente documento, um polinucleotídeo fornecido no presente documento, um vetor fornecido no presente documento, uma célula hospedeira fornecida no presente documento ou uma composição farmacêutica fornecida no presente documento. Numa modalidade, a produção de interferon gama é aumentada em pelo menos 30%, pelo menos 40%, pelo menos 50%, pelo menos 60%, pelo menos

70% ou pelo menos 80% (por exemplo, em comparação com o tratamento com um anticorpo de controle).

[055] É fornecido também no presente documento um método para exterminar uma célula que expressa B7-H4 que compreende colocar a célula em contato com um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo fornecido no presente documento, um polinucleotídeo fornecido no presente documento, um vetor fornecido no presente documento, uma célula hospedeira fornecida no presente documento ou uma composição farmacêutica fornecida no presente documento.

[056] É fornecido também no presente documento um método para esgotar células que expressam B7-H4 de uma população de células que compreende colocar a população de células em contato com um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo fornecido no presente documento, um polinucleotídeo fornecido no presente documento, um vetor fornecido no presente documento, uma célula hospedeira fornecida no presente documento ou uma composição farmacêutica fornecida no presente documento.

[057] Numa modalidade, o extermínio ou esgotamento ocorre por meio de ADCC.

[058] Numa modalidade, o contato é *in vitro*. Numa modalidade, o contato é num indivíduo.

[059] É fornecido também no presente documento um método de tratamento de câncer num indivíduo, sendo que o método compreende administrar ao indivíduo uma quantidade eficaz de um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo fornecido no presente documento, um polinucleotídeo fornecido no presente documento, um vetor fornecido no presente documento, uma célula hospedeira fornecida no presente documento ou uma composição farmacêutica fornecida no presente documento. Numa modalidade, o câncer é selecionado do grupo que consiste em câncer de mama, tal como câncer de mama triplo negativo ou carcinoma ductal invasivo, carcinoma endometrial, câncer de ovário, câncer de pulmão de células não pequenas, câncer pancreático, câncer de tireoide, câncer de rim e câncer de bexiga. Numa modalidade, o câncer de mama é câncer de mama triplo negativo ou em que o câncer de pulmão de células não

pequenas é carcinoma de célula escamosa. Numa modalidade, o câncer de pulmão de células não pequenas é um adenocarcinoma. Numa modalidade, o câncer é selecionado do grupo que consiste em câncer de cabeça e pescoço, câncer de pulmão de célula pequena, câncer gástrico e melanoma. Numa modalidade, o câncer de ovário é um adenocarcinoma seroso. Numa modalidade, o câncer de mama é um adenocarcinoma ductal.

[060] Numa modalidade, o câncer é um respondente inadequado de inibidor PD-1 e/ou respondente inadequado de inibidor PD-L1. Numa modalidade, o câncer expressa um baixo nível de PD-L1.

[061] Numa modalidade, o indivíduo é um ser humano.

[062] É fornecido também no presente documento um método para detectar B7-H4 numa amostra que compreende colocar a referida amostra em contato com um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo fornecido no presente documento. Numa modalidade, a amostra é obtida a partir de um câncer num indivíduo humano.

[063] É fornecido também no presente documento um kit que compreende um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo fornecido no presente documento, um polinucleotídeo fornecido no presente documento, um vetor fornecido no presente documento, uma célula hospedeira fornecida no presente documento ou uma composição farmacêutica fornecida no presente documento e a) um reagente de detecção, b) um antígeno de B7-H4, c) um aviso que reflete a aprovação para uso ou venda para administração humana, ou d) uma combinação dos mesmos.

[064] É fornecido também no presente documento um anticorpo isolado ou fragmento de ligação ao antígeno, em que o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo inibe a atividade de bloqueio de ponto de verificação de célula T de B7-H4. Numa modalidade, a atividade de bloqueio de ponto de verificação de célula T é medida por meio de um aumento na produção de IL-2 em relação às células de controle.

[065] É fornecida também no presente documento uma composição farmacêutica que compreende (i) anticorpos ou fragmentos de ligação ao antígeno e (ii) um excipiente farmaceuticamente aceitável, em que os anticorpos ou

fragmentos de ligação ao antígeno inibem a atividade de bloqueio de ponto de verificação de célula T de B7-H4. Numa modalidade, a atividade de bloqueio de ponto de verificação de célula T é medida por meio de um aumento na produção de IL-2 em relação às células de controle.

#### BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

[066] A **Figura 1A** mostra a expressão de B7-H4 numa variedade de tecidos tumorais. (Consulte o Exemplo 1).

[067] A **Figura 1B** mostra a prevalência de B7-H4 em vários tipos de tumor por IHC. (Consulte o Exemplo 1).

[068] A **Figura 2A** mostra a ligação de anticorpos B7-H4 a células HEK293T que expressam B7-H4 humano, de macaco cinomolgo ou de camundongo. (Consulte o Exemplo 6).

[069] A **Figura 2B** mostra a ligação de anticorpos B7-H4 a células SK-BR-3 e a células HEK293T que expressam B7-H4 de camundongo, de macaco cinomolgo e de rato. (Consulte o Exemplo 6).

[070] A **Figura 3A** mostra o efeito de anticorpos B7-H4 na proliferação de células T CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> ou total. (Consulte o Exemplo 7).

[071] A **Figura 3B** mostra o efeito de anticorpos B7-H4 na produção de interferon gama (IFNγ). (Consulte o Exemplo 7).

[072] A **Figura 3C** mostra o efeito de anticorpos B7-H4 na proliferação de células T CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> ou total e na produção de interferon gama (IFNγ). (Consulte o Exemplo 7).

[073] A **Figura 3D** mostra o efeito de várias concentrações de anticorpos B7-H4 na produção de interferon gama (IFNγ). (Consulte o Exemplo 7).

[074] As **Figuras 4A a 4D** mostram a ligação de anticorpos fucosilados e afucosilados a B7-H4 em células SK-BR-3 (Figura 4A) e a células HEK293T que expressam B7-H4 de camundongo (Figura 4B), de macaco cinomolgo (Figura 4C) ou de rato (Figura 4D). (Consulte o Exemplo 9).

[075] As **Figuras 5A e 5B** mostram a ligação de anticorpos B7-H4 fucosilados e afucosilados (respectivamente) ao alelo V158 de receptor Fcγ humano IIIa (FcγRIIIa). (Consulte o Exemplo 10).

[076] A **Figura 6A** mostra a atividade de bloqueio de ponto de verificação

de célula T de anticorpos B7-H4 fucosilados e afucosilados. (Consulte o Exemplo 11).

[077] A **Figura 6B** mostra a atividade de ligante de ponto de verificação de células T de anticorpos B7-H4 afucosilados em comparação com as células tratadas com controle de isotipo conforme medida pela produção de IL-2. (Consulte o Exemplo 11).

[078] A **Figura 7** mostra a atividade de ADCC de anticorpos B7-H4 fucosilados e afucosilados contra uma linhagem celular que expressa B7-H4. (Consulte o Exemplo 12).

[079] A **Figura 8** mostra a atividade de ADCC de anticorpos B7-H4 fucosilados e afucosilados contra células com vários níveis de expressão de B7-H4. (Consulte o Exemplo 13).

[080] A **Figura 9A** mostra a eficácia antitumoral *in vivo* do anticorpo B7-H4 20502. (Consulte o Exemplo 14).

[081] A **Figura 9B** mostra a eficácia antitumoral *in vivo* do anticorpo B7-H4 22213. (Consulte o Exemplo 14).

[082] A **Figura 10** mostra a eficácia antitumoral *in vivo* de uma versão murina do anticorpo B7-H4 20502 em camundongos implantados com células 4T1 (carcinoma de mama) e B16 (melanoma). (Consulte o Exemplo 14).

[083] A **Figura 11** mostra a eficácia antitumoral *in vivo* de 20502 afucosilado num modelo de xenoenxerto de câncer de mama humano MX-1. As imagens mostram expressão de B7-H4 humano no tumor de xenoenxerto MX-1 (esquerda) e expressão murina de B7-H4 nos tumores 4T1 (direita). (Consulte o Exemplo 14).

[084] As **Figuras 12A a 12C** mostram a eficácia antitumoral *in vivo* de 20502-msIgG2a-F administrado no mesmo dia que um anticorpo anti-PD-1. (Consulte o Exemplo 15). \* indica  $p < 0,05$ ; e \*\*\*\* indica  $p < 0,0001$ .

[085] A **Figura 13** mostra que o tratamento com 20502 afucosilado (painéis inferiores) resulta em infiltração de célula NK (painéis esquerdos), infiltração de célula T (painéis centrais), e regulação crescente PD-L1 (painéis direitos) em comparação com o tratamento com um anticorpo de controle (painéis superiores). (Consulte o Exemplo 16).

[086] A **Figura 14A** mostra que o anticorpo 20502-msIgG2a-F reduz

significativamente o crescimento tumoral em células de carcinoma de mama 4T1 de uma maneira dependente de dose. (Consulte o Exemplo 17).

[087] A **Figura 14B** mostra que o anticorpo 20502-msIgG2a-F inibe significativamente o crescimento tumoral em 30 mg/kg ( $p = 0,0003$ ), 20 mg/kg ( $p = 0,0103$ ), 10 mg/kg ( $p = 0,0419$ ), 3 mg/kg ( $p = 0,0277$ ) e 1 mg/kg ( $p = 0,0333$ ) conforme avaliado por OneWay ANOVA no dia 30. (Consulte o Exemplo 17).

[088] A **Figura 15A** mostra que o anticorpo 20502-msIgG2a-F reduz significativamente o crescimento de B16 que expressa B7-H4/H3. (Consulte o Exemplo 17).

[089] A **Figura 15B** mostra que o anticorpo 20502-msIgG2a-F inibe significativamente o crescimento tumoral em 30 mg/kg ( $p = 0,0085$ ), 20 mg/kg ( $p = 0,0041$ ), 10 mg/kg ( $p = 0,0017$ ) e 3 mg/kg ( $p = 0,0420$ ) conforme avaliado por OneWay ANOVA no dia 23. (Consulte o Exemplo 17).

### **DESCRIÇÃO DETALHADA**

[090] São fornecidos no presente documento anticorpos (por exemplo, anticorpos monoclonais) e fragmentos de ligação ao antígeno dos mesmos que se ligam especificamente a B7-H4 (por exemplo, B7-H4 humano). Os anticorpos anti-B7-H4 e fragmentos de ligação ao antígeno dos mesmos podem, por exemplo, resultar na atividade de bloqueio de ponto de verificação de célula T (por exemplo, conforme medida por uma aumento no interferon gama (IFN $\gamma$ ), proliferação de células T CD4, proliferação de células T CD8 e/ou proliferação de células T total) e/ou têm citotoxicidade celular dependente de anticorpo (atividade ADCC).

[091] São fornecidos também ácidos nucleicos isolados (polinucleotídeos), tal como DNA complementar (cDNA), que codificam tais anticorpos e fragmentos de ligação ao antígeno dos mesmos. São fornecidos ainda vetores (por exemplo, vetores de expressão) e células (por exemplo, células hospedeiras) que compreendem ácidos nucleicos (polinucleotídeos) que codificam tais anticorpos e fragmentos de ligação ao antígeno dos mesmos. São fornecidos métodos para de produção de tais anticorpos e fragmentos de ligação ao antígeno dos mesmos. Em outros aspectos, são fornecidos no presente documento métodos para tratar certas condições, tal como câncer. Composições relacionadas (por exemplo, composições farmacêuticas), kits e métodos de detecção também são fornecidos.

## 1.1 TERMINOLOGIA

[092] Conforme usado no presente documento, o termo “B7-H4” se refere a polipeptídeos B7-H4 de mamífero que incluem, porém sem limitação, polipeptídeos B7-H4 nativos e isoformas de polipeptídeos B7-H4. “B7-H4” abrange polipeptídeos B7-H4 não processados de comprimento total, assim como formas de polipeptídeos B7-H4 que resultam do processamento dentro da célula. Conforme usado no presente documento, o termo “B7-H4 humano” se refere a um polipeptídeo que comprehende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:1. Um “polinucleotídeo B7-H4”, “nucleotídeo B7-H4” ou “ácido nucleico B7-H4” se refere a um polinucleotídeo que codifica B7-H4.

[093] O termo “PD-1” conforme usado no presente documento, se refere a polipeptídeos PD-1 de mamífero, que incluem, porém sem limitação, polipeptídeos PD-1 nativos e isoformas de polipeptídeos PD-1. PD-1 também é chamado de proteína de morte programada 1 ou proteína de morte celular programada 1. “PD-1” abrange polipeptídeos PD-1 não processados de comprimento total, assim como formas de polipeptídeos PD-1 que resultam do processamento na célula. Conforme usado no presente documento, o termo “PD-1 humano” se refere a um polipeptídeo que comprehende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:439: PGWFLDSPDR PWNPPTFSPA LLVVTEGDNATFTCSFSNTS ESFVLNWYRM SPSNQTDKLA AFPEDRSQPG QDCRFRVTQL PNGRDFHMSV VRARRNDSGT YLCGAISLAP KAQIKESLRA ELRVTERRAE VPTAHPSPSP RPAGQFQTLV VGVVGGLLGS LVLLVWVLAV ICSRAARGTI GARRTGQPLK EDPSAVPVFS VDYGELDFQW REKTPEPPVP CVPEQTEYAT IVFPSGMGTS SPARRGSADG PRSAQPLRPE DGHCSWPL (SEQ ID NO:439) (PD-1 humano maduro sem uma sequência de sinais). Um “polinucleotídeo PD-1”, “nucleotídeo PD-1” ou “ácido nucleico PD-1” se refere a um polinucleotídeo que codifica PD-1.

[094] O termo “anticorpo” significa uma molécula de imunoglobulina que reconhece e se liga especificamente a um alvo, tal como uma proteína, polipeptídeo, peptídeo, carboidrato, polinucleotídeo, lipídio ou combinações dos itens anteriormente mencionados através de pelo menos um sítio de reconhecimento de antígeno dentro da região variável da molécula de imunoglobulina. Conforme usado no presente documento, o termo “anticorpo”

abrange anticorpos policlonais intactos, anticorpos monoclonais intactos, anticorpos químicos, anticorpos humanizados, anticorpos humanos, proteínas de fusão que compreendem um anticorpo, e qualquer outra molécula de imunoglobulina modificada desde que os anticorpos exibam a atividade biológica desejada. Um anticorpo pode ser de qualquer uma das cinco classes principais de imunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, ou subclasses (isotipos) das mesmas (por exemplo IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2), com base na identidade de seus domínios constantes de cadeia pesada chamados de alfa, delta, épsilon, gama e mu, respectivamente. As diferentes classes de imunoglobulinas têm estruturas de subunidade diferentes e bem conhecidas e configurações tridimensionais. Os anticorpos podem ser nus ou conjugados com outras moléculas, tais como toxinas, radioisótopos, etc.

[095] O termo “fragmento de anticorpo” se refere a uma porção de um anticorpo intacto. Um “fragmento de ligação ao antígeno”, “domínio de ligação ao antígeno” ou “região de ligação ao antígeno” se refere a uma porção de um anticorpo intacto que se liga a um antígeno. Um fragmento de ligação ao antígeno pode conter as regiões determinantes antigênicas de um anticorpo intacto (por exemplo, as regiões determinantes de complementaridade (CDR)). Exemplos de fragmentos de ligação ao antígeno de anticorpos incluem, porém sem limitação fragmentos Fab, Fab', F(ab')2 e Fv, anticorpos lineares e anticorpos de cadeia única. Um fragmento de ligação ao antígeno de um anticorpo pode ser derivado de qualquer espécie animal, tais como roedores (por exemplo, camundongo, rato ou hamster) e seres humanos ou pode ser artificialmente produzido.

[096] Os termos “anticorpo anti-B7-H4”, “anticorpo B7-H4” e “anticorpo que se liga a B7-H4” se referem a um anticorpo que é capaz de se ligar a B7-H4 com afinidade suficiente de modo que o anticorpo seja útil como um agente de diagnóstico e/ou terapêutico no direcionamento de B7-H4. A extensão da ligação de um anticorpo anti-B7-H4 a uma proteína não B7-H4 não relacionada pode ser menor que cerca de 10% da ligação do anticorpo a B7-H4 conforme medida, por exemplo, por um radioimunoensaio (RIA).

[097] Os termos “anticorpo anti-PD-1”, “anticorpo PD-1” e “anticorpo que se liga a PD-1” se referem a um anticorpo que é capaz de se ligar a PD-1 com afinidade

suficiente de modo que o anticorpo seja útil como um agente de diagnóstico e/ou terapêutico no direcionamento de PD-1. A extensão da ligação de um anticorpo anti-PD-1 a uma proteína não PD-1 não relacionada pode ser menor que cerca de 10% da ligação do anticorpo a PD-1 conforme medida, por exemplo, por um radioimunoensaio (RIA).

[098] Um anticorpo “monoclonal” ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo se refere a um anticorpo homogêneo ou população de fragmentos de ligação ao antígeno envolvida no reconhecimento e ligação altamente específicos de um único determinante antigênico, ou epítopo. Isto contrasta com os anticorpos policlonais que incluem tipicamente anticorpos diferentes direcionados contra determinantes antigênicos diferentes. O termo anticorpo “monoclonal” ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo abrange tanto anticorpos monoclonais intactos como de comprimento total, assim como fragmentos de anticorpos (tais como Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fv), mutantes (scFv) de cadeia única, proteínas de fusão que compreendem uma porção de anticorpo, e qualquer outra molécula de imunoglobulina modificada que compreende um sítio de reconhecimento de antígeno. Além disto, o anticorpo “monoclonal” ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo se refere a tais anticorpos e fragmentos de ligação ao antígeno dos mesmos produzidos de inúmeras maneiras, que incluem, porém sem limitação hibridoma, seleção de fago, expressão recombinante e animais transgênicos.

[099] Conforme usado no presente documento, os termos “região variável” ou “domínio variável” são usados de forma intercambiável e são comuns na técnica. A região variável se refere tipicamente a uma porção de um anticorpo, geralmente, uma porção de uma cadeia leve ou pesada, tipicamente cerca de 110 a 120 aminoácidos amino-terminais ou 110 a 125 aminoácidos na cadeia pesada madura e cerca de 90 a 115 aminoácidos na cadeia leve madura, que diferem extensivamente na sequência entre anticorpos e são usados na ligação e especificidade de um anticorpo particular para seu antígeno particular. A variabilidade na sequência é concentrada naquelas regiões chamadas de regiões determinantes de complementaridade (CDRs) enquanto as regiões mais altamente conservadas no domínio variável são chamadas de regiões de framework (FR). Sem desejar se ater a nenhum mecanismo ou teoria particular, acredita-se que as

CDRs das cadeias leve e pesada sejam responsáveis principalmente pela interação e especificidade do anticorpo com o antígeno. Em certas modalidades, a região variável é uma região variável humana. Em certas modalidades, a região variável comprehende CDRs de roedores ou murinos e regiões de framework humanas (FRs). Em modalidades particulares, a região variável é uma região variável de primata (por exemplo, primata não humano). Em certas modalidades, a região variável comprehende CDRs de roedores ou murinos e regiões de framework (FRs) de primatas (por exemplo, primata não humano).

[0100] Os termos “VL” e “domínio VL” são usados de forma intercambiável para se referir à região variável de cadeia leve de um anticorpo.

[0101] Os termos “VH” e “domínio VH” são usados de forma intercambiável para se referir à região variável de cadeia pesada de um anticorpo.

[0102] O termo “numeração de Kabat” e similares é reconhecido na técnica e se refere a um sistema de numeração de resíduos de aminoácidos nas regiões variáveis de cadeia pesada e leve de um anticorpo ou um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo. Em certos aspectos, as CDRs podem ser determinadas de acordo com o sistema de numeração de Kabat (consulte, por exemplo, Kabat EA & Wu TT (1971) Ann NY Acad Sci 190: 382-391 e Kabat EA *et al.*, (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Quinta Edição, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242). Com o uso do sistema de numeração de Kabat, as CDRs dentro de uma molécula de cadeia pesada anticorpo estão tipicamente presentes nas posições de aminoácidos 31 a 35, que podem incluir opcionalmente um ou dois aminoácidos adicionais, após 35 (chamado no esquema de numeração de Kabat de 35A e 35B) (CDR1), posições de aminoácidos 50 a 65 (CDR2) e posições de aminoácidos 95 a 102 (CDR3). Com o uso do sistema de numeração de Kabat, as CDRs dentro de uma molécula de cadeia leve de anticorpo estão tipicamente presentes nas posições de aminoácidos 24 a 34 (CDR1), posições de aminoácidos 50 a 56 (CDR2) e posições de aminoácidos 89 a 97 (CDR3). Numa modalidade específica, as CDRs dos anticorpos descritos no presente documento foram determinadas de acordo com o esquema de numeração de Kabat.

[0103] Chothia se refere, em vez disto, à localização das alças estruturais

(Chothia e Lesk, J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987). O final da alça CDR-H1 de Chothia quando numerada com o uso da convenção de numeração de Kabat varia entre H32 e H34 dependendo do comprimento da alça (isto ocorre o esquema de numeração de Kabat coloca as inserções em H35A e H35B; se nem 35A ou 35B estiverem presentes, a alça termina em 32; se apenas 35A estiver presente, as extremidades a alça termina em 33; se tanto 35A como 35B estiverem presentes, a alça termina em 34). As regiões hipervariáveis AbM representam um compromisso entre as CDRs de Kabat e as alças estruturais de Chothia, e são usadas pelo software de modelagem de anticorpo AbM da Oxford Molecular.

Alça	Kabat	AbM	Chotia
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 (Numeração Kabat)	H26-H32..34
H1	H31-H35	H26-H35 (Numeração Chotia)	H26-H32
H2	H50-H65	H50-H58	H52-H56
H3	H95-H102	H95-H102	H95-H102

[0104] Conforme usado no presente documento, o termo “região constante” ou “domínio constante” são intercambiáveis e têm seu significado comum na técnica. A região constante é uma porção de anticorpo, por exemplo, uma porção terminal carboxila de uma cadeia leve e/ou pesada que não está diretamente envolvida na ligação de um anticorpo ao antígeno, porém que pode exibir várias funções efetoras, tal como a interação com o receptor Fc. A região constante de uma molécula de imunoglobulina tem geralmente uma sequência de aminoácidos mais conservada em relação a um domínio variável de imunoglobulina. Em certos aspectos, um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno compreende uma região constante ou porção da mesma que é suficiente para citotoxicidade mediada por célula dependente de anticorpo (ADCC).

[0105] Conforme usado no presente documento, o termo “cadeia pesada” quando usado em referência a um anticorpo pode se referir a qualquer tipo distinto, por exemplo, alfa ( $\alpha$ ), delta ( $\delta$ ), épsilon ( $\epsilon$ ), gama ( $\gamma$ ) e mu ( $\mu$ ), com base na sequência de aminoácidos do domínio constante, que dá origem a classes de IgA, IgD, IgE, IgG e IgM de anticorpos, respectivamente, incluindo subclasses de IgG, por exemplo, IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub> e IgG<sub>4</sub>. Sequências de aminoácidos de cadeia pesada são bem conhecidas na técnica. Em modalidades específicas, a cadeia pesada é uma cadeia pesada humana.

[0106] Conforme usado no presente documento, o termo “cadeia leve” quando usado em referência a um anticorpo pode se referir a qualquer tipo distinto, por exemplo, kappa ( $\kappa$ ) ou lambda ( $\lambda$ ) com base na sequência de aminoácidos dos domínio constantes. As sequências de aminoácidos de cadeia leve são bem conhecidas na técnica. Em modalidades específicas, a cadeia leve é uma cadeia leve humana.

[0107] O termo anticorpos “quiméricos” ou fragmentos de ligação ao antígeno dos mesmos se refere a anticorpos ou fragmentos de ligação ao antígeno dos mesmos em que a sequência de aminoácidos é derivada de duas ou mais espécies. Tipicamente, a região variável tanto de cadeias leves como pesadas corresponde à região variável de anticorpos ou fragmentos de ligação ao antígeno dos mesmos derivados de uma espécie de mamíferos (por exemplo, camundongo, rato, coelho, etc.) com a especificidade, afinidade e capacidade desejadas enquanto as regiões constantes são homólogas às sequências em anticorpos ou fragmentos de ligação ao antígeno dos mesmos derivados entre si (geralmente humano) para evitar provocar uma resposta imune nesta espécie.

[0108] O termo anticorpo “humanizado” ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo se refere a formas de anticorpos ou fragmentos de ligação ao antígeno que são cadeias de imunoglobulina específicas, imunoglobulinas quiméricas ou fragmentos das mesmas que contêm sequências não humanas mínimas (por exemplo, murino). Tipicamente, anticorpos humanizados ou fragmentos de ligação ao antígeno dos mesmos são imunoglobulinas humanas em que os resíduos da região determinante de complementaridade (CDR) são substituídos por resíduos da CDR de uma espécie não humana (por exemplo, camundongo, rato, coelho,

hamster) que têm a especificidade, afinidade e capacidade desejadas (“CDR enxertada”) (Jones et al., Nature 321:522-525 (1986); Riechmann et al., Nature 332:323-327 (1988); Verhoeven et al., Science 239:1534-1536 (1988)). Em alguns casos, os resíduos de região de framework Fv (FR) de uma imunoglobulina humana são substituídos pelos resíduos correspondentes num anticorpo ou fragmento de uma espécie não humana que tem a especificidade, afinidade e capacidade desejadas. O anticorpo humanizado ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo pode ser adicionalmente modificado pela substituição de resíduos adicionais na região de framework Fv e/ou dentro dos resíduos não humanos substituídos para refinar e otimizar a especificidade, afinidade e/ou capacidade de anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo. Em geral, o anticorpo humanizado ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo irá compreender substancialmente todos os pelo menos um, e tipicamente dois ou três, domínios variáveis que contêm todas ou substancialmente todas as regiões CDR que correspondem à imunoglobulina não humana, considerando que todas ou substancialmente todas as regiões FR sejam aquelas de uma sequência de consenso de imunoglobulina humana. O anticorpo humanizado ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo também pode compreender pelo menos uma porção de uma região ou domínio constante de imunoglobulina (Fc), tipicamente àquela de uma imunoglobulina humana. Exemplos de métodos usados para gerar anticorpos humanizados são descritos na patente nº U.S. 5.225.539; Roguska et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 91(3):969-973 (1994) e Roguska et al., Protein Eng. 9(10):895-904 (1996). Em algumas modalidades, um “anticorpo humanizado” é um anticorpo recondicionado.

[0109] O termo anticorpo “humano” ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo significa um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo que tem uma sequência de aminoácidos derivada de um locus de genes de imunoglobulina humana, em que tal anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno é produzido com o uso de qualquer técnica conhecida na técnica. Esta definição de um anticorpo humano ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo inclui anticorpos intactos ou de comprimento total e fragmentos dos mesmos.

[0110] Um anticorpo “afucosilado” ou fragmento de ligação ao antígeno do

mesmo ou um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo “sem fucose” se refere a um anticorpo de isotipo IgG1 ou IgG3 ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo que não tem fucose em sua glicosilação de região constante. A glicosilação de IgG1 ou IgG3 humana ocorre em Asn297 como glicosilação de oligossacarídeo complexo biantenário de núcleo fucosilado terminado com até 2 resíduos de Gal. Em algumas modalidades, um anticorpo afucosilado não tem fucose em Asn297. Estas estruturas são designadas como resíduos de glicano G0, G1 (1,6 ou 1,3) ou G2, dependendo da quantidade de resíduos de Gal terminal. Consulte, por exemplo, Raju, T. S., BioProcess Int. 1: 44-53 (2003). A glicosilação do tipo CHO de anticorpo Fc é descrita, por exemplo, em Routier, F. FL, Glycoconjugate J. 14: 201-207 (1997).

[0111] Métodos de medição de fucose incluem quaisquer métodos conhecidos na técnica. Para propósitos no presente documento, a fucose é detectada pelo método descrito no Exemplo 1 do documento WO2015/017600, que é incorporado ao presente documento a título de referência em sua totalidade. Resumidamente, a análise de glicano é realizada liberando-se glicanos do anticorpo (por exemplo, por liberação enzimática), identificando os glicanos com ácido antranílico (2-AA) e, então purificando os glicanos identificados. HPLC de fase normal com detecção fluorescente é usada para separar os glicanos e medir a quantidade relativa de cada glicano no anticorpo. Os glicanos podem ser positivamente identificados como desprovido ou incluindo fucose por espectrometria de massa. Em algumas modalidades, a fucose é indetectável numa composição que compreende uma pluralidade de anticorpos afucosilados ou fragmentos de ligação ao antígeno dos mesmos. Em algumas modalidades, um anticorpo afucosilado ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo melhorou a atividade de ADCC, que pode ser medida pelo ensaio fornecido no Exemplo 12 no presente documento. Em algumas modalidades, um anticorpo afucosilado ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo tem afinidade melhorada para RIIIA gama Fc. Em algumas modalidades, um anticorpo afucosilado ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo tem afinidade melhorada para RIIIA(V158) gama Fc. Em algumas modalidades, um anticorpo afucosilado ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo tem afinidade melhorada para RIIIA(F158) gama Fc. A

afinidade com RIIIA gama Fc ou seus alelos pode ser medida pelo ensaio fornecido no Exemplo 10 no presente documento.

[0112] “Afinidade de ligação” geralmente se refere à força da soma total de interações não covalentes entre um único sítio de ligação de uma molécula (por exemplo, um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo) e seu parceiro de ligação (por exemplo, um antígeno). A menos que indicado de outro modo, conforme usado no presente documento, “afinidade de ligação” se refere à afinidade de ligação intrínseca que reflete uma interação 1:1 entre membros de um par de ligação (por exemplo, anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo e antígeno). A afinidade de uma molécula X por seu parceiro Y pode ser, de modo geral, representada pela constante de dissociação ( $K_D$ ). A afinidade pode ser medida e/ou expressa de várias formas conhecidas na técnica, incluindo, porém sem limitação, constante de dissociação de equilíbrio ( $K_D$ ), e constante de dissociação de equilíbrio ( $K_A$ ). A  $K_D$  é calculada a partir do quociente de  $k_{off}/k_{on}$ , considerando que  $K_A$  seja calculado a partir do quociente de  $k_{on}/k_{off}$ .  $k_{on}$  se refere à constante de taxa de associação, por exemplo, de um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo a um antígeno, e  $k_{off}$  se refere à dissociação, por exemplo, de um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo de um antígeno. A  $k_{on}$  e a  $k_{off}$  podem ser determinadas por técnicas conhecidas por uma pessoa de habilidade comum na técnica, tal como BIACore® ou KinExA.

[0113] Conforme usado no presente documento, um “epítopo” é um termo na técnica e se refere a uma região localizada de um antígeno ao qual um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo pode se ligar especificamente. Um epítopo pode ser, por exemplo, aminoácidos contíguos de um polipeptídeo (epítopo linear ou contíguo) ou um epítopo pode, por exemplo, se reunir a partir de duas ou mais regiões não contíguas de um polipeptídeo ou polipeptídeos (epítopo conformacional, não linear, descontínuo ou não contíguo). Em certas modalidades, o epítopo ao qual um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo se liga pode ser determinado por, por exemplo, espectroscopia de RMN, estudo de cristalografia por difração de raios X, ensaios ELISA, troca de hidrogênio/deutério acoplada à espectrometria de massa (por exemplo, espectrometria de massa por eletroaspersão com cromatografia líquida), ensaios de varredura de oligopeptídeo

baseados em arranjo, e/ou mapeamento de mutagênese (por exemplo, mapeamento de mutagênese sítio dirigida). Para cristalografia de raios X, a cristalização pode ser realizada com o uso de quaisquer métodos conhecidos na técnica (por exemplo, Giegé R *et al.*, (1994) Acta Crystallogr D Biol Crystallogr 50(Pt 4): 339-350; McPherson A (1990) Eur J Biochem 189: 1-23; Chayen NE (1997) Structure 5: 1269-1274; McPherson A (1976) J Biol Chem 251: 6300-6303). Anticorpo/fragmento de ligação ao antígeno do mesmo: cristais de antígeno podem ser estudados com o uso de técnicas de difração de raios X bem conhecidas e podem ser refinadas com o uso de software de computador, tal como X-PLOR (Yale University, 1992, distribuído por Molecular Simulations, Inc.; consulte, por exemplo, Meth Enzymol (1985) volumes 114 & 115, eds Wyckoff HW *et al.*; U.S. 2004/0014194), e 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). Estudos de mapeamento de mutagênese podem ser realizados com o uso de qualquer método conhecido por uma pessoa versada na técnica. Consulte, por exemplo, Champe M *et al.*, (1995) J Biol Chem 270: 1388-1394 e Cunningham BC & Wells JA (1989) Science 244: 1081-1085 para uma descrição de técnicas de mutagênese, incluindo técnicas de mutagênese por varredura de alanina.

[0114] Um anticorpo B7-H4 que “se liga ao mesmo epítopo” que um anticorpo de referência B7-H4 se refere a um anticorpo que se liga aos mesmos resíduos de aminoácidos B7-H4 que o anticorpo de referência B7-H4. A capacidade de um anticorpo B7-H4 se ligar ao mesmo epítopo que um anticorpo B7-4 de referência é determinada por um ensaio de troca de hidrogênio/deutério (consulte Coales et al. Rapid Commun. Mass Spectrom. 2009; 23: 639-647).

[0115] Conforme usado no presente documento, os termos “se liga imunoespecificamente”, “reconhece imunoespecificamente”, “se liga especificamente” e “reconhece especificamente” são termos análogos ao contexto de anticorpos ou fragmentos de ligação ao antígeno dos mesmos. Estes termos indicam que o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo se liga a um epítopo por meio de seu domínio de ligação ao antígeno e que a ligação envolve alguma complementaridade entre o domínio de ligação ao antígeno e o epítopo.

Consequentemente, um anticorpo que “se liga especificamente” a B7-H4 humano (SEQ ID NO:1) também pode se ligar a B7-H4 de outras espécies (por exemplo, B7-H4 de macaco cinomolgo, camundongo e/ou rato) e/ou proteínas B7-H4 produzidas a partir de outros alelos humanos, porém a extensão da ligação a uma proteína não B7-H4 não relacionada (por exemplo, outros membros da família de proteínas B7, tal como PD-L1) é menor que cerca de 10% da ligação do anticorpo a B7-H4 conforme medida, por exemplo, por um radioimunoensaio (RIA).

[0116] Numa modalidade específica, é fornecido no presente documento um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo que se liga a B7-H4 humano, de macaco cinomolgo, camundongo e rato.

[0117] Diz-se que um anticorpo "inibe competitivamente" a ligação de um anticorpo de referência a um determinado epítopo se o mesmo se ligar preferencialmente a este epítopo ou a um epítopo sobreposto na medida em que ele bloqueia, em algum grau, a ligação do anticorpo de referência ao epítopo. A inibição competitiva pode ser determinada por qualquer método conhecido na técnica, por exemplo, ensaios de ELISA de competição. Pode-se dizer que um anticorpo inibe competitivamente a ligação do anticorpo de referência a um dado epítopo em pelo menos 90%, pelo menos 80%, pelo menos 70%, pelo menos 60% ou pelo menos 50%.

[0118] Um polipeptídeo, anticorpo, polinucleotídeo, vetor, célula ou composição que é “isolado” é um polipeptídeo, anticorpo, polinucleotídeo, vetor, célula ou composição que está numa forma não encontrada na natureza. Polipeptídeos, anticorpos, polinucleotídeos, vetores, células ou composições isolados incluem aqueles que foram purificados num grau em que eles não estão mais numa forma na qual eles são encontrados na natureza. Em algumas modalidades, um anticorpo, polinucleotídeo, vetor, célula ou composição que é isolado é substancialmente puro. Conforme usado no presente documento, “substancialmente puro” se refere ao material que é pelo menos 50% puro (isto é, livre de contaminantes), pelo menos 90% puro, pelo menos 95% puro, pelo menos 98% puro ou pelo menos 99% puro.

[0119] Os termos "polipeptídeo", "peptídeo" e "proteína" são usados de modo intercambiável no presente documento para se referir aos polímeros de

aminoácidos de qualquer comprimento. O polímero pode ser linear ou ramificado, pode compreender aminoácidos modificados, e podem ser interrompidos por não aminoácidos. Os termos também abrangem um polímero de aminoácido que foi modificado naturalmente ou por intervenção; por exemplo, formação de ligação de dissulfeto, glicosilação, lipidação, acetilação, fosforilação, ou qualquer outra manipulação ou modificação, como conjugação com um componente de identificação. São incluídos também na definição, por exemplo, polipeptídeos contendo um ou mais análogos de um aminoácido (incluindo, por exemplo, aminoácidos não naturais, etc.), assim como outras modificações conhecidas na técnica. Entende-se que, devido ao fato de que os polipeptídeos desta invenção se baseiam em anticorpos, em certas modalidades, os polipeptídeos podem ocorrer como cadeias únicas ou cadeias associadas.

[0120] “Porcentagem de identidade” se refere à extensão de identidade entre duas sequências (por exemplo, sequências de aminoácidos ou sequências de ácidos nucleicos). A porcentagem de identidade pode ser determinada alinhando-se duas sequências, introduzindo lacunas para maximizar a identidade entre as sequências. Alinhamentos podem ser gerados com o uso de programas conhecidos na técnica. Para propósitos no presente documento, o alinhamento das sequências de nucleotídeos pode ser realizado com o programa blastn definido em parâmetros padrão, e o alinhamento das sequências de aminoácidos pode ser realizado com o programa blastp definido em parâmetros padrão (consulte National Center for Biotechnology Information (NCBI) na rede mundial, ncbi.nlm.nih.gov).

[0121] Conforme usado no presente documento, o termo “célula hospedeira” pode ser qualquer tipo de célula, por exemplo, uma célula primária, um célula em cultura ou uma célula a partir de uma linhagem celular. Em modalidades específicas, o termo “célula hospedeira” se refere a uma célula transfetada com uma molécula de ácido nucleico e a progênie ou progênie potencial de tal célula. A progênie de tal célula pode não ser idêntica à célula original transfetada com a molécula de ácido nucleico, por exemplo, devido a mutações ou influências ambientais que podem ocorrer em gerações seguintes ou integração da molécula de ácido nucleico no genoma da célula hospedeira.

[0122] O termo “formulação farmacêutica” se refere a uma preparação que

está em tal forma para permitir que a atividade biológica do ingrediente ativo seja eficaz e que não contém nenhum componente adicional que seja inaceitavelmente tóxico a um indivíduo ao qual a formulação seria administrada. A formulação pode ser estéril.

[0123] Os termos “administrar”, “que administra”, “administração”, e similares, conforme usado no presente documento, se referem a métodos que podem ser usados para permitir a entrega de um fármaco, por exemplo, um anticorpo anti-B7-H4 ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo ao sítio de ação biológica desejado (por exemplo, administração intravenosa). As técnicas de administração que podem ser empregadas com os agentes e métodos descritos no presente documento são encontradas, por exemplo, em Goodman and Gilman, *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, edição atual, Pergamon; e Remington’s, *Pharmaceutical Sciences*, edição atual, Mack Publishing Co., Easton, Pa.

[0124] A administração “em combinação com” um ou mais agentes terapêuticos inclui administração simultânea (concomitante) ou consecutiva em qualquer ordem.

[0125] A terapia de combinação pode fornecer “sinergia”, isto é, o efeito atingido quando os agentes ativos usados em conjunto for maior que a soma dos efeitos que resultam do uso dos agentes ativos separadamente. Um efeito sinérgico pode ser obtido quando os agentes ativos são: (1) coformulados e administrados ou entregues simultaneamente numa formulação de dosagem unitária combinada; (2) entregues em série, por alternância ou em paralelo como formulações separadas; ou (3) por algum outro regime. Quando entregue na terapia de alternância, um efeito sinérgico pode ser obtido quando os agentes ativos são entregues ou administrados sequencialmente, por exemplo, por diferentes injeções em seringas separadas. Uma “combinação sinérgica” produz um efeito que é maior que a soma dos efeitos dos agentes ativos individuais da combinação.

[0126] A terapia de combinação pode fornecer um efeito “aditivo”, isto é, o efeito obtido quando os agentes ativos usados em conjunto for igual à soma dos efeitos do resultado do uso dos agentes ativos separadamente.

[0127] Conforme usado no presente documento, os termos “indivíduo” e “paciente” são usados de forma intercambiável. O indivíduo pode ser um animal.

Em algumas modalidades, o indivíduo é um mamífero, tal como um animal não humano (por exemplo, vaca, porco, cavalo, gato, cão, rato, camundongo, macaco ou outro primata, etc.). Em algumas modalidades, o indivíduo é um macaco cinomolgo. Em algumas modalidades, o indivíduo é um ser humano.

[0128] O termo “quantidade terapeuticamente eficaz” se refere a uma quantidade de um fármaco, por exemplo, um anticorpo anti-B7-H4 ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo eficaz para tratar uma doença ou distúrbio num indivíduo. No caso de câncer, a quantidade terapeuticamente eficaz do fármaco pode reduzir o número de células cancerígenas; reduzir o tamanho ou a carga do tumor; inibir (isto é, (isto é, retardar até certo ponto e numa certa modalidade, parar) a infiltração de células cancerígenas nos órgãos periféricos; inibir (isto é, retardar até certo ponto e numa certa modalidade, parar) as metástases tumorais; inibir, até certo ponto, o crescimento tumoral; aliviar até certo ponto um ou mais dos sintomas associados ao câncer; e/ou resultar numa resposta favorável, tal como sobrevida livre de progressão aumentada (PFS), sobrevida livre de doença (DFS) ou sobrevida global (OS), resposta completa (CR), resposta parcial (PR), ou, em alguns casos, doença estável (SD), uma diminuição na doença progressiva (PD), um tempo reduzido para progressão (TTP) ou qualquer combinação dos mesmos. Na medida em que o fármaco pode impedir o crescimento e/ou exterminar as células cancerígenas existentes, o mesmo pode ser citostático e/ou citotóxico.

[0129] Os termos, tais como “que trata” ou “tratamento” ou “para tratar” ou “que alivia” ou “para aliviar” se referem às medidas terapêuticas que curam, retardam, reduzem sintomas de, e/ou freiam a progressão de um distúrbio ou afecção patológica diagnosticada. Deste modo, aqueles que necessitam de tratamento incluem aqueles já diagnosticados ou com suspeita de ter o distúrbio. Em certas modalidades, um indivíduo é “tratado” de maneira bem-sucedida para câncer de acordo com os métodos da presente invenção se o paciente mostrar um ou mais do seguinte: uma redução no número ou ausência completa de células cancerígenas; uma redução no tamanho do tumor; inibição ou ausência de infiltração de células cancerígenas nos órgãos periféricos incluindo, por exemplo, o espalhamento do câncer nos tecidos moles e ossos; inibição ou ausência de metástase tumoral; inibição ou ausência de crescimento tumoral; alívio de um ou

mais sintomas associados ao câncer específico; morbidade e mortalidade reduzidas; melhora na qualidade de vida; redução na tumorigenicidade, frequência tumorigênica ou capacidade tumorigênica de um tumor; redução no número ou frequência de células-tronco cancerígenas num tumor; diferenciação de células tumorigênicas de um estado não tumorigênico; sobrevida livre de progressão aumentada (PFS), sobrevida livre de doença (DFS) ou sobrevida global (OS), resposta completa (CR), resposta parcial (PR), doença estável (SD), uma diminuição na doença progressiva (DP), um tempo reduzido para progressão (TTP) ou qualquer combinação dos mesmos.

[0130] Os termos “câncer” e “canceroso” se refere a ou descreve a condição fisiológica em mamíferos em que uma população de células é caracterizada pelo crescimento celular desregulado. Exemplos de câncer incluem, porém sem limitação, cânceres ginecológicos (por exemplo, câncer de mama (incluindo câncer de mama triplo negativo, carcinoma ductal), câncer de ovário e câncer de endométrio), câncer de pulmão de células não pequenas, câncer pancreático, câncer de tireoide, câncer de rim (por exemplo, carcinoma de células renais), e câncer de bexiga (por exemplo, carcinoma de células uroteliais). Um câncer de pulmão de células não pequenas pode ser, por exemplo, um adenocarcinoma. Exemplos adicionais de câncer incluem, por exemplo, câncer de cabeça e pescoço, câncer de pulmão de célula pequena, câncer gástrico, melanoma, colangiocarcinoma, glioblastoma ou glioblastoma multiforme (GBM) e carcinoma de células de merkel. Numa modalidade, o câncer de ovário é um adenocarcinoma seroso. Numa modalidade, o câncer de mama é um adenocarcinoma ductal. O câncer pode ser um “câncer que expressa B7-H4” ou um “câncer que expressa B7-H4”. Tais termos se referem a um câncer que expressa B7-H4. O câncer pode ser um tumor primário ou pode ser um câncer avançado ou metastático.

[0131] Um câncer "refratário" é aquele que progride, mesmo que um tratamento antitumoral, tal como uma quimioterapia, seja administrado ao paciente com câncer.

[0132] Um câncer “recorrente” é aquele que cresceu novamente, no sítio inicial ou num sítio distante, após uma resposta à terapia inicial.

[0133] Um paciente "recidivado" é aquele que apresenta sinais ou sintomas

de câncer após remissão. Opcionalmente, o paciente recidivou após terapia adjuvante ou neoadjuvante.

[0134] A “atividade de bloqueio de ponto de verificação de célula T” se refere ao bloqueio ou inibição de uma atividade ou resposta de ponto de verificação de célula T. A atividade de bloqueio de ponto de verificação de célula T pode ser medida num ensaio de células apresentadoras de抗ígenos artificiais (aAPC) com base em alterações na produção de IFN $\gamma$ . As células T humanas primárias podem ser enriquecidas de PBMCs com o uso de um kit de enriquecimento de células T (tal como um EasySep™ Human T Cell Enrichment Kit ou kit similar). As células T enriquecidas são incubadas com microesferas (por exemplo, microesferas anti-CD3/anti-CD28). Após um período de tempo, as microesferas são magneticamente removidas, e as células T são lavadas e incubadas. A seguir, as células T são lavadas e incubadas junto com células apresentadoras de抗ígenos artificiais (aAPCs) na presença de titulação de dose de anticorpo B7-H4. aAPCs podem ser tratadas com Mitomicina C e, então, cuidadosamente lavadas antes da adição na cocultura de células T. Após a cocultura de células T, aAPCs, e anticorpos B7-H4, placas podem ser centrifugadas, e os sobrenadantes podem ser colhidos e avaliados quanto à produção de IFN $\gamma$  por ELISA. A produção de IFN $\gamma$  pode ser plotada vs. concentração de anticorpos, e a potência EC50 pode ser calculada com o uso de ajuste de curva de regressão não linear. Os resultados podem ser medidos como EC50 +/- STD em nM. A atividade de bloqueio de ponto de verificação de célula T por anticorpos B7-H4 pode ser demonstrada por um aumento na produção de IFN $\gamma$ . A “atividade de bloqueio de ponto de verificação de célula T” também pode ser medida num ensaio que usa células que expressam endogenamente B7-H4. As células T humanas primárias podem ser enriquecidas de PBMCs doadores de HLA-A2+ com o uso de um kit de isolamento de células T (por exemplo, Human Pan T Cell Isolation Kit). As células T que expressam MART-I TCR podem ser geradas ativando-se primeiro as células T Pan enriquecidas com microesferas (por exemplo, Dynabeads anti-CD3/anti-CD28), IL-2 e IL-7 por 48 horas. As células T ativadas podem, então ser transduzidas com partículas lentivirais MART-I TCR na presença de IL-2, IL-7 e polibreno. Após a transdução, as células T MART-I TCR+ Pan podem ser expandidas ao longo de um período de tempo na presença de IL-2 e IL-7. Para

gerar linhagens celulares alvo que expressam HLA-A2, as linhagens celulares de câncer que expressam B7-H4 endógeno podem ser transduzidas com partículas lentivirais HLA-A2 por um período de tempo (por exemplo, 48 horas). Além disto, B7-H4 pode ser *knocked-out* da linhagem celular HLA-A2+. Então, as células T MART-I TCR+ Pan podem ser cocultivadas na presença das várias linhagens celulares alvo a uma razão 1:1 E:T, peptídeo MART-I e um anticorpo B7-H4 ou controle de isotipo humano. Após a coincubação, as placas podem ser centrifugadas e os sobrenadantes podem ser colhidos e avaliados quanto à produção de IL-2. A produção de IL-2 pode ser medida por um kit de imunoensaio padrão (tal como um ensaio AlphaLISA ou ensaio similar).

[0135] Conforme usado na presente divulgação e nas reivindicações, as formas singulares “um”, “uma”, “o” e “a” incluem formas plurais, a menos que o contexto indique claramente de outro modo.

[0136] Entende-se que sempre que as modalidades são descritas no presente documento com a linguagem “que compreende”, modalidades análogas descritas de outro modo em termos de “que consiste em” e/ou “que consiste essencialmente em” também são fornecidas. Nesta divulgação, “compreende”, “que compreende”, “que contém” e “que tem” e similares podem ter o significado atribuído a elas na lei de patentes U.S. E pode significar “inclui”, “que inclui”, e similares; “que consiste essencialmente em” ou “consiste essencialmente” tem igualmente o mesmo significado atribuído na lei de patentes U.S. e o termo é aberto, permitindo a presença de mais do que aquilo que é citado, desde que características básicas ou inovadoras daquilo que é citado não sejam alteradas pela presença de mais do que aquilo que é citado, porém exclui modalidades da técnica anterior

[0137] A menos que seja especificamente declarado ou óbvio a partir do contexto, conforme usado no presente documento, entende-se que o termo “ou” é inclusivo. O termo “e/ou” conforme usado numa frase, tal como “A e/ou B” no presente documento se destina a incluir tanto “A como B”, “A ou B”, “A” e “B”. Igualmente, o termo “e/ou” conforme usado numa frase, tal como “A, B e/ou C” se destina a abranger cada uma das seguintes modalidades: A, B e C; A, B ou C; A ou C; A ou B; B ou C; A e C; A e B; B e C; A (sozinho); B (sozinho); e C (sozinho).

[0138] Conforme usado no presente documento, os termos “cerca de” e “aproximadamente”, quando usados para modificar um valor numérico ou faixa numérica, indicam que desvios de 5% a 10% acima e 5% e 10% abaixo do valor ou faixa permanecem dentro do significado pretendido do valor ou faixa citado.

[0139] Quaisquer composições ou métodos fornecidos no presente documento podem ser combinados com uma ou mais das outras composições e métodos fornecidos no presente documento.

## **1.2 ANTICORPOS**

[0140] Num aspecto específico, são fornecidos no presente documento anticorpos (por exemplo, anticorpos monoclonais, tais como anticorpos quiméricos, humanizados ou humanos) e fragmentos de ligação ao antígeno dos mesmos que se ligam especificamente a B7-H4 (por exemplo, B7-H4 humano). As sequências de aminoácidos para B7-H4 humano, de macaco cinomolgo, murino e de rato são conhecidas na técnica e são fornecidas também no presente documento conforme representado pelas SEQ ID NOs:1-4, respectivamente.

### **B7-H4 HUMANO:**

[0141] MASLGQILFWSIISIIILAGAIALIIGFGISGRHSITVTTVASAGNIGEDG  
ILSCTFEPDIKLSDIVIQWLKEGVGLVHEFKEGKDELSEQDEMFRGRTAVFADQV  
IVGNASLRLKNVQLTDAGTYKCYIITSKGKGNANLEYKTGAFSMPEVNVDYNASS  
ETLRCEAPRWFPQPTVVWASQVDQGANFSEVSNTSFELNSEVTMKVVSVLYN  
VTINNTYSCMIENDIAKATGDIKVTESIKRRSHLQLLNKASLCVSSFFAISWALL  
PLSPYLMNK (SEQ ID NO:1)

### **B7-H4 DE MACACO CINOMOLGO:**

[0142] MASLGQILFWSIISIIIFLAGAIALIIGFGISGRHSITVTTVASAGNIGED  
GILSCTFEPDIKLSDIVIQWLKEGVIGLVHEFKEGKDELSEQDEMFRGRTAVFADQ  
VIVGNASLRLKNVQLTDAGTYKCYIITSKGKGNANLEYKTGAFSMPEVNVDYNAS  
SETLRCEAPRWFPQPTVVWASQVDQGANFSEVSNTSFELNSEVTMKVVSVLY  
NVTINNTYSCMIENDIAKATGDIKVTESIKRRSHLQLLNKASLCVSSFLAISWAL  
LPLAPYLMNK (SEQ ID NO:2)

### **B7-H4 MURINO**

[0143] MASLGQIIFWSIINIIILAGAIALIIGFGISGKHFITVTTFTSAGNIGEDG  
TLSCTFEPDIKLNGIVIQWLKEGIKGLVHEFKEGKDDLSQQHEMFRGRTAVFADQ

VVVGNASRLKNVQLTDAGTYTCYIRTSKGKGNANLEYKTGAFSMPEINV DYNAS  
 SESLRCEAPRWFPQPTVAWASQVDQGANFSEVSNTSFELNSEVTMKVVS VLY  
 NVTINNTYSCMIENDIAKATGDIKVTDSEVKRRSQLQLLNSGPSPCVFSSAFVAG  
 WALLSLSCCLMLR (SEQ ID NO:3)

#### **B7-H4 DE RATO**

[0144] MASLGQIIFWSIINVIIILAGAIVLIIGFGISGKHFITVTTFTSAGNIGEDG  
 TLSCTFEPDIKLNGIVIQWLKEGIKGLVHEFKEGKDDLSQQHEMFRGR TAVFADQ  
 VVVGNASRLKNVQLTDAGTYTCYIHTSKGKGNANLEYKTGAFSMPEINV DYNAS  
 SESLRCEAPRWFPQPTVAWASQVDQGANFSEVSNTSFELNSEVTMKVVS VLY  
 NVTINNTYSCMIENDIAKATGDIKVTDSEVKRRSQLLELLNSGPSPCVSSVSAAGW  
 ALLSLSCCLMLR (SEQ ID NO:4)

[0145] Em certas modalidades, um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo descrito no presente documento se liga a B7-H4 humano. Em certas modalidades, um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo se liga a B7-H4 humano e de macaco cinomolgo. Em certas modalidades, um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo se liga a B7-H4 humano, murino e de rato. Em certas modalidades, um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo se liga a B7-H4 humano, de macaco cinomolgo, murino e de rato.

[0146] B7-H4 contém um ectodomínio IgC (aminoácidos 153-241 da SEQ ID NO:1) e um domínio IgV (aminoácidos 35-146 da SEQ ID NO:1).

[0147] Em certas modalidades, um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo descrito no presente documento se liga ao domínio IgV de B7-H4 humano. Consequentemente, são fornecidos no presente documento anticorpos e fragmentos de ligação ao antígeno dos mesmos que se ligam a um polipeptídeo que consiste em aminoácidos 35-146 da SEQ ID NO:1.

[0148] Em certas modalidades, um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo descrito no presente documento se liga a B7-H4 humano e compreende as seis CDRs de um anticorpo listado nas Tabelas 1 e 2 (isto é, as três CDRs VH do anticorpo listado na Tabela 1 e as três CDRs VL do mesmo anticorpo listado na Tabela 2).

#### **TABELA 1. SEQUÊNCIAS DE AMINOÁCIDOS CDR DE VH<sup>1</sup>**

<b>Antic orpo</b>	<b>CDR1 de VH (SEQ ID NO:)</b>	<b>CDR2 de VH (SEQ ID NO:)</b>	<b>CDR3 de VH (SEQ ID NO:)</b>
15461	GSISSSSYYWG (SEQ ID NO:5)	NIYYSGSTYYNPSLKS (SEQ ID NO:6)	AREGSYPNWFDP (SEQ ID NO:7)
20500	GSIKSGSHYWG (SEQ ID NO:15)	NIYYSGSTYYNPSLRS (SEQ ID NO:16)	AREGSYPNWFDP (SEQ ID NO:17)
20501	GSIKSGSHYWG (SEQ ID NO:25)	NIYYSGSTYYNPSLKS (SEQ ID NO:26)	AREGSYPNWLDP (SEQ ID NO:27)
20502	GSIKSGSYYWG (SEQ ID NO:458)	NIYYSGSTYYNPSLRS (SEQ ID NO:459)	AREGSYPNQFDP (SEQ ID NO:460)
20502 ,1	GSIKSGSYYWG (SEQ ID NO:35)	NIYYSGSTYYNPSLKS (SEQ ID NO:36)	AREGSYPNQFDP (SEQ ID NO:37)
22208	GSIKSGSHYWG (SEQ ID NO:45)	NIYYSGSTYYNPSLKS (SEQ ID NO:46)	AREGSYPNWFDP (SEQ ID NO:47)
15462	GSISSSSYYWG (SEQ ID NO:55)	NIYYSGSTYYNPSLKS (SEQ ID NO:56)	AREGSYTTVLNV (SEQ ID NO:57)
22213	GSIGRGSYYWG (SEQ ID NO:65)	NIYYSGSTYYNPSLKS (SEQ ID NO:66)	AREGSYTTVLNV (SEQ ID NO:67)
15465	GSISSGGYYWS (SEQ ID NO:75)	NIYYSGSTYYNPSLKS (SEQ ID NO:76)	ARESSTISADFDL (SEQ ID NO:77)
20506	GSISHGGYYWS (SEQ ID NO:85)	NIYYSGSTYYNPSLKS (SEQ ID NO:86)	ARESSTISADFDL (SEQ ID NO:87)
15483	GSISSGGYYWS (SEQ ID NO:95)	NIYYSGSTYYNPSLKS (SEQ ID NO:96)	ARGLSTIDEAFDP (SEQ ID NO:97)
20513	GSISDGSSYYWS (SEQ ID NO:105)	NIYYSGSTYYNPSLRS (SEQ ID NO:106)	ARGLSTIDEAFDP (SEQ ID NO:107)
22216	GSISDGSSYYWS (SEQ ID NO:115)	NIYYSGSTYYNPSLRS (SEQ ID NO:116)	ARGLSTIDEAFDP (SEQ ID NO:117)
15489	GSISSYYWS (SEQ ID NO:125)	YIYSSGSTMNPSLKS (SEQ ID NO:126)	ARGSGQYAAPDYGMD V (SEQ ID NO:127)
20516	GSIISYYWG (SEQ ID NO:135)	YIYSSGSTSYNPSLKS (SEQ ID NO:136)	ARGSGLYAAPDYGLDV (SEQ ID NO:137)
15472	FTFSSYAMS (SEQ ID NO:145)	TISGSGGSTYYADSVKG (SEQ ID NO:146)	ARGAGHYDLVGRY (SEQ ID NO:147)
15503	FTFSSYAMS (SEQ ID NO:155)	AISGSGGSTYYADSVKG (SEQ ID NO:156)	ARVGFRALNY (SEQ ID NO:157)
15495	GTFSSYAIIS (SEQ ID NO:165)	GIIPIFGTASYAQKFQG (SEQ ID NO:166)	ARQQYDGRRYFGL (SEQ ID NO:167)
15478	GTFSSYAIIS (SEQ	GIIPIFGTANYAQKFQG	ARGGPWFDP (SEQ ID

	ID NO:175)	(SEQ ID NO:176)	NO:177)
15441	FTFSSYAMS (SEQ ID NO:185)	AISGGGTSYADSVKG (SEQ ID NO:186)	AKPSLATMLAFDI (SEQ ID NO:187)
20496	GSISSVYYWS (SEQ ID NO:195)	SILVSGSTYYNPSLKS (SEQ ID NO:196)	ARAVSFLDV (SEQ ID NO:197)

<sup>1</sup>As CDRs de VH na Tabela 1 são determinadas de acordo com Kabat.

**TABELA 2. SEQUÊNCIAS DE AMINOÁCIDOS CDR DE VL <sup>2</sup>**

Anticorpo	CDR1 de VL (SEQ ID NO:)	CDR2 de VL (SEQ ID NO:)	CDR3 de VL (SEQ ID NO:)
15461	RASQSVSSNLA (SEQ ID NO:8)	GASTRAT (SEQ ID NO:9)	QQYHSFPFT (SEQ ID NO:10)
20500	RASQSVSSNLA (SEQ ID NO:18)	GASTRAT (SEQ ID NO:19)	QQYHSFPFT (SEQ ID NO:20)
20501	RASQSVSSNLA (SEQ ID NO:28)	GASTRAT (SEQ ID NO:29)	QQYHSFPFT (SEQ ID NO:30)
20502	RASQSVSSNLA (SEQ ID NO:461)	GASTRAT (SEQ ID NO:462)	QQYHSFPFT (SEQ ID NO:463)
20502,1	RASQSVSSNLA (SEQ ID NO:38)	GASTRAT (SEQ ID NO:39)	QQYHSFPFT (SEQ ID NO:40)
22208	RASQSVSTNLA (SEQ ID NO:48)	DASARVT (SEQ ID NO:49)	QQYHSFPFT (SEQ ID NO:50)
15462	RASQSVSSSYLA (SEQ ID NO:58)	GASSRAT (SEQ ID NO:59)	QQAASYPLT (SEQ ID NO:60)
22213	RASQSVASSHLA (SEQ ID NO:68)	DAVSRAT (SEQ ID NO:69)	QQAASYPLT (SEQ ID NO:70)
15465	RASQGISRWLA (SEQ ID NO:78)	AASSLQS (SEQ ID NO:79)	QQAHTFPYT (SEQ ID NO:80)
20506	RASQGISRWLA (SEQ ID NO:88)	AASSLQS (SEQ ID NO:89)	QQAHTFPYT (SEQ ID NO:90)
15483	RASQSISSWLA (SEQ ID NO:98)	KASSLES (SEQ ID NO:99)	QQDNSYPYT (SEQ ID NO:100)
20513	RASQSISSWLA (SEQ ID NO:108)	KASSLES (SEQ ID NO:109)	QQDNSYPYT (SEQ ID NO:110)
22216	RASKSISSWLA (SEQ ID NO:118)	EASSLHS (SEQ ID NO:119)	QQDNSYPYT (SEQ ID NO:120)
15489	RASQSISSWLA (SEQ ID NO:128)	KASSLES (SEQ ID NO:129)	QQDNSFPFT (SEQ ID NO:130)
20516	RASQSISSWLA (SEQ ID NO:138)	KASSLES (SEQ ID NO:139)	QQDNSFPFT (SEQ ID NO:140)

15472	RASQSISSYLN (SEQ ID NO:148)	AASSLQS (SEQ ID NO:149)	QQLYSLPPT (SEQ ID NO:150)
15503	RASQDISSWLA (SEQ ID NO:158)	AASSLQS (SEQ ID NO:159)	QQATSYPPWT (SEQ ID NO:160)
15495	RASQSVSSNLA (SEQ ID NO:168)	SASTRAT (SEQ ID NO:169)	QQVNVPWPPT (SEQ ID NO:170)
15478	RASQSISSWLA (SEQ ID NO:178)	KASSLES (SEQ ID NO:179)	QQYNSYPPFT (SEQ ID NO:180)
15441	RASQSISSWLA (SEQ ID NO:188)	DASSLES (SEQ ID NO:189)	QQSKSYPPRT (SEQ ID NO:190)
20496	RASQSISSYLN (SEQ ID NO: 198)	GASSLQS (SEQ ID NO: 199)	QQSYDPPWT (SEQ ID NO: 200)

<sup>2</sup>As CDRs de VL na Tabela 2 são determinadas de acordo com Kabat.

[0149] Em certas modalidades, um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo descrito no presente documento se liga a B7-H4 humano e compreende a VH de um anticorpo listado na Tabela 3.

**TABELA 3: SEQUÊNCIAS DE AMINOÁCIDOS DE CADEIA PESADA VARIÁVEL (VH)**

Anticorpo	Sequência de aminoácidos de VH (SEQ ID NO)
15461	QLQLQESGPGLVKPSETSLTCTVSGGSISSSYYWGIRQPP GKGLEWIGNIYYSGSTYYNPSLKSRTVTISVDTSKNQFSLKLSSV TAADTAVYYCAREGSYPNWFDPWGQGTLTVSS (SEQ ID NO: 11)
20500	QLQLQESGPGLVKPSETSLTCTVSGGSIKSGSHYWGIRQP PGKGLEWIGNIYYSGSTYYNPSLRSRTVTISVDTSKNQFSLKLSSV VTAADTAVYYCAREGSYPNWFDPWGQGTLTVSS (SEQ ID NO:21)
20501	QLQLQESGPGLVKPSETSLTCTVSGGSIKSGSHYWGIRQP PGKGLEWIGNIYYSGSTYYNPSLKSRTVTISVDTSKNQFSLKLSSV VTAADTAVYYCAREGSYPNWLDPWGQGTLTVSS (SEQ ID NO:31)
20502	QLQLQESGPGLVKPSETSLTCTVSGGSIKSGSYYWGIRQPP GKGLEWIGNIYYSGSTYYNPSLRSRTVTISVDTSKNQFSLKLSSV TAADTAVYYCAREGSYPNQFDPWGQGTLTVSS (SEQ ID NO:464)
20502,1	QLQLQESGPGLVKPSETSLTCTVSGGSIKSGSYYWGIRQPP GKGLEWIGNIYYSGSTYYNPSLKSRTVTISVDTSKNQFSLKLSSV TAADTAVYYCAREGSYPNQFDPWGQGILTVSS (SEQ ID NO:41)

22208	QLQLQESGPGLVKPSETSLTCTVSGGSIKSGSHYWGWIRO PGKGLEWIGNIYYSGSTYYNPSLKSRTMSVDTSKNQFSLKLS SVTAADTAVYYCAREGSYPNWFDPWGQGTLTVSS (SEQ ID NO:51)
15462	QLQLQESGPGLVKPSETSLTCTVSGGSISSSSYWGWIRO PGKGLEWIGNIYYSGSTYYNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLSS TAADTAVYYCAREGSYTTVLNVWGQGTMVTVSS (SEQ ID NO:61)
22213	QLQLQESGPGLVKPSETSLTCTVSGGSIGRGSYYWGWIRO PGKGLEWIGNIYYSGSTYYNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLSS VTAADTAVYYCAREGSYTTVLNVWGQGTMVTVSS (SEQ ID NO:71)
15465	QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGGSISSSGGYYWSWIRQH PGKGLEWIGNIYYSGSTYYNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLSS VTAADTAVYYCARESSTISADFDLWGRGTLTVSS (SEQ ID NO:81)
20506	QLQLQESGPGLVKPSETSLTCTASGGSIHGGYYWSWIRQH PGKGLEWIGNIYYSGSTYYNPSLKSRTMSVDTSKNQFSLKLS SVTAADTAVYYCARESSTISADFDLWGRGTLTVSS (SEQ ID NO:91)
15483	QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGGSISSSGGYYWSWIRQH PGKGLEWIGNIYYSGSTYYNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLSS VTAADTAVYYCARGLSTIDEAFDPWGQGTLTVSS (SEQ ID NO:101)
20513	QLQLQESGPGLVKPSETSLTCTVSGGSISDGSIYWSWIRQHP PGKGLEWIGNIYYSGSTYYNPSLRSRTMSVDTSKNQFSLKLSS VTAADTAVYYCARGLSTIDEAFDPWGQGTLTVSS (SEQ ID NO:111)
22216	QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGGSISDGSIYWSWIRQH PGKGLEWIGNIYYSGSTYYNPSLRSRTMSVDTSKNQFSLKLS SVTAADTAVYYCARGLSTIDEAFDPWGQGTLTVSS (SEQ ID NO:121)
15489	QVQLQESGPGLVKPSETSLTCTVSGGSISYYWSWIRQPPGK GLEWIGIYIYSSGSTYNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLSSVTA ADTAVYYCARGSGQYAAPDYGMDVGQGTTVTVSS (SEQ ID NO:131)
20516	QVQLQESGPGLVKPSETSLTCTVSGGSISYYWGWIRO PGKGLEWVSTISGSGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMN ADTAVYYCARGSGLYAAPDYGLDVWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO:141)
15472	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAP GKGLEWVSTISGSGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCARGAGHYDLVGRYWGQGTLTVSS (SEQ ID NO:151)

	NO:151)
15503	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAP GKGLEWVSAISGSGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCARVGFRALNYWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO:161)
15495	QVQLVQSGAEVKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAIWVRQAPG QGLEWMGGIIPIFGTASYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSL RSEDTAVYYCARQQYDGRRYFGLWGRGTLTVSS (SEQ ID NO:171)
15478	QVQLVQSGAEVKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAIWVRQAPG QGLEWMGGIIPIFGTANYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSL RSEDTAVYYCARGGPWFDPWGQGTLTVSS (SEQ ID NO:181)
15441	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAP GKGLEWVSAISGSGSTSYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCAKPSLATMLAFDIWGQGTMVTVSS (SEQ ID NO:191)
20496	QLQLQESGPGLVKPSETSLTCTVSGGSISSSVYYWSWIRQPP GKGLEWIGSILVSGSTYYNPSLKSRTVISVDTSKNQFSLKLSSV TAADTAVYYCARAVSFLDVWGQGTMVIVSS (SEQ ID NO:201)

[0150] Em certas modalidades, um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo descrito no presente documento se liga a B7-H4 humano e compreende a VL de um anticorpo listado na Tabela 4.

**TABELA 4: SEQUÊNCIAS DE AMINOÁCIDOS DE CADEIA LEVE VARIÁVEL (VL)**

Anticorpo	Sequência de aminoácidos VL (SEQ ID NO)
15461	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSNLAWYQQKPGQ APRLLIYGASTRATGIPARFSGSGSGTEFTLTISLQSEDFAVYY CQQYHSFPFTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:12)
20500	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSNLAWYQQKPGQ APRLLIYGASTRATGIPARFSGSGSGTEFTLTISLQSEDFAVYY CQQYHSFPFTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:22)
20501	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSNLAWYQQKPGQ APRLLIYGASTRATGIPARFSGSGSGTEFTLTISLQSEDFAVYY CQQYHSFPFTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:32)
20502 e 20502,1	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSNLAWYQQKPGQ APRLLIYGASTRATGIPARFSGSGSGTEFTLTISLQSEDFAVYY CQQYHSFPFTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:42)
22208	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSTNLAWYQQKPGQ

	APRLLIYDASARVTGIPARFSGSGSGTEFTLTISLQSEDFAVYY CQQYHSFPFTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:52)
15462	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQ APRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYY CQQAASYPLTFGGGTKEIK (SEQ ID NO:62)
22213	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVASSHLAWYQQKPGQ APRLLIYDAVS RATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYY CQQAASYPLTFGGGTKEIK (SEQ ID NO:72)
15465	DIQMTQSPSSVSASVGDRV TITCRASQGISRWLAWYQQKPGK APKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATY YCQQAHTFPYTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:82)
20506	DIQMTQSPSSVSASVGDRV TITCRASQGISRWLAWYQQKPGK APKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATY YCQQAHTFPYTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:92)
15483	DIQMTQSPSTLSASVGDRV TITCRASQSISSWLAWYQQKPGKA PKLLIYKASSLES GVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPDDFATYY CQQDNSYPYTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:102)
20513	DIQMTQSPSTLSASVGDRV TITCRASQSISSWLAWYQQKPGKA PKLLIYKASSLES GVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPDDFATYY CQQDNSYPYTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:112)
22216	DIQMTQSPSTLSASVGDRV TITCRASKSISSWLAWYQQKPGKA PKLLIYEASSLHSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPDDFATYY CQQDNSYPYTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:122)
15489	DIQMTQSPSTLSASVGDRV TITCRASQSISSWLAWYQQKPGKA PKLLIYKASSLES GVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPDDFATYY CQQDNSFPFTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:132)
20516	DIQMTQSPSTLSASVGDRV TITCRASQSISSWLAWYQQKPGKA PKLLIYKASSLES GVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPDDFATYY CQQDNSFPFTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:142)
15472	DIQMTQSPSSLSASVGDRV TITCRASQSISSYLNWYQQKPGKA PKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYY CQQLYSLPPTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:152)
15503	DIQLTQSPSSVSASVGDRV TITCRASQDISSWLAWYQQKPGKA PKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYY CQQATSYPPWTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:162)
15495	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSNLAWYQQKPGQ APRLLIYSASTRATGIPARFSGSGSGTEFTLTISLQSEDFAVYY CQQVNWPPTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:172)
15478	DIQMTQSPSTLSASVGDRV TITCRASQSISSWLAWYQQKPGKA PKLLIYKASSLES GVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPDDFATYY CQQYNSYPPFTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:182)

15441	DIQMTQSPSTLSASVGDRVITCRASQSISSWLAWYQQKPGKA PKLLIYDASSLESGVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPDDFATYY CQQSKSYPRTFGGTKVEIK (SEQ ID NO:192)
20496	DIQMTQSPSSLASVGDRVITCRASQSISSYLNWYQQKPGKA PKLLIYGASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYY CQQSYDPPWTFGGTTKVEIK (SEQ ID NO:202)

[0151] Em certas modalidades, um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo descrito no presente documento se liga a B7-H4 humano e compreende a VH e a VL de um anticorpo listado nas Tabelas 3 e 4 (isto é, a VH do anticorpo listado na Tabela 3 e a VL do mesmo anticorpo listado na Tabela 4).

[0152] Em certas modalidades, um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo descrito no presente documento se liga a B7-H4 humano e compreende as regiões de framework de VH de um anticorpo listado na Tabela 5.

**TABELA 5. SEQUÊNCIAS DE AMINOÁCIDOS DE FR DE VH<sup>4</sup>**

Antic orpo	FR1 de VH (SEQ ID NO:)	FR2 de VH (SEQ ID NO:)	FR3 de VH (SEQ ID NO:)	VH FR4 (SEQ ID NO:)
15461	QLQLQESGPGLV KPSETLSLTCTVS G (SEQ ID NO:205)	WIRQPPGKGL EWIG (SEQ ID NO:206)	RVTISVDTSKNQFS LKLSSVTAADTAVY YC (SEQ ID NO:207)	WGQGTLVT VSS (SEQ ID NO:208)
20500	QLQLQESGPGLV KPSETLSLTCTVS G (SEQ ID NO:215)	WIRQPPGKGL EWIG (SEQ ID NO:216)	RVTISVDTSKNQFS LKLSSVTAADTAVY YC (SEQ ID NO:217)	WGQGTLVT VSS (SEQ ID NO:218)
20501	QLQLQESGPGLV KPSETLSLTCTVS G (SEQ ID NO:225)	WIRQPPGKGL EWIG (SEQ ID NO:226)	RVTISVDTSKNQFS LKLSSVTAADTAVY YC (SEQ ID NO:227)	WGQGTLVT VSS (SEQ ID NO:228)
20502	QLQLQESGPGLV KPSETLSLTCTVS G (SEQ ID NO:465)	WIRQPPGKGL EWIG (SEQ ID NO:466)	RVTISVDTSKNQFS LKLSSVTAADTAVY YC (SEQ ID NO:467)	WGQGTLVT VSS (SEQ ID NO:468)
20502 ,1	QLQLQESGPGLV KPSETLSLTCTVS G (SEQ ID NO:235)	WIRQPPGKGL EWIG (SEQ ID NO:236)	RVTISVDTSKNQFS LKLSSVTAADTAVY YC (SEQ ID NO:237)	WGQGILTV SS (SEQ ID NO:238)
22208	QLQLQESGPGLV KPSETLSLTCTVS	WIRQPPGKGL EWIG (SEQ ID	RVTMSVDTSKNQF SLKLSSVTAADTAV	WGQGTLVT VSS (SEQ ID

	G (SEQ ID NO:245)	NO:246)	YYC (SEQ ID NO:247)	NO:248)
15462	QLQLQESGPGLV KPSETLSLTCTVS G (SEQ ID NO:255)	WIRQPPGKGL EWIG (SEQ ID NO:256)	RVTISVDTSKNQFS LKLSSVTAADTAVY YC (SEQ ID NO:257)	WGQGTMVT VSS (SEQ ID NO:258)
22213	QLQLQESGPGLV KPSETLSLTCTVS G (SEQ ID NO:265)	WIRQPPGKGL EWIG (SEQ ID NO:266)	RVTISVDTSKNQFS LKLSSVTAADTAVY YC (SEQ ID NO:267)	WGQGTMVT VSS (SEQ ID NO:268)
15465	QVQLQESGPGLV KPSQTLSLTCTVS G (SEQ ID NO:275)	WIRQHPGKGL EWIG (SEQ ID NO:276)	RVTISVDTSKNQFS LKLSSVTAADTAVY YC (SEQ ID NO:277)	WGRGTLVT VSS (SEQ ID NO:278)
20506	QLQLQESGPGLV KPSETLSLTCTAS G (SEQ ID NO:285)	WIRQHPGKGL EWIG (SEQ ID NO:286)	RVTMSVDTSKNQF SLKLSSVTAADTAV YYC (SEQ ID NO:287)	WGRGTLVT VSS (SEQ ID NO:288)
15483	QVQLQESGPGLV KPSQTLSLTCTVS G (SEQ ID NO:295)	WIRQHPGKGL EWIG (SEQ ID NO:296)	RVTISVDTSKNQFS LKLSSVTAADTAVY YC (SEQ ID NO:297)	WGQGTLVT VSS (SEQ ID NO:298)
20513	QLQLQESGPGLV KPSETLSLTCTVS G (SEQ ID NO:305)	WIRQHPGKGL EWIG (SEQ ID NO:306)	RVTMSVDTSKNQF SLKLSSVTAADTAV YYC (SEQ ID NO:307)	WGQGTLVT VSS (SEQ ID NO:308)
22216	QVQLQESGPGLV KPSQTLSLTCTVS G (SEQ ID NO:315)	WIRQHPGKGL EWIG (SEQ ID NO:316)	RVTMSVDTSKNQF SLKLSSVTAADTAV YYC (SEQ ID NO:317)	WGQGTLVT VSS (SEQ ID NO:318)
15489	QVQLQESGPGLV KPSETLSLTCTVS G (SEQ ID NO:325)	WIRQPPGKGL EWIG (SEQ ID NO:326)	RVTISVDTSKNQFS LKLSSVTAADTAVY YC (SEQ ID NO:327)	WGQGTTVT VSS (SEQ ID NO:328)
20516	QVQLQESGPGLV KPSETLSLTCTVS G (SEQ ID NO:335)	WIRQPPGKGL EWIG (SEQ ID NO:336)	RVTISVDTSKNQFS LKLSSVTAADTAVY YC (SEQ ID NO:337)	WGQGTTVT VSS (SEQ ID NO:338)
15472	EVQLLESGGGLV QPGGSSLRLSCAA SG (SEQ ID NO:345)	WVRQAPGKG LEWVS (SEQ ID NO:346)	RFTISRDNSKNLTY LQMNSLRAEDTAV YYC (SEQ ID NO:347)	WGQGTLVT VSS (SEQ ID NO:348)
15503	EVQLLESGGGLV	WVRQAPGKG	RFTISRDNSKNLTY	WGQGTTVT

	QPGGSLRLSCAA SG (SEQ ID NO:355)	LEWVS (SEQ ID NO:356)	LQMNSLRAEDTAV YYC (SEQ ID NO:357)	VSS (SEQ ID NO:358)
15495	QVQLVQSGAEVK KPGSSVKVSCKA SG (SEQ ID NO:365)	WVRQAPGQQ LEWMG (SEQ ID NO:366)	RVTITADESTSTAY MELSSLRSEDTAVY YC (SEQ ID NO:367)	WGRGTLVT VSS (SEQ ID NO:368)
15478	QVQLVQSGAEVK KPGSSVKVSCKA SG (SEQ ID NO:375)	WVRQAPGQQ LEWMG (SEQ ID NO:376)	RVTITADESTSTAY MELSSLRSEDTAVY YC (SEQ ID NO:377)	WGQGTLVT VSS (SEQ ID NO:378)
15441	EVQLLESGGGLV QPGGSLRLSCAA SG (SEQ ID NO:385)	WVRQAPGKG LEWVS (SEQ ID NO:386)	RFTISRDNSKNLY LQMNSLRAEDTAV YYC (SEQ ID NO:387)	WGQGTMVT VSS (SEQ ID NO:388)
20496	QLQLQESGPGLV KPSETLSLTCTVS G (SEQ ID NO:395)	WIRQPPGKGL EWIG (SEQ ID NO:396)	RVTISVDTSKNQFS LKLSSVTAADTAVY YC (SEQ ID NO:397)	WGQGTMVI VSS (SEQ ID NO:398)

<sup>4</sup>As regiões de framework de VH descritas na Tabela 5 são determinadas com base nos limites do sistema de numeração de Kabat para CDRs. Em outras palavras, as CDRs de VH são determinadas por Kabat e as regiões de framework são os resíduos de aminoácidos que circundam as CDRs na região variável no formato FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 e FR4.

[0153] Em certas modalidades, um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo descrito no presente documento se liga a B7-H4 humano e compreende as regiões de framework de VL de um anticorpo listado na Tabela 6.

**TABELA 6. SEQUÊNCIAS DE AMINOÁCIDOS DE FR DE VL<sup>3</sup>**

Anticorpo	FR1 de VL (SEQ ID NO:)	FR2 de VL (SEQ ID NO:)	FR3 de VL (SEQ ID NO:)	FR4 de VL (SEQ ID NO:)
15461	EIVMTQSPATLSV SPGERATLSC (SEQ ID NO:209)	WYQQKPGQA PRLLIY (SEQ ID NO:210)	GIPARFSGSGSG TEFTLTISSLQSE DFAVYYC (SEQ ID NO:211)	FGGGTKEI K (SEQ ID NO:212)
20500	EIVMTQSPATLSV SPGERATLSC (SEQ ID NO:219)	WYQQKPGQA PRLLIY (SEQ ID NO:220)	GIPARFSGSGSG TEFTLTISSLQSE DFAVYYC (SEQ ID NO:221)	FGGGTKEI K (SEQ ID NO:222)
20501	EIVMTQSPATLSV	WYQQKPGQA	GIPARFSGSGSG	FGGGTKEI

	SPGERATLSC (SEQ ID NO:229)	PRLLIY (SEQ ID NO:230)	TEFTLTISSLQSE DFAVYYC (SEQ ID NO:231)	K (SEQ ID NO:232)
20502 e 20502,1	EIVMTQSPATLSV SPGERATLSC (SEQ ID NO:239)	WYQQKPGQA PRLLIY (SEQ ID NO:240)	GIPARFSGSGSG TEFTLTISSLQSE DFAVYYC (SEQ ID NO:241)	FGGGKVEI K (SEQ ID NO:242)
22208	EIVMTQSPATLSV SPGERATLSC (SEQ ID NO: 249)	WYQQKPGQA PRLLIY (SEQ ID NO:250)	GIPARFSGSGSG TEFTLTISSLQSE DFAVYYC (SEQ ID NO:251)	FGGGKVEI K (SEQ ID NO:252)
15462	EIVLTQSPGTLSL SPGERATLSC (SEQ ID NO:259)	WYQQKPGQA PRLLIY (SEQ ID NO:260)	GIPDRFSGSGSG TDFTLTISRLEPE DFAVYYC (SEQ ID NO:261)	FGGGKVEI K (SEQ ID NO:262)
22213	EIVLTQSPGTLSL SPGERATLSC (SEQ ID NO:269)	WYQQKPGQA PRLLIY (SEQ ID NO:270)	GIPDRFSGSGSG TDFTLTISRLEPE DFAVYYC (SEQ ID NO:271)	FGGGKVEI K (SEQ ID NO:272)
15465	DIQMTQSPSSVS ASVGDRVITIC (SEQ ID NO:279)	WYQQKPGKA PKLLIY (SEQ ID NO:280)	GVPSRFSGSGS GTDFTLTISSLQP EDFATYYC (SEQ ID NO:281)	FGGGKVEI K (SEQ ID NO:282)
20506	DIQMTQSPSSVS ASVGDRVITIC (SEQ ID NO:289)	WYQQKPGKA PKLLIY (SEQ ID NO:290)	GVPSRFSGSGS GTDFTLTISSLQP EDFATYYC (SEQ ID NO:291)	FGGGKVEI K (SEQ ID NO:292)
15483	DIQMTQSPSTLS ASVGDRVITIC (SEQ ID NO:299)	WYQQKPGKA PKLLIY (SEQ ID NO:300)	GVPSRFSGSGS GTEFTLTISSLQP DDFATYYC (SEQ ID NO:301)	FGGGKVEI K (SEQ ID NO:302)
20513	DIQMTQSPSTLS ASVGDRVITIC (SEQ ID NO:309)	WYQQKPGKA PKLLIY (SEQ ID NO:310)	GVPSRFSGSGS GTEFTLTISSLQP DDFATYYC (SEQ ID NO:311)	FGGGKVEI K (SEQ ID NO:312)
22216	DIQMTQSPSTLS ASVGDRVITIC (SEQ ID NO:319)	WYQQKPGKA PKLLIY (SEQ ID NO:320)	GVPSRFSGSGS GTEFTLTISSLQP DDFATYYC (SEQ ID NO:321)	FGGGKVEI K (SEQ ID NO:322)
15489	DIQMTQSPSTLS ASVGDRVITIC (SEQ ID NO:329)	WYQQKPGKA PKLLIY (SEQ ID NO:330)	GVPSRFSGSGS GTEFTLTISSLQP DDFATYYC (SEQ ID NO:331)	FGGGKVEI K (SEQ ID NO:332)

20516	DIQMTQSPSTLS ASVGDRVTITC (SEQ ID NO:339)	WYQQKPGKA PKLLIY (SEQ ID NO:340)	GVPSRFSGSGS GTEFTLTISSLQP DDFATYYC (SEQ ID NO:341)	FGGGTKEI K (SEQ ID NO:342)
15472	DIQMTQSPSSLS ASVGDRVTITC (SEQ ID NO:349)	WYQQKPGKA PKLLIY (SEQ ID NO:350)	GVPSRFSGSGS GTDFTLTISSLQP EDFATYYC (SEQ ID NO:351)	FGGGTKEI K (SEQ ID NO:352)
15503	DIQLTQSPSSVSA SVGDRVTITC (SEQ ID NO:359)	WYQQKPGKA PKLLIY (SEQ ID NO:360)	GVPSRFSGSGS GTDFTLTISSLQP EDFATYYC (SEQ ID NO:361)	FGGGTKEI K (SEQ ID NO:362)
15495	EIVMTQSPATLSV SPGERATLSC (SEQ ID NO:369)	WYQQKPGQA PRLLIY (SEQ ID NO:370)	GIPARFSGSGSG TEFTLTISSLQSE DFAVYYC (SEQ ID NO:371)	FGGGTKEI K (SEQ ID NO:372)
15478	DIQMTQSPSTLS ASVGDRVTITC (SEQ ID NO:379)	WYQQKPGKA PKLLIY (SEQ ID NO:380)	GVPSRFSGSGS GTEFTLTISSLQP DDFATYYC (SEQ ID NO:381)	FGGGTKEI K (SEQ ID NO:382)
15441	DIQMTQSPSTLS ASVGDRVTITC (SEQ ID NO:389)	WYQQKPGKA PKLLIY (SEQ ID NO:390)	GVPSRFSGSGS GTEFTLTISSLQP DDFATYYC (SEQ ID NO:391)	FGGGTKEI K (SEQ ID NO:392)
20496	DIQMTQSPSSLS ASVGDRVTITC (SEQ ID NO:399)	WYQQKPGKA PKLLIY (SEQ ID NO:400)	GVPSRFSGSGS GTDFTLTISSLQP EDFATYYC (SEQ ID NO:401)	FGGGTKEI K (SEQ ID NO:402)

<sup>3</sup>As regiões de framework de VL descritas na Tabela 6 são determinadas com base nos limites do sistema de numeração de Kabat para CDRs. Em outras palavras, as CDRs de VL são determinadas por Kabat e as regiões de framework são os resíduos de aminoácidos que circundam as CDRs na região variável no formato FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 e FR4.

[0154] Em certas modalidades, um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo descrito no presente documento se liga a B7-H4 humano e comprehende as quatro regiões de framework de VH e as quatro regiões de framework de VL de um anticorpo listado nas Tabelas 5 e 6 (isto é, as quatro regiões de framework de VH do anticorpo listado na Tabela 5 e as quatro regiões de framework de VL do mesmo anticorpo listado na Tabela 6.)

[0155] Em certas modalidades, um anticorpo ou fragmento de ligação ao

antígeno do mesmo descrito no presente documento se liga a B7-H4 humano e compreende a sequência de cadeia pesada de um anticorpo listado na Tabela 7.

**TABELA 7: SEQUÊNCIAS DE AMINOÁCIDOS DE CADEIA PESADA DE COMPRIMENTO TOTAL**

Anticorpo	Sequência de Aminoácidos de Cadeia Pesada de Comprimento Total (SEQ ID NO)
15461	QLQLQESGPGLVKPSETSLTCTVSGGSIKSGSHYWGWRQP PGKGLEWIGNIYYSGSTYYNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLS SVTAADTAVYYCAREGSYPNWDFPWGQGTLTVSSASTKGP SVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN TKVDKKVEPKSCDKTHTCPCCPAPEELLGGPSVFLFPPKPKD L MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPR EEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP APIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKG FYP SDI AVEWE SNGQ PENNYKTT PPVLD SDGSFF LYSKLT VDKSR WQ QGN NVFCS CSV MHEA LNHY TQK SLSP GK (SEQ ID NO:13)
20500	QLQLQESGPGLVKPSETSLTCTVSGGSIKSGSHYWGWRQP PGKGLEWIGNIYYSGSTYYNPSLRSRTISVDTSKNQFSLKLS SVTAADTAVYYCAREGSYPNWDFPWGQGTLTVSSASTKGP SVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN TKVDKKVEPKSCDKTHTCPCCPAPEELLGGPSVFLFPPKPKD L MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPR EEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP APIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKG FYP SDI AVEWE SNGQ PENNYKTT PPVLD SDGSFF LYSKLT VDKSR WQ QGN NVFCS CSV MHEA LNHY TQK SLSP GK (SEQ ID NO:23)
20501	QLQLQESGPGLVKPSETSLTCTVSGGSIKSGSHYWGWRQP PGKGLEWIGNIYYSGSTYYNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLS SVTAADTAVYYCAREGSYPNWDFPWGQGTLTVSSASTKGP SVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN TKVDKKVEPKSCDKTHTCPCCPAPEELLGGPSVFLFPPKPKD L MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPR EEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP APIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKG FYP SDI AVEWE SNGQ PENNYKTT PPVLD SDGSFF LYSKLT VDKSR WQ QGN NVFCS CSV MHEA LNHY TQK SLSP GK (SEQ ID NO:33)
20502	QLQLQESGPGLVKPSETSLTCTVSGGSIKSGSYYWGWRQP PGKGLEWIGNIYYSGSTYYNPSLRSRTISVDTSKNQFSLKLS SVTAADTAVYYCAREGSYPNQFD PWGQGTLTVSSASTKGP SVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN

	TKVDKKVEPKSCDKTHTCPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPNSDI AVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:469)
20502,1	QLQLQESGPGLVKPSETSLTCTVSGGSIKSGSYYWGWRQ PGKGLEWIGNIYYSGSTYYNPSLKSRTVISVDTSKNQFSLKLS SVTAADTAVYYCAREGSYPNQFDPWGQGILTVSSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAAAGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT KVDDKKVEPKSCDKTHTCPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPNSDI AVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:43)
22208	QLQLQESGPGLVKPSETSLTCTVSGGSIKSGSHYWGWRQ PGKGLEWIGNIYYSGSTYYNPSLKSRTMSVDTSKNQFSLKL SSVTAADTAVYYCAREGSYPNWFDPWGQGTLTVSSASTKG PSVFPAPSSKSTSGGTAAAGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS NTKVDDKKVEPKSCDKTHTCPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPNSDI IAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:53)
15462	QLQLQESGPGLVKPSETSLTCTVSGGSISSSSYWGWRQ PGKGLEWIGNIYYSGSTYYNPSLKSRTVISVDTSKNQFSLKLS SVTAADTAVYYCAREGSYTTVLNVWGQGTMVTVSSASTKG SVFPAPSSKSTSGGTAAAGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN TKVDDKKVEPKSCDKTHTCPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPNSDI AVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:63)
22213	QLQLQESGPGLVKPSETSLTCTVSGGSIGRGSYYWGWRQ PGKGLEWIGNIYYSGSTYYNPSLKSRTVISVDTSKNQFSLKLS SVTAADTAVYYCAREGSYTTVLNVWGQGTMVTVSSASTKG SVFPAPSSKSTSGGTAAAGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN TKVDDKKVEPKSCDKTHTCPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR

	EEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVTLPSSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:73)
15465	QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGGSISSGGGYYWSWIRQH PGKGLEWIGNIYYSGSTYYNPSLKSRTMSVDTSKNQFSLKLS SVTAADTAVYYCARESSTISAFDLWGRGLTVSSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPVTWSWNSGALTSG VHTFPALQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT KVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEELLGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVTLPSSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:83)
20506	QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTASGGSIHGGYYWSWIRQH PGKGLEWIGNIYYSGSTYYNPSLKSRTMSVDTSKNQFSLKL SSVTAADTAVYYCARESSTISAFDLWGRGLTVSSASTKGPS SVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPVTWSWNSGALTSG GVHTFPALQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN TKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEELLGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVTLPSSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:93)
15483	QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGGSISSGGGYYWSWIRQH PGKGLEWIGNIYYSGSTYYNPSLKSRTMSVDTSKNQFSLKLS SVTAADTAVYYCARGLSTIDEAFDPWGQGTLTVSSASTKGPS SVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPVTWSWNSGALTSG GVHTFPALQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN TKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEELLGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVTLPSSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:103)
20513	QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISDGSIYWSWIRQH PGKGLEWIGNIYYSGSTYYNPSLRSRTMSVDTSKNQFSLKL SSVTAADTAVYYCARGLSTIDEAFDPWGQGTLTVSSASTKG PSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPVTWSWNSGALT SGVHTFPALQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS NTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEELLGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR REQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE KTISKAKGQPREPQVTLPSSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSD

	IAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLVDKSRWQ QGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:113)
22216	QVQLQESGPLVKPSQTLSTCTVSGGISIDGSYYWSIRQH PGKGLEWIGNIYYSGSTYYNPSLRSRVTMSVDTSKNQFSLKL SSVTAADTAVYYCARGLSTIDEAFDPWGQGTLTVSSASTKG PSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPVTWSWNSGALT SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTPSSSLGTQTYICNVNHKPS NTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEELLGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REQYNSTYRVVSVLVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLVDKSRWQ QGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:123)
15489	QVQLQESGPLVKPSETLSLTCTVSGGISSYYWSIRQPPG KGLEWIGYIYSSGSTNYNPSLKSRTVISVDTSKNQFSLKLSSVT AADTAVYYCARGSGQYAAPDYGMWDVGQGTTVSSASTKG PSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPVTWSWNSGALT SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTPSSSLGTQTYICNVNHKPS NTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEELLGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REQYNSTYRVVSVLVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLVDKSRWQ QGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:133)
20516	QVQLQESGPLVKPSETLSLTCTVSGGIISYYWGWRQPPG KGLEWIGYIYSSGSTSYNPSLKSRTVISVDTSKNQFSLKLSSVT AADTAVYYCARGSGLYAAPDYGLDVWGQGTTVSSASTKG PSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPVTWSWNSGALT SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTPSSSLGTQTYICNVNHKPS NTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEELLGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REQYNSTYRVVSVLVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLVDKSRWQ QGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:143)
15472	EVQLLESGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAP GKGLEWVSTISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQM NSLRAEDTAVYYCARGAGHYDLVGRYWGQGTLTVSSASTK GPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPVTWSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTPSSSLGTQTYICNVNHKPS NTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEELLGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT PREEQYNSTYRVVSVLVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLVDKSRW QQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:144)

	NO:153)
15503	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAP GKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRTISRDNSKNTLYLQM NSLRAEDTAVYYCARVGFRALNYWGQGTTVSSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPVTWSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT KVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEELLGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDI IAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:163)
15495	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAIISWVRQAP GQGLEWMGGIIPIFGTASYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELS SLRSEDTAVYYCARQQYDGRRYFGLWGRGTLTVSSASTKG PSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPVTWSWNSGALT SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS NTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEELLGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:173)
15478	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAIISWVRQAP GQGLEWMGGIIPIFGTANYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELS SLRSEDTAVYYCARGGPWFDWGQGTLTVSSASTKGPSVF PLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPVTWSWNSGALTSGVH TFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV DKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEELLGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ YNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTSK AKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDI IAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK(SEQ ID NO:183)
15441	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAP GKGLEWVSAISGSGGSTSYADSVKGRTISRDNSKNTLYLQM NSLRAEDTAVYYCAKPSLATMLAFDIWGQGTMVTVSSASTKG PSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPVTWSWNSGALT SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS NTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEELLGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:193)

20496	QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSSVYYWSWIRQP PGKGLEWIGSILVSGSTYYNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLSS VTAADTAVYYCARAVSFLDWGQGTMVIVSSASTKGPSVFPL APSSKSTSGGTAAAGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF PAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK KVEPKSCDKTHTCPPCAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK GQPREPQVTLPSSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:203)
-------	---

[0156] Em certas modalidades, um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo descrito no presente documento se liga a B7-H4 humano e compreende a sequência de cadeia leve de um anticorpo listado na Tabela 8.

**TABELA 8: SEQUÊNCIAS DE AMINOÁCIDOS DE CADEIA LEVE DE COMPRIMENTO TOTAL**

Anticorpo	Sequência de Aminoácidos de Cadeia Leve de Comprimento Total (SEQ ID NO)
15461	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSNLAWYQQKPGQ APRLLIYGASTRATGIPARFSGSGSGTEFTLTISSLQSEDFAVY YCQQYHSFPFTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGT ASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKD STYSLSSTTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGE C (SEQ ID NO:14)
20500	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSNLAWYQQKPGQ APRLLIYGASTRATGIPARFSGSGSGTEFTLTISSLQSEDFAVY YCQQYHSFPFTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGT ASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKD STYSLSSTTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGE C (SEQ ID NO:24)
20501	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSNLAWYQQKPGQ APRLLIYGASTRATGIPARFSGSGSGTEFTLTISSLQSEDFAVY YCQQYHSFPFTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGT ASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKD STYSLSSTTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGE C (SEQ ID NO:34)
20502 e 20502,1	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSNLAWYQQKPGQ APRLLIYGASTRATGIPARFSGSGSGTEFTLTISSLQSEDFAVY YCQQYHSFPFTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGT ASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKD STYSLSSTTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGE

	C (SEQ ID NO:44)
22208	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSTNLAWYQQKPGQ APRLLIYDASARVTGIPARFSGSGSGTEFTLTISLQSEDFAV YCQQYHSFPFTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGT ASVVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKD STYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGE C (SEQ ID NO:54)
15462	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPG QAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAV YYCQQQAASYPLTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSG TASVVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK DSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNR GEC (SEQ ID NO:64)
22213	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVASSHLAWYQQKPG QAPRLLIYDAVS RATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAV YYCQQQAASYPLTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSG TASVVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK DSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNR GEC (SEQ ID NO:74)
15465	DIQMTQSPSSVSASVGDRVITCRASQGISRWLAWYQQKPGK APKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATY YCQQQAHTFPYTFFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGT ASVVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKD STYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGE C (SEQ ID NO:84)
20506	DIQMTQSPSSVSASVGDRVITCRASQGISRWLAWYQQKPGK APKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATY YCQQQAHTFPYTFFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGT ASVVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKD STYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGE C (SEQ ID NO:94)
15483	DIQMTQSPSTLSASVGDRVITCRASQSISSWLAWYQQKPGK APKLLIYKASSLESGVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPDFFATY YCQQDNSYPYTFFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGT ASVVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKD STYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGE C (SEQ ID NO:104)
20513	DIQMTQSPSTLSASVGDRVITCRASQSISSWLAWYQQKPGK APKLLIYKASSLESGVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPDFFATY YCQQDNSYPYTFFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGT ASVVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKD STYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGE C (SEQ ID NO:114)
22216	DIQMTQSPSTLSASVGDRVITCRASKSISSWLAWYQQKPGK

	APKLLIYEASSLHSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFATY YCQQDNSYPYTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGT ASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKD STYSLSSTTLSKADYEHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRC C (SEQ ID NO:124)
15489	DIQMTQSPSTLSASVGDRVITCRASQSISSWLAWYQQKPGK APKLLIYKASSLESGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFATY YCQQDNSFPFTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGT ASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKD STYSLSSTTLSKADYEHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRC C (SEQ ID NO:134)
20516	DIQMTQSPSTLSASVGDRVITCRASQSISSWLAWYQQKPGK APKLLIYKASSLESGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFATY YCQQDNSFPFTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGT ASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKD STYSLSSTTLSKADYEHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRC C (SEQ ID NO:144)
15472	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITCRASQSISSYLNWYQQKPGK APKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATY YCQQLYSLPPTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGT ASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKD STYSLSSTTLSKADYEHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRC C (SEQ ID NO:154)
15503	DIQLTQSPSSVSASVGDRVITCRASQDISSWLAWYQQKPGK APKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATY YCQQQATSYPPWTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSG TASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK DSTYSLSSTTLSKADYEHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRC GEC (SEQ ID NO:164)
15495	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSNLAWYQQKPGQ APRLLIYSASTRATGIPARFSGSGSGTEFTLTISSLQSEDFAVYY CQQVNWWPPTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGT ASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKD STYSLSSTTLSKADYEHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRC C (SEQ ID NO:174)
15478	DIQMTQSPSTLSASVGDRVITCRASQSISSWLAWYQQKPGK APKLLIYKASSLESGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFATY YCQQYNSYPFPFTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSG TASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK DSTYSLSSTTLSKADYEHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRC GEC (SEQ ID NO:184)
15441	DIQMTQSPSTLSASVGDRVITCRASQSISSWLAWYQQKPGK APKLLIYDASSLESGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFATY YCQQSKSYPRTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGT ASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKD

	STYSLSSTTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGE C (SEQ ID NO:194)
20496	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITCRASQSISSYLNWYQQKPGK APKLLIYGASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATY YCQQSYDPPWTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSG TASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK DSTYSLSSTTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNR GEC (SEQ ID NO:204)

[0157] Em certas modalidades, um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo descrito no presente documento se liga a B7-H4 humano e compreende a sequência de cadeia pesada e a sequência de cadeia leve de um anticorpo listado nas Tabelas 7 e 8 (isto é, a sequência de cadeia pesada do anticorpo listado na Tabela 7 e a sequência de cadeia leve do mesmo anticorpo listado na Tabela 8).

[0158] Em certas modalidades, um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo descrito no presente documento se liga a B7-H4 humano, compreende as seis CDRs de um anticorpo listado nas Tabelas 1 e 2 (isto é, as três CDRs de VH do anticorpo listado na Tabela 1 e as três CDRs de VL do mesmo anticorpo listado na Tabela 2), e compreende uma VH que compreende uma sequência pelo menos 80% idêntica à sequência VH do mesmo anticorpo na Tabela 3 e uma VL que compreende uma sequência pelo menos 80% idêntica à sequência VL do mesmo anticorpo na Tabela 4. Em certas modalidades, um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo descrito no presente documento se liga a B7-H4 humano, compreende as seis CDRs de um anticorpo listado nas Tabelas 1 e 2 (isto é, as três CDRs de VH do anticorpo listado na Tabela 1 e as três CDRs de VL do mesmo anticorpo listado na Tabela 2), e compreende uma VH que compreende uma sequência pelo menos 85% idêntica à sequência VH do mesmo anticorpo na Tabela 3 e uma VL que compreende uma sequência pelo menos 85% idêntica à sequência VL do mesmo anticorpo na Tabela 4.

[0159] Em certas modalidades, um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo descrito no presente documento se liga a B7-H4 humano, compreende as seis CDRs de um anticorpo listado nas Tabelas 1 e 2 (isto é, as três CDRs de VH do anticorpo listado na Tabela 1 e as três CDRs de VL do mesmo

anticorpo listado na Tabela 2), e compreende uma VH que compreende uma sequência pelo menos 90% idêntica à sequência VH do mesmo anticorpo na Tabela 3 e uma VL que compreende uma sequência pelo menos 90% idêntica à sequência VL do mesmo anticorpo na Tabela 4. Em certas modalidades, um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo descrito no presente documento se liga a B7-H4 humano, compreende as seis CDRs de um anticorpo listado nas Tabelas 1 e 2 (isto é, as três CDRs de VH do anticorpo listado na Tabela 1 e as três CDRs de VL do mesmo anticorpo listado na Tabela 2), e compreende uma VH que compreende uma sequência pelo menos 95% idêntica à sequência VH do mesmo anticorpo na Tabela 3 e uma VL que compreende uma sequência pelo menos 95% idêntica à sequência VL do mesmo anticorpo na Tabela 4.

[0160] Em certas modalidades, um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo descrito no presente documento se liga a B7-H4 humano, compreende as seis CDRs de um anticorpo listado nas Tabelas 1 e 2 (isto é, as três CDRs de VH do anticorpo listado na Tabela 1 e as três CDRs de VL do mesmo anticorpo listado na Tabela 2), e compreende uma VH que compreende uma sequência pelo menos 96% idêntica à sequência VH do mesmo anticorpo na Tabela 3 e uma VL que compreende uma sequência pelo menos 96% idêntica à sequência VL do mesmo anticorpo na Tabela 4. Em certas modalidades, um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo descrito no presente documento se liga a B7-H4 humano, compreende as seis CDRs de um anticorpo listado nas Tabelas 1 e 2 (isto é, as três CDRs de VH do anticorpo listado na Tabela 1 e as três CDRs de VL do mesmo anticorpo listado na Tabela 2), e compreende uma VH que compreende uma sequência pelo menos 97% idêntica à sequência VH do mesmo anticorpo na Tabela 3 e uma VL que compreende uma sequência pelo menos 97% idêntica à sequência VL do mesmo anticorpo na Tabela 4. Em certas modalidades, um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo descrito no presente documento se liga a B7-H4 humano, compreende as seis CDRs de um anticorpo listado nas Tabelas 1 e 2 (isto é, as três CDRs de VH do anticorpo listado na Tabela 1 e as três CDRs de VL do mesmo anticorpo listado na Tabela 2), e compreende uma VH que compreende uma sequência pelo menos 98% idêntica à sequência VH do mesmo anticorpo na Tabela 3 e uma VL que compreende uma sequência

pelo menos 98% idêntica à sequência VL do mesmo anticorpo na Tabela 4. Em certas modalidades, um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo descrito no presente documento se liga a B7-H4 humano, compreende as seis CDRs de um anticorpo listado nas Tabelas 1 e 2 (isto é, as três CDRs de VH do anticorpo listado na Tabela 1 e as três CDRs de VL do mesmo anticorpo listado na Tabela 2), e compreende uma VH que compreende uma sequência pelo menos 99% idêntica à sequência VH do mesmo anticorpo na Tabela 3 e uma VL que compreende uma sequência pelo menos 99% idêntica à sequência VL do mesmo anticorpo na Tabela 4.

[0161] Em certas modalidades, um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo descrito no presente documento se liga a B7-H4 humano, compreende as seis CDRs de um anticorpo listado nas Tabelas 1 e 2 (isto é, as três CDRs de VH do anticorpo listado na Tabela 1 e as três CDRs de VL do mesmo anticorpo listado na Tabela 2), compreende uma VH que compreende uma sequência pelo menos 80% idêntica à sequência VH do mesmo anticorpo na Tabela 3 e uma VL que compreende uma sequência pelo menos 80% idêntica à sequência VL do mesmo anticorpo na Tabela 4, e se liga a B7-H4 humano, de macaco cinomolgo, de rato e/ou de camundongo. Em certas modalidades, um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo descrito no presente documento se liga a B7-H4 humano, compreende as seis CDRs de um anticorpo listado nas Tabelas 1 e 2 (isto é, as três CDRs de VH do anticorpo listado na Tabela 1 e as três CDRs de VL do mesmo anticorpo listado na Tabela 2), compreende uma VH que compreende uma sequência pelo menos 85% idêntica à sequência VH do mesmo anticorpo na Tabela 3 e uma VL que compreende uma sequência pelo menos 85% idêntica à sequência VL do mesmo anticorpo na Tabela 4, e se liga a B7-H4 humano, de macaco cinomolgo, de rato e/ou de camundongo.

[0162] Em certas modalidades, um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo descrito no presente documento se liga a B7-H4 humano, compreende as seis CDRs de um anticorpo listado nas Tabelas 1 e 2 (isto é, as três CDRs de VH do anticorpo listado na Tabela 1 e as três CDRs de VL do mesmo anticorpo listado na Tabela 2), compreende uma VH que compreende uma sequência pelo menos 90% idêntica à sequência VH do mesmo anticorpo na Tabela

3 e uma VL que comprehende uma sequência pelo menos 90% idêntica à sequência VL do mesmo anticorpo na Tabela 4, e se liga a B7-H4 humano, de macaco cinomolgo, de rato e/ou de camundongo. Em certas modalidades, um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo descrito no presente documento se liga a B7-H4 humano, comprehende as seis CDRs de um anticorpo listado nas Tabelas 1 e 2 (isto é, as três CDRs de VH do anticorpo listado na Tabela 1 e as três CDRs de VL do mesmo anticorpo listado na Tabela 2), comprehende uma VH que comprehende uma sequência pelo menos 95% idêntica à sequência VH do mesmo anticorpo na Tabela 3 e uma VL que comprehende uma sequência pelo menos 95% idêntica à sequência VL do mesmo anticorpo na Tabela 4, e se liga a B7-H4 humano, de macaco cinomolgo, de rato e/ou de camundongo.

[0163] Em certas modalidades, um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo descrito no presente documento se liga a B7-H4 humano, comprehende as seis CDRs de um anticorpo listado nas Tabelas 1 e 2 (isto é, as três CDRs de VH do anticorpo listado na Tabela 1 e as três CDRs de VL do mesmo anticorpo listado na Tabela 2), comprehende uma VH que comprehende uma sequência pelo menos 96% idêntica à sequência VH do mesmo anticorpo na Tabela 3 e uma VL que comprehende uma sequência pelo menos 96% idêntica à sequência VL do mesmo anticorpo na Tabela 4, e se liga a B7-H4 humano, de macaco cinomolgo, de rato e/ou de camundongo. Em certas modalidades, um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo descrito no presente documento se liga a B7-H4 humano, comprehende as seis CDRs de um anticorpo listado nas Tabelas 1 e 2 (isto é, as três CDRs de VH do anticorpo listado na Tabela 1 e as três CDRs de VL do mesmo anticorpo listado na Tabela 2), comprehende uma VH que comprehende uma sequência pelo menos 97% idêntica à sequência VH do mesmo anticorpo na Tabela 3 e uma VL que comprehende uma sequência pelo menos 97% idêntica à sequência VL do mesmo anticorpo na Tabela 4, e se liga a B7-H4 humano, de macaco cinomolgo, de rato e/ou de camundongo. Em certas modalidades, um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo descrito no presente documento se liga a B7-H4 humano, comprehende as seis CDRs de um anticorpo listado nas Tabelas 1 e 2 (isto é, as três CDRs de VH do anticorpo listado na Tabela 1 e as três CDRs de VL do mesmo anticorpo listado na Tabela 2),

compreende uma VH que comprehende uma sequência pelo menos 98% idêntica à sequência VH do mesmo anticorpo na Tabela 3 e uma VL que comprehende uma sequência pelo menos 98% idêntica à sequência VL do mesmo anticorpo na Tabela 4, e se liga a B7-H4 humano, de macaco cinomolgo, de rato e/ou de camundongo. Em certas modalidades, um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo descrito no presente documento se liga a B7-H4 humano, comprehende as seis CDRs de um anticorpo listado nas Tabelas 1 e 2 (isto é, as três CDRs de VH do anticorpo listado na Tabela 1 e as três CDRs de VL do mesmo anticorpo listado na Tabela 2), comprehende uma VH que comprehende uma sequência pelo menos 99% idêntica à sequência VH do mesmo anticorpo na Tabela 3 e uma VL que comprehende uma sequência pelo menos 99% idêntica à sequência VL do mesmo anticorpo na Tabela 4, e se liga a B7-H4 humano, de macaco cinomolgo, de rato e/ou de camundongo.

[0164] Em certas modalidades, um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo descrito no presente documento se liga a B7-H4 humano, comprehende as seis CDRs de um anticorpo listado nas Tabelas 1 e 2 (isto é, as três CDRs de VH do anticorpo listado na Tabela 1 e as três CDRs de VL do mesmo anticorpo listado na Tabela 2), comprehende uma VH que comprehende a sequência pelo menos 80% idêntica à sequência VH do mesmo anticorpo na Tabela 3 e uma VL que comprehende uma sequência pelo menos 80% idêntica à sequência VL do mesmo anticorpo na Tabela 4, aumenta a proliferação de células T, aumenta a produção de IFNy e medeia a atividade de ADCC contra células que expressam B7-H4. Em certas modalidades, um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo descrito no presente documento se liga a B7-H4 humano, comprehende as seis CDRs de um anticorpo listado nas Tabelas 1 e 2 (isto é, as três CDRs de VH do anticorpo listado na Tabela 1 e as três CDRs de VL do mesmo anticorpo listado na Tabela 2), comprehende uma VH que comprehende a sequência pelo menos 85% idêntica à sequência VH do mesmo anticorpo na Tabela 3 e uma VL que comprehende uma sequência pelo menos 85% idêntica à sequência VL do mesmo anticorpo na Tabela 4, aumenta a proliferação de células T, aumenta a produção de IFNy e medeia a atividade de ADCC contra células que expressam B7-H4.

[0165] Em certas modalidades, um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo descrito no presente documento se liga a B7-H4 humano, compreende as seis CDRs de um anticorpo listado nas Tabelas 1 e 2 (isto é, as três CDRs de VH do anticorpo listado na Tabela 1 e as três CDRs de VL do mesmo anticorpo listado na Tabela 2), compreende uma VH que compreende a sequência pelo menos 90% idêntica à sequência VH do mesmo anticorpo na Tabela 3 e uma VL que compreende uma sequência pelo menos 90% idêntica à sequência VL do mesmo anticorpo na Tabela 4, aumenta a proliferação de células T, aumenta a produção de IFNy e/ou medeia a atividade de ADCC contra células que expressam B7-H4. Em certas modalidades, um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo descrito no presente documento se liga a B7-H4 humano, compreende as seis CDRs de um anticorpo listado nas Tabelas 1 e 2 (isto é, as três CDRs de VH do anticorpo listado na Tabela 1 e as três CDRs de VL do mesmo anticorpo listado na Tabela 2), compreende uma VH que compreende a sequência pelo menos 95% idêntica à sequência VH do mesmo anticorpo na Tabela 3 e uma VL que compreende uma sequência pelo menos 95% idêntica à sequência VL do mesmo anticorpo na Tabela 4, aumenta a proliferação de células T, aumenta a produção de IFNy e medeia a atividade de ADCC contra células que expressam B7-H4.

[0166] Em certas modalidades, um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo descrito no presente documento se liga a B7-H4 humano, compreende as seis CDRs de um anticorpo listado nas Tabelas 1 e 2 (isto é, as três CDRs de VH do anticorpo listado na Tabela 1 e as três CDRs de VL do mesmo anticorpo listado na Tabela 2), compreende uma VH que compreende a sequência pelo menos 96% idêntica à sequência VH do mesmo anticorpo na Tabela 3 e uma VL que compreende uma sequência pelo menos 96% idêntica à sequência VL do mesmo anticorpo na Tabela 4, aumenta a proliferação de células T, aumenta a produção de IFNy e medeia a atividade de ADCC contra células que expressam B7-H4. Em certas modalidades, um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo descrito no presente documento se liga a B7-H4 humano, compreende as seis CDRs de um anticorpo listado nas Tabelas 1 e 2 (isto é, as três CDRs de VH do anticorpo listado na Tabela 1 e as três CDRs de VL do mesmo anticorpo

listado na Tabela 2), compreende uma VH que compreende a sequência pelo menos 97% idêntica à sequência VH do mesmo anticorpo na Tabela 3 e uma VL que compreende uma sequência pelo menos 97% idêntica à sequência VL do mesmo anticorpo na Tabela 4, aumenta a proliferação de células T, aumenta a produção de IFNy e medeia a atividade de ADCC contra células que expressam B7-H4. Em certas modalidades, um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo descrito no presente documento se liga a B7-H4 humano, compreende as seis CDRs de um anticorpo listado nas Tabelas 1 e 2 (isto é, as três CDRs de VH do anticorpo listado na Tabela 1 e as três CDRs de VL do mesmo anticorpo listado na Tabela 2), compreende uma VH que compreende a sequência pelo menos 98% idêntica à sequência VH do mesmo anticorpo na Tabela 3 e uma VL que compreende uma sequência pelo menos 98% idêntica à sequência VL do mesmo anticorpo na Tabela 4, aumenta a proliferação de células T, aumenta a produção de IFNy e medeia a atividade de ADCC contra células que expressam B7-H4. Em certas modalidades, um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo descrito no presente documento se liga a B7-H4 humano, compreende as seis CDRs de um anticorpo listado nas Tabelas 1 e 2 (isto é, as três CDRs de VH do anticorpo listado na Tabela 1 e as três CDRs de VL do mesmo anticorpo listado na Tabela 2), compreende uma VH que compreende a sequência pelo menos 99% idêntica à sequência VH do mesmo anticorpo na Tabela 3 e uma VL que compreende uma sequência pelo menos 99% idêntica à sequência VL do mesmo anticorpo na Tabela 4, aumenta a proliferação de células T, aumenta a produção de IFNy e medeia a atividade de ADCC contra células que expressam B7-H4.

[0167] Em certos aspectos, um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo descrito no presente documento pode ser descrito por seu domínio VL sozinho ou seu domínio VH sozinho, ou por suas 3 CDRs de VL sozinhas, ou suas 3 CDRs de VH sozinhas. Consulte, por exemplo, Rader C et al., (1998) PNAS 95: 8910-8915, que é incorporado ao presente documento a título de referência em sua totalidade, que descreve a humanização do anticorpo anti- $\alpha\beta 3$  de camundongo identificando-se uma cadeia leve ou cadeia pesada complementar, respectivamente, de uma biblioteca de cadeias leves ou cadeias pesadas humanas,

resultando em variantes de anticorpo humanizadas tendo afinidades tão altas quanto a afinidade do anticorpo original. Consulte também Clackson T et al., (1991) Nature 352: 624-628, que é incorporado ao presente documento a título de referência em sua totalidade, que descreve métodos de produção de anticorpos que se ligam a um antígeno específico com o uso de um domínio VL específico (ou domínio VH) e realizar a triagem de uma biblioteca para os domínios variáveis complementares. A triagem produziu 14 novos parceiros para um domínio VH específico e 13 novos parceiros para um domínio VL específico, que eram ligantes fortes, conforme determinado por ELISA. Consulte também Kim SJ & Hong HJ, (2007) J Microbiol 45: 572-577, que é incorporado ao presente documento a título de referência em sua totalidade, que descreve métodos de produção de anticorpos que se ligam a um antígeno específico com o uso de um domínio VH específico e realizando a triagem de uma biblioteca (por exemplo, biblioteca VL humana) para domínios VL complementares; os domínios VL selecionados, por sua vez, podem ser usados para guiar a seleção de domínios VH complementares adicionais (por exemplo, humanos).

[0168] Em certos aspectos, as CDRs de um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo podem ser determinadas de acordo com o esquema de numeração de Chothia, que se refere à localização de alças estruturais de imunoglobulina (consulte, por exemplo, 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; e patente nº U.S. 7.709.226). Tipicamente, ao usar a convenção de numeração de Kabat, a alça CDR-H1 de Chothia está presente nos aminoácidos de cadeia pesada 26 a 32, 33 ou 34, a alça CDR-H2 de Chothia está presente nos aminoácidos de cadeia pesada 52 a 56, e a alça CDR-H3 de Chothia está presente nos aminoácidos de cadeia pesada 95 a 102, enquanto a alça CDR-L1 de Chothia está presente nos aminoácidos de cadeia leve 24 a 34, a alça CDR-L2 de Chothia está presente nos aminoácidos de cadeia leve 50 a 56, e a alça CDR-L3 de Chothia está presente nos aminoácidos de cadeia leve 89 a 97. O final da alça CDR-H1 de Chothia quando numerada com o uso da convenção de numeração de Kabat varia entre H32 e H34 dependendo do comprimento da alça (isto ocorre o esquema de

numeração de Kabat coloca as inserções em H35A e H35B; se nem 35A ou 35B estiverem presentes, a alça termina em 32; se apenas 35A estiver presente, as extremidades a alça termina em 33; se tanto 35A como 35B estiverem presentes, a alça termina em 34).

[0169] Em certos aspectos, são fornecidos no presente documento anticorpos e fragmentos de ligação ao antígeno dos mesmos que se ligam especificamente a B7-H4 (por exemplo, B7-H4 humano) e compreendem as CDRs de VH e VL de Chothia de um anticorpo listado nas Tabelas 3 e 4. Em certas modalidades, anticorpos ou fragmentos de ligação ao antígeno dos mesmos que se ligam especificamente a B7-H4 (por exemplo, B7-H4 humano) compreendem uma ou mais CDRs, em que as CDRs de Chothia e Kabat têm a mesma sequência de aminoácidos. Em certas modalidades, são fornecidos no presente documento anticorpos e fragmentos de ligação ao antígeno dos mesmos que se ligam especificamente a B7-H4 (por exemplo, B7-H4 humano) e compreendem combinações de CDRs de Kabat e CDRs de Chothia.

[0170] Em certos aspectos, as CDRs de um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo podem ser determinadas de acordo com o sistema de numeração de IMGT, conforme descrito em Lefranc M-P, (1999) *The Immunologist* 7: 132-136 e Lefranc M-P et al., (1999) *Nucleic Acids Res* 27: 209-212. De acordo com o esquema de numeração IMGT, VH-CDR1 se situa nas posições 26 a 35, VH-CDR2 se situa nas posições 51 a 57, VH-CDR3 se situa nas posições 93 a 102, VL-CDR1 se situa nas posições 27 a 32, VL-CDR2 se situa nas posições 50 a 52, e VL-CDR3 se situa nas posições 89 a 97. Numa modalidade particular, são fornecidos no presente documento anticorpos e fragmentos de ligação ao antígeno dos mesmos que se ligam especificamente a B7-H4 (por exemplo, B7-H4 humano) e compreendem as CDRs de VH e VL de IMGT de um anticorpo listado nas Tabelas 3 e 4, por exemplo, conforme descrito em Lefranc M-P (1999) supra e Lefranc M-P et al., (1999) supra).

[0171] Em certos aspectos, as CDRs de um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo podem ser determinadas de acordo com MacCallum RM et al., (1996) *J Mol Biol* 262: 732-745. Consulte também, por exemplo, Martin A. "Protein Sequence and Structure Analysis of Antibody Variable Domains", in

Antibody Engineering, Kontermann e Dübel, eds., Capítulo 31, páginas 422-439, Springer-Verlag, Berlim (2001). Numa modalidade particular, são fornecidos no presente documento anticorpos ou fragmentos de ligação ao antígeno dos mesmos que se ligam especificamente a B7-H4 (por exemplo, B7-H4 humano) e compreendem CDRs de VH e VL de um anticorpo listado nas Tabelas 3 e 4 conforme determinado pelo método em MacCallum RM et al.

[0172] Em certos aspectos, as CDRs de um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo podem ser determinadas de acordo com o esquema de numeração de AbM, que se refere a regiões hipervariáveis AbM que representam um compromisso entre as CDRs de Kabat e as alças estruturais de Chothia, e são usadas por software de modelagem de anticorpo AbM da Oxford Molecular (Oxford Molecular Group, Inc.). Numa modalidade particular, são fornecidos no presente documento anticorpos ou fragmentos de ligação ao antígeno dos mesmos que se ligam especificamente a B7-H4 (por exemplo, B7-H4 humano) e compreendem CDRs de VH e VL de um anticorpo listado nas Tabelas 3 e 4 conforme determinado pelo esquema de numeração de AbM.

[0173] Em aspectos específicos, são fornecidos no presente documento anticorpos que compreendem uma cadeia pesada e uma cadeia leve. Em relação à cadeia pesada, numa modalidade específica, a cadeia pesada de um anticorpo descrito no presente documento pode ser uma cadeia pesada alfa ( $\alpha$ ), delta ( $\delta$ ), épsilon ( $\epsilon$ ), gama ( $\gamma$ ) ou mu ( $\mu$ ). Em outra modalidade específica, a cadeia pesada de um anticorpo descrito pode compreender uma cadeia pesada alfa ( $\alpha$ ), delta ( $\delta$ ), épsilon ( $\epsilon$ ), gama ( $\gamma$ ) ou mu ( $\mu$ ) humana. Numa modalidade particular, um anticorpo descrito no presente documento, que se liga imunoespecificamente a B7-H4 (por exemplo, B7-H4 humano), compreende uma cadeia pesada em que a sequência de aminoácidos do domínio VH compreende uma sequência de aminoácidos apresentada na Tabela 3 e em que a região constante da cadeia pesada compreende a sequência de aminoácidos de uma região constante de cadeia pesada humana gama ( $\gamma$ ). Numa modalidade específica, um anticorpo descrito no presente documento, que se liga especificamente a B7-H4 (por exemplo, B7-H4 humano), compreende uma cadeia pesada em que a sequência de aminoácidos do domínio VH compreende uma sequência apresentada na Tabela 3, e em que a

região constante da cadeia pesada compreende o aminoácido de uma cadeia pesada humana descrita no presente documento ou conhecida na técnica. Exemplos não limitativos de sequências de região constante humana foram descritos na técnica, por exemplo, consulte a patente nº U.S. 5.693.780 e Kabat EA et al., (1991) supra.

[0174] Em relação à cadeia leve, numa modalidade específica, a cadeia leve de um anticorpo descrito no presente documento é uma cadeia leve kappa. A região constante de uma cadeia leve kappa humana pode compreender a seguinte sequência de aminoácidos:

[0175] RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDN  
ALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVT  
KSFNRGEC (SEQ ID NO:405).

[0176] A região constante de uma cadeia leve kappa humana pode ser codificada pela seguinte sequência de nucleotídeos:

[0177] CGGACCGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCGCCATCTGA  
TGAGCAGTTGAAATCTGGAACTGCCTCTGTTGTGCCTGCTGAATAACTTCT  
ATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGG  
GTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACA  
GCCTCAGCAGCACCCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAACACAAAGT  
CTACGCCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTGCCGTACAAAGAG  
CTTCAACAGGGGAGAGTGT (SEQ ID NO:406).

[0178] Em outra modalidade específica, a cadeia leve de um anticorpo descrito no presente documento é uma cadeia leve lambda. Em ainda outra modalidade específica, a cadeia leve de um anticorpo descrito no presente documento é uma cadeia leve kappa humana ou uma cadeia leve lambda humana. Numa modalidade particular, um anticorpo descrito no presente documento, que se liga imunoespecificamente a um polipeptídeo B7-H4 (por exemplo, B7-H4 humano) compreende uma cadeia leve em que a sequência de aminoácidos do domínio VL compreende uma sequência apresentada na Tabela 4, e em que a região constante da cadeia leve compreende a sequência de aminoácidos de uma região constante de cadeia leve kappa humana. Em outra modalidade particular, um anticorpo descrito no presente documento, que se liga imunoespecificamente a B7-H4 (por

exemplo, B7-H4 humano) compreende uma cadeia leve em que a sequência de aminoácidos do domínio VL compreende uma sequência apresentada na Tabela 4 e em que a região constante da cadeia leve compreende a sequência de aminoácidos de uma região constante de cadeia leve lambda humana. Numa modalidade específica, um anticorpo descrito no presente documento, que se liga imunoespecificamente a B7-H4 (por exemplo, B7-H4 humano) compreende uma cadeia leve em que a sequência de aminoácidos do domínio VL compreende uma sequência apresentada na Tabela 4 e em que a região constante da cadeia leve compreende a sequência de aminoácidos de uma região constante de cadeia leve kappa ou lambda humana. Exemplos não limitativos de sequências de região constante humana foram descritos na técnica, por exemplo, consulte a patente nº U.S. 5.693.780 e Kabat EA et al., (1991) supra.

[0179] Numa modalidade específica, um anticorpo descrito no presente documento, que se liga imunoespecificamente a B7-H4 (por exemplo, B7-H4 humano) compreende um domínio VH e um domínio VL que compreende qualquer sequência de aminoácidos descrita no presente documento, e em que as regiões constantes compreendem as sequências de aminoácidos das regiões constantes de uma molécula de imunoglobulina IgG, IgE, IgM, IgD, IgA ou IgY, ou uma molécula de imunoglobulina IgG, IgE, IgM, IgD, IgA ou IgY humana. Em outra modalidade específica, um anticorpo descrito no presente documento, que se liga imunoespecificamente a B7-H4 (por exemplo, B7-H4 humano) compreende um domínio VH e um domínio VL que compreende qualquer sequência de aminoácidos descrita no presente documento, e em que as regiões constantes compreendem as sequências de aminoácidos das regiões constantes de uma molécula de imunoglobulina IgG, IgE, IgM, IgD, IgA ou IgY, qualquer classe (por exemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2) ou qualquer subclasse (por exemplo, IgG2a e IgG2b) da molécula de imunoglobulina. Numa modalidade particular, as regiões constantes compreendem as sequências de aminoácidos das regiões constantes de uma molécula de imunoglobulina IgG, IgE, IgM, IgD, IgA ou IgY humana, qualquer classe (por exemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, e IgA2), ou qualquer subclasse (por exemplo, IgG2a e IgG2b) de molécula de imunoglobulina.

[0180] A região constante de uma cadeia pesada IgG1 humana pode

compreender a seguinte sequência de aminoácidos:

[0181] ASTKGPSVPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA  
 LTSGVHTFPALQSSGLYSLSSVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEP  
 KSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPDKTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE  
 VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLVLHQDWLNGKEYKCKVSN  
 KALPAPIEKTIISKAKGQPREPQVTLPSSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW  
 ESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHN  
 HYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:407).

[0182] A região constante de uma cadeia pesada IgG<sub>1</sub> humana pode ser codificada pela seguinte sequência de nucleotídeos:

[0183] GCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCT  
 CCAAGAGCACCTCTGGGGCACAGCGGCCCTGGCTGCCTGGTCAAGGACT  
 ACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTGGAACTCAGGCCTCAGGACTCTACTCCCTCAG  
 GCGTGCACACCTCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAG  
 CAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTGGCACCCAGACCTACATCTG  
 CAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCC  
 AAATCTTGTGACAAAACTCACACATGCCACCCTGCCAGCACCTGAACTCC  
 TGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCAAAACCCAAGGACACCCCTCAT  
 GATCTCCCGAACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGACGTGAGCCACGA  
 AGACCCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAAT  
 GCCAAGACAAAGCCGGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGGGTGGTC  
 AGCGTCCTCACCGTCCGTGACCAAGGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAG  
 TGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCA  
 AAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCAAGGTGTACACCCTGCCCTCATCCC  
 GGGATGAGCTGACCAAGAACCAAGGGACTGGCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCT  
 TCTATCCCAGCGACATGCCGTGGAGTGGAGAGCAATGGCAGCCGGAGA  
 ACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGGACTCCGACGGCTCCTCTTCT  
 CTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGAACGTCTT  
 CTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCAACTACACGCAGAAGAGC  
 CTCTCCCTGTCTCCGGTAAA. (SEQ ID NO:408)

[0184] Exemplos não limitativos de regiões constantes humanas são descritos na técnica, por exemplo, *consulte Kabat EA et al., (1991) supra.*

[0185] Em certas modalidades, uma, duas ou mais mutações (por exemplo, substituições de aminoácidos) são introduzidas na região Fc de um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo descrito no presente documento (por exemplo, domínio CH2 (resíduos 231-340 da IgG<sub>1</sub> humana) e/ou domínio CH3 (resíduos 341-447 da IgG<sub>1</sub> humana) e/ou a região de dobradiça, com numeração de acordo com o sistema de numeração de Kabat (por exemplo, o índice EU em Kabat)) para alterar uma ou mais propriedades funcionais do anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, tal como meia-vida sérica, fixação de complemento, ligação de receptor Fc e/ou citotoxicidade celular dependente de antígeno.

[0186] Em certas modalidades, uma, duas ou mais mutações (por exemplo, substituições de aminoácidos) são introduzidas na região de dobradiça da região Fc (domínio CH1) de modo que o número de resíduos de cisteína na região de dobradiça sejam alterados (por exemplo, aumentados ou diminuídos) conforme descrito, por exemplo, na patente nº U.S. 5.677.425. O número de resíduos de cisteína na região de dobradiça do domínio CH1 pode ser alterado, por exemplo, para facilitar a montagem das cadeias leves e pesadas, ou para alterar (por exemplo, aumentar ou diminuir) a estabilidade do anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo.

[0187] Em algumas modalidades, uma, duas ou mais mutações (por exemplo, substituições de aminoácidos) são introduzidas na região Fc de um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo descrito no presente documento (por exemplo, domínio CH2 (resíduos 231-340 de IgG<sub>1</sub> humana) e/ou domínio CH3 (resíduos 341-447 de IgG<sub>1</sub> humana) e/ou a região de dobradiça, com numeração de acordo com o sistema de numeração de Kabat (por exemplo, o índice EU em Kabat)) para aumentar ou diminuir a afinidade do anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo para um receptor Fc (por exemplo, um receptor Fc ativado) na superfície de uma célula efetora. As mutações na região Fc que diminuem ou aumentam a afinidade com um receptor Fc e técnicas para introduzir tais mutações no receptor Fc ou fragmento da mesma são conhecidas por uma pessoa versada na técnica. Exemplos de mutações no receptor Fc que podem ser realizadas para alterar a afinidade do anticorpo ou fragmento de ligação

ao antígeno do mesmo para um receptor Fc são descritos, por exemplo, em Smith P et al., (2012) PNAS 109: 6181-6186, patente nº U.S. 6.737.056, e publicação internacional nº WO 02/060919; WO 98/23289; e WO 97/34631, que são incorporados no presente documento a título de referência.

[0188] Numa modalidade específica, uma, duas ou mais mutações de aminoácidos (isto é, substituições, inserções ou deleções) são introduzidas num domínio constante IgG, ou fragmento de ligação ao FcRn do mesmo (de preferência, um fragmento de domínio Fc ou dobradiça-Fc) para alterar (por exemplo, diminuir ou aumentar) a meia-vida do anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo *in vivo*. Consulte, por exemplo, publicação internacional nº WO 02/060919; WO 98/23289; e WO 97/34631; e patentes nº U.S. 5.869.046, 6.121.022, 6.277.375 e 6.165.745 para exemplos de mutações que irão alterar (por exemplo, diminuir ou aumentar) a meia-vida de um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo *in vivo*. Em algumas modalidades, uma, duas ou mais mutações de aminoácidos (isto é, substituições, inserções ou deleções) são introduzidas num domínio constante IgG, ou fragmento de ligação ao FcRn do mesmo (de preferência, um fragmento de domínio Fc ou dobradiça-Fc) para diminuir a meia-vida do anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo *in vivo*. Em outras modalidades, uma, duas ou mais mutações de aminoácidos (isto é, substituições, inserções ou deleções) são introduzidas num domínio constante IgG, ou fragmento de ligação ao FcRn do mesmo (de preferência, um fragmento de domínio Fc ou dobradiça-Fc) para aumentar a meia-vida do anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo *in vivo*. Numa modalidade específica, os anticorpos ou fragmentos de ligação ao antígeno dos mesmos podem ter uma ou mais mutações de aminoácidos (por exemplo, substituições) no segundo domínio constante (CH2) (resíduos 231-340 de IgG1 humana) e/ou o terceiro domínio constante (CH3) (resíduos 341-447 de IgG1 humana), com numeração de acordo com o índice EU em Kabat (Kabat EA et al., (1991) supra). Numa modalidade específica, a região constante da IgG1 compreende uma substituição de metionina (M) por tirosina (Y) na posição 252, uma substituição de serina (S) por treonina (T) na posição 254, e uma substituição de treonina (T) por ácido glutâmico (E) na posição 256, numerada de acordo com o índice EU como em Kabat. Consulte a

patente nº U.S. 7.658.921, que é incorporada ao presente documento a título de referência. Este tipo de IgG mutante, chamado de “mutante YTE” foi mostrado para exibir meia-vida aumentada quatro vezes em comparação com as versões do tipo selvagem do mesmo anticorpo (consulte Dall’Acqua WF et al., (2006) J Biol Chem 281: 23514-24. Em certas modalidades, um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo compreende um domínio constante IgG que compreende uma, duas, três ou mais substituições de aminoácidos de resíduos de aminoácidos nas posições 251-257, 285-290, 308-314, 385-389, e 428-436, numeradas de acordo com o índice EU como em Kabat.

[0189] Numa modalidade adicional, uma, duas ou mais substituições de aminoácidos são introduzidas numa região Fc de domínio constante IgG para alterar a função (ou funções) efetora do anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo. Por exemplo, um ou mais aminoácidos selecionados dentre resíduos de aminoácidos 234, 235, 236, 237, 297, 318, 320 e 322, numerados de acordo com o índice EU como em Kabat, podem ser substituídos por um resíduo de aminoácido diferente, de modo que o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo tenha uma afinidade alterada para um ligante efetor, porém mantenha a capacidade de ligação ao antígeno do anticorpo original. O ligante efetor no qual a afinidade é alterada pode ser, por exemplo, um receptor Fc ou o componente C1 do complemento. Esta abordagem é descrita em mais detalhes nas patentes nº U.S. 5.624.821 e 5.648.260. Em algumas modalidades, a deleção ou inativação (através de mutações pontuais ou outros meios) de um domínio de região constante pode reduzir a ligação ao receptor Fc do anticorpo circulante ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo aumentando assim a localização do tumor. Consulte, por exemplo, as patentes nº U.S. 5.585.097 e 8.591.886 para uma descrição das mutações que deletam ou inativam o domínio constante e aumentam assim a localização do tumor. Em certas modalidades, uma ou mais substituições de aminoácidos podem ser introduzidas na região Fc para remover sítios de glicosilação potenciais na região Fc, que podem reduzir a ligação ao receptor Fc (consulte, por exemplo, Shields RL et al., (2001) J Biol Chem 276: 6591-604.

[0190] Em certas modalidades, um ou mais aminoácidos selecionados dentre os resíduos de aminoácidos 329, 331 e 322 na região constante, numerados

de acordo com o índice EU como em Kabat, podem ser substituídos por um resíduo de aminoácido diferente, de modo que o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo tenha alterado a ligação C1q e/ou reduzido ou abolido a citotoxicidade dependente de complemento (CDC). Esta abordagem é descrita em mais detalhes na patente nº U.S. 6.194.551 (Idusogie et al). Em algumas modalidades, um ou mais resíduos de aminoácidos nas posições de aminoácidos 231 a 238 na região N-terminal do domínio CH2 são alterados para, deste modo alterar a capacidade de o anticorpo fixar o complemento. Esta abordagem é adicionalmente descrita na publicação internacional nº WO 94/29351. Em certas modalidades, a região Fc é modificada para aumentar a capacidade de o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo mediar a citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC) e/ou aumentar a afinidade do anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo para um receptor Fcγ ao realizar a mutação de um ou mais aminoácidos (por exemplo, introduzindo substituições de aminoácidos) nas seguintes posições: 238, 239, 248, 249, 252, 254, 255, 256, 258, 265, 267, 268, 269, 270, 272, 276, 278, 280, 283, 285, 286, 289, 290, 292, 293, 294, 295, 296, 298, 301, 303, 305, 307, 309, 312, 315, 320, 322, 324, 326, 327, 328, 329, 330, 331, 333, 334, 335, 337, 338, 340, 360, 373, 376, 378, 382, 388, 389, 398, 414, 416, 419, 430, 434, 435, 437, 438 ou 439, numeradas de acordo com o índice EU como em Kabat. Esta abordagem é adicionalmente descrita na publicação internacional nº WO 00/42072.

[0191] Em certas modalidades, um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo descrito no presente documento compreende o domínio constante de uma IgG1 com uma mutação (por exemplo, substituição) na posição 267, 328, ou uma combinação dos mesmos, numerada de acordo com o índice EU como em Kabat. Em certas modalidades, um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo descrito no presente documento compreende o domínio constante de uma IgG1 com uma mutação (por exemplo, substituição) selecionada do grupo que consiste em S267E, L328F, e uma combinação dos mesmos. Em certas modalidades, um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo descrito no presente documento compreende o domínio constante de uma IgG1 com uma mutação S267E/L328F (por exemplo, substituição). Em certas

modalidades, um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo descrito no presente documento que compreende o domínio constante de uma IgG1 com uma mutação S267E/L328F (por exemplo, substituição) tem uma afinidade aumentada para Fc $\gamma$ RIIA, Fc $\gamma$ RIIB, ou Fc $\gamma$ RIIA e Fc $\gamma$ RIIB.

[0192] Os anticorpos com teor de fucose reduzido foram relatados tendo uma afinidade aumentada para receptores Fc, tal como, por exemplo, Fc $\gamma$ RIIIA. Consequentemente, em certas modalidades, um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo descrito no presente documento tem teor de fucose reduzido ou não tem fucose (isto é, é “afucosilado”). Tais anticorpos ou fragmentos de ligação ao antígeno dos mesmos podem ser produzidos com o uso de técnicas conhecidas por uma pessoa versada na técnica. Por exemplo, eles podem ser expressados em células deficientes ou sem a capacidade de fucosilação. Num exemplo específico, as linhagens celulares com um *knockout* e ambos os alelos de uma  $\alpha$ 1,6-fucosiltransferase podem ser usadas para produzir anticorpos ou fragmentos de ligação ao antígeno dos mesmos com teor de fucose reduzido. O sistema Potelligent® (Lonza) é um exemplo de tal sistema que pode ser usado para produzir anticorpos e fragmentos de ligação ao antígeno dos mesmos com teor de fucose reduzido. Alternativamente, anticorpos ou fragmentos de ligação ao antígeno dos mesmos com teor de fucose reduzido ou sem teor de fucose podem ser produzidos, por exemplo: (i) cultivando-se células sob condições que impedem ou reduzem a fucosilação; (ii) remoção pós-traducional de fucose (por exemplo, com uma enzima fucosidase); (iii) adição pós-traducional do carboidrato desejado, por exemplo, após a expressão recombinante de uma glicoproteína não glicosilada; ou (iv) purificação da glicoproteína a fim de selecionar anticorpos ou fragmentos de ligação ao antígeno dos mesmos que não são fucosilados. Consulte, por exemplo, Longmore GD & Schachter H (1982) Carbohydr Res 100: 365-92 e Imai-Nishiya H et al., (2007) BMC Biotechnol. 7: 84 para métodos para produzir anticorpos dos mesmos sem teor de fucose ou com teor de fucose reduzido. Consulte também o Exemplo 8 no presente documento que descreve a produção de anticorpos B7-H4 afucosilados.

[0193] Em algumas modalidades, o anticorpo B7-H4 ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo melhorou a atividade de ADCC *in vitro* em comparação com

os anticorpos B7-H4 fucosilados ou fragmentos de ligação ao antígeno dos mesmos que têm a mesma sequência de aminoácidos. Em algumas modalidades, os anticorpos B7-H4 afucosilados ou fragmentos de ligação ao antígeno dos mesmos causam a lise específica que é pelo menos 10, pelo menos 15, pelo menos 20, pelo menos 25, pelo menos 30, pelo menos 35, pelo menos 40, pelo menos 45, pelo menos 50, pelo menos 60, pelo menos 65, pelo menos 70 ou pelo menos 75 pontos percentuais maior que a lise específica com anticorpos B7-H4 fucosilados.

[0194] Em algumas modalidades, o anticorpo B7-H4 ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo tem afinidade melhorada para RIIIA gama Fc em comparação com anticorpos B7-H4 fucosilados ou fragmentos de ligação ao antígeno dos mesmos que têm a mesma sequência de aminoácidos. Em algumas modalidades, os anticorpos B7-H4 afucosilados ou fragmentos de ligação ao antígeno dos mesmos se ligam a RIIIA gama Fc com afinidade pelo menos 2 vezes, pelo menos 3 vezes, pelo menos 4 vezes, pelo menos 5 vezes, pelo menos 7 vezes, pelo menos 10 vezes, pelo menos 12 vezes, pelo menos 15 vezes, pelo menos 17 vezes ou pelo menos 20 vezes maior que os anticorpos B7-H4 fucosilados ou fragmentos de ligação ao antígeno dos mesmos. Em algumas modalidades, afinidade com RIIIA gama Fc é determinada com o uso de ressonância de plásmon de superfície. Em algumas modalidades, RIIIA gama Fc é selecionado dentre RIIIA(V158) gama Fc e RIIIA(F158) gama Fc. Em algumas modalidades, RIIIA gama Fc(V158) é RIIIA gama Fc.

[0195] Em algumas modalidades, a presença de fucose pode ser determinada por um método que compreende cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC), eletroforese capilar ou espectrometria de massa MALDI-TOF.

[0196] Em modalidades específicas, um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo (i) compreende as sequências CDR de 20502 (por exemplo, as sequências de aminoácidos das SEQ ID NOs:458-463), as sequências VH e VL de 20502 (as sequências de aminoácidos das SEQ ID NOs:464 e 42, respectivamente), ou as sequências de cadeia pesada e cadeia leve de 20502 (as sequências de aminoácidos das SEQ ID NOs:469 e 44, respectivamente) e (ii) é afucosilado.

[0197] Em modalidades específicas, uma composição compreende anticorpos ou fragmentos de ligação ao antígeno dos mesmos que (i) compreende as sequências CDR de 20502 (por exemplo, as sequências de aminoácidos das SEQ ID NOs:458-463), as sequências VH e VL de 20502 (as sequências de aminoácidos das SEQ ID NOs:464 e 42, respectivamente), ou as sequências de cadeia leve ou pesada de 20502 (as sequências de aminoácidos das SEQ ID NOs:469 e 44, respectivamente) e (ii) são afucosilados, por exemplo, em que pelo menos 95% dos anticorpos na composição são afucosilados ou em que a fucosilação é indetectável na composição.

[0198] Em modalidades específicas, um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo (i) compreende as sequências CDR de 20502,1 (por exemplo, as sequências de aminoácidos das SEQ ID NOs:35-40), as sequências VH e VL de 20502,1 (as sequências de aminoácidos das SEQ ID NOs:41 e 42, respectivamente), ou as sequências de cadeia pesada e cadeia leve de 20502,1 (as sequências de aminoácidos das SEQ ID NOs:43 e 44, respectivamente) e (ii) é afucosilado.

[0199] Em modalidades específicas, uma composição compreende anticorpos ou fragmentos de ligação ao antígeno dos mesmos que (i) compreende as sequências CDR de 20502,1 (por exemplo, as sequências de aminoácidos das SEQ ID NOs:35-40), as sequências VH e VL de 20502,1 (as sequências de aminoácidos das SEQ ID NOs:41 e 42, respectivamente), ou as sequências de cadeia leve ou pesada de 20502,1 (as sequências de aminoácidos das SEQ ID NOs:43 e 44, respectivamente) e (ii) são afucosilados, por exemplo, em que pelo menos 95% dos anticorpos na composição são afucosilados ou em que a fucosilação é indetectável na composição.

[0200] Em modalidades específicas, um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo (i) compreende as sequências CDR de 22213 (por exemplo, as sequências de aminoácidos das SEQ ID NOs:65-70), as sequências VH e VL de 22213 (as sequências de aminoácidos das SEQ ID NOs:71 e 72, respectivamente), ou as sequências de cadeia pesada e cadeia leve de 22213 (as sequências de aminoácidos das SEQ ID NOs:73 e 74, respectivamente) e (ii) é afucosilado.

[0201] Em modalidades específicas, uma composição compreende

anticorpos ou fragmentos de ligação ao antígeno dos mesmos que (i) compreende as sequências CDR de 22213 (por exemplo, as sequências de aminoácidos das SEQ ID NOs:65-70), as sequências VH e VL de 22213 (as sequências de aminoácidos das SEQ ID NOs:71 e 72, respectivamente), ou as sequências de cadeia leve ou pesada de 22213 (as sequências de aminoácidos das SEQ ID NOs:73 e 74, respectivamente) e (ii) são afucosilados, por exemplo, em que pelo menos 95% dos anticorpos na composição são afucosilados ou em que a fucosilação é indetectável na composição.

[0202] As glicoformas geneticamente modificadas podem ser úteis para uma variedade de propósitos, incluindo, porém sem limitação, aumentar ou reduzir a função efetora. Os métodos para gerar glicoformas geneticamente modificadas num anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo descrito no presente documento incluem, porém sem limitação aqueles revelados, por exemplo, em 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; patentes nº U.S. 6.602.684; 6.946.292; e 7.214.775; publicações de patente nº U.S. 2007/0248600; 2007/0178551; 2008/0060092; e 2006/0253928; publicações internacionais nº WO 00/61739; WO 01/292246; WO 02/311140; e WO 02/30954; tecnologia Potillegent™ (Biowa, Inc. Princeton, N.J.); e tecnologia de modificação genética por glicosilação GlycoMAb® (Glycart biotechnology AG, Zurique, Suíça). Consulte também, por exemplo, Ferrara C et al., (2006) Biotechnol Bioeng 93: 851-861; publicações internacionais nº WO 07/039818; WO 12/130831; WO 99/054342; WO 03/011878; e WO 04/065540.

[0203] Em certas modalidades, qualquer uma das mutações ou modificações de região constante descritas no presente documento pode ser introduzida numa ou ambas as regiões constantes de cadeia pesada de um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo descrito no presente documento tendo duas regiões constantes de cadeia pesada.

[0204] Em outra modalidade particular, um anticorpo ou fragmento de ligação

ao antígeno do mesmo descrito no presente documento, que se liga imunoespecificamente a B7-H4 (por exemplo, B7-H4 humano), compreende uma cadeia pesada e uma cadeia leve, em que (i) a cadeia pesada compreende um domínio VH que compreende as sequências de aminoácidos CDR1 de VH, CDR2 de VL e CDR3 de VL de um anticorpo listado na Tabela 1 (por exemplo, SEQ ID NOs:458-460, 35-37, ou 65-67); (ii) a cadeia leve compreende um domínio VL que compreende as sequências de aminoácidos de CDR1 de VL, CDR2 de VH e CDR3 de VH do mesmo anticorpo listado na Tabela 2 (por exemplo, SEQ ID NOs:461-463, 38-40, ou 68-70); (iii); e a cadeia pesada compreende ainda um domínio de cadeia pesada constante que compreende a sequência de aminoácidos do domínio constante de uma cadeia pesada de IgG1 humana (iv); a cadeia leve compreende ainda um domínio de cadeia leve constante que compreende a sequência de aminoácidos do domínio constante de uma cadeia leve kappa humana.

[0205] Em outra modalidade particular, um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo descrito no presente documento, que se liga imunoespecificamente a B7-H4 (por exemplo, B7-H4 humano), compreende uma cadeia pesada e uma cadeia leve, em que (i) a cadeia pesada compreende um domínio VH que compreende a sequência de aminoácidos de um anticorpo listado na Tabela 3 (por exemplo, SEQ ID NO:464, 41, ou 71); (ii) a cadeia leve compreende um domínio VL que compreende a sequência de aminoácidos do mesmo anticorpo listado na Tabela 4 (por exemplo, SEQ ID NO:42 ou 73); (iii); e a cadeia pesada compreende ainda um domínio de cadeia pesada constante que compreende a sequência de aminoácidos do domínio constante de um cadeia pesada de IgG1 humana (iv); a cadeia leve compreende ainda um domínio de cadeia leve constante que compreende a sequência de aminoácidos do domínio constante de uma cadeia leve kappa humana.

[0206] Em modalidades específicas, um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo descrito no presente documento, que se liga imunoespecificamente a B7-H4 (por exemplo, B7-H4 humano) exibe atividade de bloqueio de ponto de verificação de célula T. Métodos exemplificativos de medição da atividade de bloqueio de ponto de verificação de célula T são fornecidos no presente documento nos Exemplos 7 e 11. Em modalidades específicas, um

anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo descrito no presente documento, que se liga imunoespecificamente a B7-H4 (por exemplo, B7-H4 humano) aumenta a produção de interferon gama (IFNy) em células T. Métodos exemplificativos de medição da produção de IFNy são fornecidos no presente documento nos Exemplos 7 e 11. Em modalidades específicas, um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo descrito no presente documento, que se liga imunoespecificamente a B7-H4 (por exemplo, B7-H4 humano) aumenta a proliferação de células T. Métodos exemplificativos de medição da proliferação de células T são fornecidos no presente documento no Exemplo 7. Em modalidades específicas, um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo descrito no presente documento, que se liga imunoespecificamente a B7-H4 (por exemplo, B7-H4 humano) aumenta a proliferação de células T CD4+. Métodos exemplificativos de medição da proliferação de células T CD4+ são fornecidos no presente documento no Exemplo 7. Em modalidades específicas, um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo descrito no presente documento, que se liga imunoespecificamente a B7-H4 (por exemplo, B7-H4 humano) aumenta a proliferação de células T CD8+. Métodos exemplificativos de medição da proliferação de células T CD8+ são fornecidos no presente documento no Exemplo 7.

[0207] Em modalidades específicas, um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo descrito no presente documento, que se liga imunoespecificamente a B7-H4 (por exemplo, B7-H4 humano) exibe atividade de citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC). Em modalidades específicas, um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo descrito no presente documento, que se liga imunoespecificamente a B7-H4 (por exemplo, B7-H4 humano) exibe atividade de citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC) em linhagens celulares com pelo menos 300000 moléculas B7-H4 de superfície celular (por exemplo, células SK-BR-3). Em modalidades específicas, um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo descrito no presente documento, que se liga imunoespecificamente a B7-H4 (por exemplo, B7-H4 humano) exibe atividade de citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC) em linhagens celulares com pelo menos 100000 moléculas B7-H4 de superfície

celular (por exemplo, células HCC 1569). Em modalidades específicas, um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo descrito no presente documento, que se liga imunoespecificamente a B7-H4 (por exemplo, B7-H4 humano) exibe atividade de citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC) em linhagens celulares com pelo menos 50000 moléculas B7-H4 de superfície celular (por exemplo, células ZR-75-1). Em modalidades específicas, um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo descrito no presente documento, que se liga imunoespecificamente a B7-H4 (por exemplo, B7-H4 humano) exibe atividade de citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC) em linhagens celulares com pelo menos 30000 moléculas B7-H4 de superfície celular (por exemplo, células MDA-MB-468). Em modalidades específicas, um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo descrito no presente documento, que se liga imunoespecificamente a B7-H4 (por exemplo, B7-H4 humano) exibe atividade de citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC) em linhagens celulares com pelo menos 15000 moléculas B7-H4 de superfície celular (por exemplo, células HCC1964). São fornecidos métodos exemplificativos de medição de atividade de ADCC no presente documento no Exemplo 13.

[0208] Em modalidades específicas, um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo descrito no presente documento, que se liga imunoespecificamente a B7-H4 (por exemplo, B7-H4 humano), compreende regiões de framework (por exemplo, regiões de framework do domínio VH e/ou domínio VL) que são regiões de framework humanas ou derivadas de regiões de framework humanas. Exemplos não limitativos de regiões de framework humanas são descritos na técnica, por exemplo, consulte Kabat EA et al., (1991) supra). Em certas modalidades, um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo descrito no presente documento compreende regiões de framework (por exemplo, regiões de framework do domínio VH e/ou domínio VL) que são regiões de framework de primata (por exemplo, primata não humano) ou regiões de framework derivadas de primata (por exemplo, primata não humano).

[0209] Em certas modalidades, um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo descrito no presente documento, que se liga especificamente a B7-H4 (por exemplo, B7-H4 humano), compreende uma, duas ou mais regiões

de framework de VH (FRs) que têm as sequências de aminoácidos descritas no presente documento para um anticorpo apresentado na Tabela 5, supra (por exemplo, SEQ ID NOs: 465, 466, 467, e/ou 469; SEQ ID NOs:235, 236, 237 e/ou 238; ou SEQ ID NOs:265, 266, 267, e/ou 268). Em algumas modalidades, um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo descrito no presente documento, que se liga especificamente a B7-H4 (por exemplo, B7-H4 humano), compreende uma, duas ou mais regiões de framework de VL (FRs) que têm as sequências de aminoácidos descritas no presente documento para um anticorpo apresentado na Tabela 6, supra (por exemplo, SEQ ID NOs:239, 240, 241, e/ou 242 ou SEQ ID NOs:269, 270, 271, e/ou 272). Em modalidades específicas, um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo descrito no presente documento, que se liga especificamente a B7-H4 (por exemplo, B7-H4 humano), compreende uma, duas ou mais regiões de framework de VH que têm as sequências de aminoácidos descritas no presente documento para um anticorpo apresentado na Tabela 5, supra, e uma, duas ou mais regiões de framework de VL que têm as sequências de aminoácidos descritas no presente documento para o mesmo anticorpo apresentado na Tabela 6, supra (por exemplo, (i) SEQ ID NOs: 465, 466, 467, e/ou 469 e SEQ ID NOs:239, 240, 241, e/ou 242; (ii) SEQ ID NOs:235, 236, 237 e/ou 238 e SEQ ID NOs:239, 240, 241, e/ou 242 ou (iii) SEQ ID NOs:265, 266, 267, e/ou 268 e SEQ ID NOs:269, 270, 271, e/ou 272).

[0210] Em certas modalidades, um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo descrito no presente documento, que se liga especificamente a B7-H4 (por exemplo, B7-H4 humano), compreende regiões de framework de VH (FRs) que têm pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95% ou pelo menos 98% de identidade de sequência com as regiões de framework de VH descritas no presente documento na Tabela 5, supra. Em certas modalidades, um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo descrito no presente documento, que se liga especificamente a B7-H4 (por exemplo, B7-H4 humano), compreende regiões de framework de VL (FRs) que têm pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95% ou pelo menos 98% de identidade de sequência com as regiões de framework de VL descritas no presente

documento na Tabela 6, supra. Em algumas modalidades, um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo descrito no presente documento, que se liga especificamente a B7-H4 (por exemplo, B7-H4 humano), compreende regiões de framework de VH (FRs) que têm pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95% ou pelo menos 98% de identidade de sequência com as regiões de framework de VH descritas no presente documento na Tabela 5, supra, e regiões de framework de VL (FRs) que têm pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95% ou pelo menos 98% de identidade de sequência com as regiões de framework de VL descritas no presente documento na Tabela 6, supra.

[0211] Em certas modalidades, um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo descrito no presente documento, que se liga imunoespecificamente a B7-H4 (por exemplo, B7-H4 humano), compreende um domínio VH que tem pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95% ou pelo menos 98% de identidade de sequência com a sequência de aminoácidos do domínio VH de 20502 ou 22213 (por exemplo, SEQ ID NO:464 ou 71), em que o anticorpo compreende CDRs de VH que são idênticas às CDRs de VH de 20502 ou 22213 (por exemplo, SEQ ID NOs:458-460 ou 65-67).

[0212] Em certas modalidades, um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo descrito no presente documento, que se liga imunoespecificamente a B7-H4 (por exemplo, B7-H4 humano), compreende um domínio VL que tem pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95% ou pelo menos 98% de identidade de sequência com a sequência de aminoácidos do domínio VL de 20502 ou 22213 (por exemplo, SEQ ID NO:42 ou 72), em que o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo compreende CDRs de VL que são idênticas às CDRs de VL de 20502 ou 22213 (por exemplo, SEQ ID NO:461-463 ou 68-70).

[0213] Em certas modalidades, um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo descrito no presente documento, que se liga imunoespecificamente a B7-H4 (por exemplo, B7-H4 humano), compreende: (i) um

domínio VH que tem pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95% ou pelo menos 98% de identidade de sequência com a sequência de aminoácidos do domínio VH de 20502 ou 22213 (por exemplo, SEQ ID NO:464 ou 71); e (ii) um domínio VL que tem pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95% ou pelo menos 98% de identidade de sequência com a sequência de aminoácidos do domínio VL de 20502 ou 22213 (por exemplo, SEQ ID NO:42 ou 72), em que o anticorpo compreende CDRs de VH e as CDRs de VL que são idênticas às CDRs de VH e CDRs de VL de 20502 ou 22213 (por exemplo, SEQ ID NOs:458-463 ou SEQ ID NOs:65-70).

[0214] Em outro aspecto, são fornecidos no presente documento anticorpos ou fragmentos de ligação ao antígeno dos mesmos que se ligam ao mesmo epítopo de B7-H4 (por exemplo, um epítopo de B7-H4 humano) como um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo descrito no presente documento (por exemplo, 20502 ou 22213).

[0215] Em certas modalidades, um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo descrito no presente documento, que se liga imunoespecificamente a B7-H4 (por exemplo, B7-H4 humano), compreende um domínio VH que tem pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95% ou pelo menos 98% de identidade de sequência com a sequência de aminoácidos do domínio VH de 20502.1 ou 22213 (por exemplo, SEQ ID NO:41 ou 71), em que o anticorpo compreende CDRs de VH que são idênticas às CDRs de VH de 20502.1 ou 22213 (por exemplo, SEQ ID NOs: 35-37 ou 65-67).

[0216] Em certas modalidades, um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo descrito no presente documento, que se liga imunoespecificamente a B7-H4 (por exemplo, B7-H4 humano), compreende um domínio VL que tem pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95% ou pelo menos 98% de identidade de sequência com a sequência de aminoácidos do domínio VL de 20502.1 ou 22213 (por exemplo, SEQ ID NO:42 ou 72), em que o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo compreende CDRs de VL que são idênticas às

CDRs de VL de 20502,1 ou 22213 (por exemplo, SEQ ID NO:38-40 ou 68-70).

[0217] Em certas modalidades, um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo descrito no presente documento, que se liga imunoespecificamente a B7-H4 (por exemplo, B7-H4 humano), compreende: (i) um domínio VH que tem pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95% ou pelo menos 98% de identidade de sequência com a sequência de aminoácidos do domínio VH de 20502,1 ou 22213 (por exemplo, SEQ ID NO:41 ou 71); e (ii) um domínio VL que tem pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95% ou pelo menos 98% de identidade de sequência com a sequência de aminoácidos do domínio VL de 20502,1 ou 22213 (por exemplo, SEQ ID NO:42 ou 72), em que o anticorpo compreende CDRs de VH e as CDRs de VL que são idênticas às CDRs de VH e CDRs de VL de 20502,1 ou 22213 (por exemplo, SEQ ID NOs:35-40 ou SEQ ID NOs:65-70).

[0218] Em outro aspecto, são fornecidos no presente documento anticorpos ou fragmentos de ligação ao antígeno dos mesmos que se ligam ao mesmo epítopo de B7-H4 (por exemplo, um epítopo de B7-H4 humano) como um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo descrito no presente documento (por exemplo, 20502,1 ou 22213).

[0219] Ensaios de ligação por competição podem ser usados para determinar se dois anticorpos se ligam aos epítopos sobrepostos. A ligação competitiva pode ser determinada num ensaio no qual a imunoglobulina sob teste inibe a ligação específica de um anticorpo de referência a um antígeno comum, tal como B7-H4. Vários tipos de ensaios de ligação competitiva são conhecidos, por exemplo: radioimunoensaio direto ou indireto em fase sólida (RIA), imunoensaio de enzima direto ou indireto em fase sólida (EIA), ensaio de competição em sanduíche (consulte Stahli C et al., (1983) Methods Enzymol 9: 242-253); EIA de biotina-avidina direto em fase sólida (consulte Kirkland TN et al., (1986) J Immunol 137: 3614-9); ensaio identificado direto em fase sólida, ensaio em sanduíche identificado direto em fase sólida (consulte Harlow E & Lane D, (1988) Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press); RIA de identificação direto em fase sólida com o uso de identificação I-125 (consulte Morel GA et al., (1988) Mol Immunol 25(1): 7-

15); EIA de biotina-avidina direto em fase sólida (Cheung RC et al., (1990) Virology 176: 546-52); e RIA identificado direto. (Moldenhauer G et al., (1990) Scand J Immunol 32: 77-82. Tipicamente, tal ensaio envolve o uso de antígeno purificado (por exemplo, B7-H4, tal como B7-H4 humano) ligado a uma superfície sólida ou células contendo qualquer um destes, uma imunoglobulina de teste não identificada e uma imunoglobulina de referência identificada. A inibição competitiva pode ser medida determinando-se a quantidade de identificação ligada à superfície sólida ou células na presença da imunoglobulina de teste. Geralmente a imunoglobulina de teste está presente em excesso. Geralmente, quando um anticorpo competitivo está presente em excesso, o mesmo irá inibir a ligação específica de um anticorpo de referência a um antígeno comum em pelo menos 50 a 55%, 55 a 60%, 60 a 65%, 65 a 70%, 70 a 75% ou mais. Um ensaio de ligação por competição pode ser configurado num grande número de formatos diferentes com o uso de antígeno identificado ou anticorpo identificado. Numa versão comum deste ensaio, o antígeno é imobilizado numa placa de 96 poços. A capacidade de os anticorpos não identificados bloquearem a ligação de anticorpos identificados ao antígeno é, então medida com o uso de identificações radioativas ou de enzima. Para detalhes adicionais consulte, por exemplo, Wagener C et al., (1983) J Immunol 130: 2308-2315; Wagener C et al., (1984) J Immunol Methods 68: 269-274; Kuroki M et al., (1990) Cancer Res 50: 4872-4879; Kuroki M et al., (1992) Immunol Invest 21: 523-538; Kuroki M et al., (1992) Hybridoma 11: 391-407 e Antibodies: A Laboratory Manual, Ed Harlow E & Lane D editores supra, páginas 386-389.

[0220] Numa modalidade, um ensaio de competição é realizado com o uso de ressonância de plásmon de superfície (BIAcore®), por exemplo, por meio de uma ‘abordagem em tandem’, tal como aquela descrita por Abdiche YN et al., (2009) Analytical Biochem 386: 172-180, no qual o antígeno B7-H4 é imobilizado na superfície do chip, por exemplo, um chip de sensor CM5 e os anticorpos anti-B7-H4 são executados sobre o chip. Para determinar se um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo compete com um anticorpo anti-B7-H4 descrito no presente documento, o anticorpo anti-B7-H4 é executado primeiro sobre a superfície de chip para atingir a saturação e, então, o anticorpo competitivo potencial é adicionado. A ligação do anticorpo competitivo ou fragmento de ligação

ao antígeno do mesmo pode, então ser determinada e quantificada em relação a um controle não competitivo.

[0221] Numa modalidade, a ligação por competição Fortebio Octet (por exemplo, conforme descrito no Exemplo 2 abaixo) é usada para determinar que um anticorpo B7-H4 ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo inibe competitivamente a ligação de outro anticorpo B7-H4 ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo a B7-H4.

[0222] Em outro aspecto, são fornecidos no presente documento anticorpos que impedem competitivamente (por exemplo, de uma maneira dependente de dose) que um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo descrito no presente documento (por exemplo, 20502, 20502.1 ou 22213) se ligue a B7-H4 (por exemplo, B7-H4 humano), conforme determinado com o uso de ensaios conhecidos para uma pessoa versada na técnica ou descrito no presente documento (por exemplo, ensaio competitivos ELISA ou matriz de suspensão ou ensaio de ressonância de plásmon de superfície).

[0223] Em aspectos específicos, é fornecido no presente documento um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno que inibe competitivamente (por exemplo, de uma maneira dependente de dose) a ligação a B7-H4 (por exemplo, B7-H4 humano), de um anticorpo que compreende um domínio VH que tem a sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO:464, e um domínio VL que tem a sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO:42.

[0224] Em aspectos específicos, é fornecido no presente documento um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno que inibe competitivamente (por exemplo, de uma maneira dependente de dose) a ligação a B7-H4 (por exemplo, B7-H4 humano), de um anticorpo que compreende um domínio VH que tem a sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO:41, e um domínio VL que tem a sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO:42.

[0225] Em aspectos específicos, é fornecido no presente documento um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno que inibe competitivamente (por exemplo, de uma maneira dependente de dose) a ligação a B7-H4 (por exemplo, B7-H4 humano), de um anticorpo que compreende um domínio VH que tem a sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO:71, e um domínio VL que

tem a sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO:72.

[0226] Em aspectos específicos, é fornecido no presente documento um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo que inibe competitivamente (por exemplo, de uma maneira dependente de dose) a ligação a B7-H4 (por exemplo, B7-H4 humano), com um anticorpo que compreende (i) um domínio VH que compreende uma CDR1 de VH, CDR2 de VH, e CDR3 de VH tendo as sequências de aminoácidos das CDRs de VH listadas na Tabela 1; e (ii) um domínio VL que compreende uma CDR1 de VL, CDR2 de VL e CDR3 de VL tendo as sequências de aminoácidos das CDRs listadas na Tabela 2.

[0227] Em aspectos específicos, é fornecido no presente documento um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, que se liga imunoespecificamente ao mesmo epítopo B7-H4 (por exemplo, B7-H4 humano) que aquele de 20502, 20502.1 ou 22213.

[0228] Em outra modalidade específica, um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo descrito no presente documento, se liga imunoespecificamente ao mesmo epítopo B7-H4 (por exemplo, B7-H4 humano) que aquele de um anticorpo que compreende (i) um domínio VH que compreende uma CDR1 de VH, CDR2 de VH e CDR3 de VH tendo as sequências de aminoácidos das CDRs listadas na Tabela 1 e (ii) um domínio VL que compreende uma CDR1 de VL, CDR2 de VL e CDR3 de VL tendo as sequências de aminoácidos das CDRs listadas na Tabela 2.

[0229] Num aspecto específico, um fragmento de ligação ao antígeno conforme descrito no presente documento, que se liga imunoespecificamente a B7-H4 (por exemplo, B7-H4 humano), é selecionado do grupo que consiste num Fab, Fab', F(ab')2, e scFv, em que o Fab, Fab', F(ab')2 ou scFv compreende uma região variável de sequência de cadeia pesada e uma região variável de sequência de cadeia leve de um anticorpo anti-B7-H4 ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo conforme descrito no presente documento. Um Fab, Fab', F(ab')2 ou scFv pode ser produzido por qualquer técnica conhecida por aqueles versados na técnica, incluindo, porém sem limitação, aqueles discutidos na Seção 5.3, infra. Em certas modalidades, o Fab, Fab', F(ab')2 ou scFv compreende ainda uma porção química que prolonga a meia-vida do anticorpo *in vivo*. A porção química também

é chamada de “porção química de prolongamento de meia-vida”. Qualquer porção química conhecida por aqueles versados na técnica para prolongar a meia-vida de um Fab, Fab', F(ab')2 ou scFv *in vivo* pode ser usada. Por exemplo, a porção química de prolongamento de meia-vida pode incluir uma região Fc, um polímero, uma albumina ou uma proteína ou composto de ligação de albumina. O polímero pode incluir um polialquíleno, polialqueníleno, polioxilalquíleno, polissacarídeo, polietileno glicol, polipropileno glicol, álcool polivinílico, metoxipolietileno glicol, lactose, amilose, dextrano, glicogênio ou derivado dos mesmos natural ou sintético de cadeia linear ou ramificada opcionalmente substituído. Os substituintes podem incluir um ou mais grupos hidróxi, metila ou metóxi. Em certas modalidades, o Fab, Fab', F(ab')2 ou scFv pode ser modificado pela adição de um ou mais aminoácidos C-terminal para ligação da porção química de prolongamento de meia-vida. Em certas modalidades a porção química de prolongamento de meia-vida é polietileno glicol ou albumina sérica humana. Em certas modalidades, o Fab, Fab', F(ab')2 ou scFv é fundido a uma região Fc.

[0230] Um anticorpo anti-B7-H4 ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo pode ser fundido ou conjugado (por exemplo, ligado de modo covalente ou não covalente) a uma identificação ou substância detectável. Exemplos de identificações ou substâncias detectáveis incluem identificações de enzima, tais como, glicose oxidase; radioisótopos, tais como iodo (125I, 121I), carbono (14C), enxofre (35S), trítio (3H), índio (121In), e tecnécio (99Tc); identificações luminescentes, tais como luminol; e identificações fluorescentes, tais como fluoresceína e rodamina, e biotina. Tais anticorpos identificados ou fragmentos de ligação ao antígeno dos mesmos podem ser usados para detectar proteína B7-H4 (por exemplo, B7-H4 humano). Consulte, por exemplo, Seção 5.5.2, infra.

## **PRODUÇÃO DE ANTICORPOS**

[0231] Anticorpos e fragmentos de ligação ao antígeno dos mesmos que se ligam imunoespecificamente a B7-H4 (por exemplo, B7-H4 humano) podem ser produzidos por qualquer método conhecido na técnica para a síntese de anticorpos e fragmentos de ligação ao antígeno dos mesmos, por exemplo, por síntese química ou por técnicas de expressão recombinante. Os métodos descritos no presente documento empregam, a menos que indicado de outro modo, técnicas

convencionais de biologia molecular, microbiologia, análise genética, DNA recombinante, química orgânica, bioquímica, PCR, síntese e modificação de oligonucleotídeo, hibridização de ácido nucleico e campos relacionados dentro da técnica. Estas técnicas são descritas, por exemplo, nas referências citadas no presente documento e são totalmente explicadas na literatura. Consulte, por exemplo, 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 e atualizações anuais); Current Protocols in Immunology, John Wiley & Sons (1987 e atualizações anuais) 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.

[0232] Num certo aspecto, é fornecido no presente documento um método para produzir um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno que se liga imunoespecificamente a B7-H4 (por exemplo, B7-H4 humano) que compreende cultivar uma célula ou célula hospedeira descrita no presente documento. Num certo aspecto, é fornecido no presente documento um método para produzir um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo que se liga imunoespecificamente a B7-H4 (por exemplo, B7-H4 humano) que compreende expressar (por exemplo, expressar de modo recombinante) o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo com o uso de uma célula ou célula hospedeira descrita no presente documento (por exemplo, uma célula ou uma célula hospedeira que compreende polinucleotídeos que codificam um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo descrito no presente documento). Numa modalidade particular, a célula é uma célula isolada. Numa modalidade particular, os polinucleotídeos exógenos foram introduzidos na célula. Numa modalidade particular, o método compreende ainda a etapa de purificar o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno obtido a partir da célula ou célula hospedeira.

[0233] Os métodos para produzir anticorpos policlonais são conhecidos na técnica (consulte, por exemplo, o Capítulo 11 em: Short Protocols in Molecular Biology, (2002) 5<sup>a</sup> Ed., Ausubel FM et al., eds., John Wiley and Sons, New York).

[0234] Os anticorpos monoclonais ou fragmentos de ligação ao antígeno dos mesmos podem ser preparados com o uso de uma ampla variedade de técnicas conhecidas na técnica incluindo o uso de tecnologias de hibridoma, recombinantes e de exibição de fagos, tecnologias de apresentação à base de leveduras ou uma combinação das mesmas. Por exemplo, os anticorpos monoclonais ou fragmentos de ligação ao antígeno dos mesmos podem ser produzidos com o uso de técnicas de hibridoma que incluem aquelas conhecidas na técnica e ensinadas, por exemplo, em Harlow E & Lane D, Antibodies: A Laboratory Manual, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2<sup>a</sup> edição 1988); Hammerling GJ et al., in: Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas 563 681 (Elsevier, N.Y., 1981), ou conforme descrito em Kohler G & Milstein C (1975) Nature 256: 495. Exemplos de métodos de apresentação à base de levedura que podem ser empregados para selecionar e gerar os anticorpos descritos no presente documento incluem aqueles revelados, por exemplo, nos documentos WO2009/036379A2; WO2010/105256; e WO2012/009568, cada um dos quais é incorporado ao presente documento a título de referência em sua totalidade.

[0235] Em modalidades específicas, um anticorpo monoclonal ou fragmento de ligação ao antígeno é um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno produzido por uma célula clonal (por exemplo, hibridoma ou célula hospedeira que produz um anticorpo recombinante ou fragmento de ligação ao antígeno), em que o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno se liga imunoespecificamente a B7-H4 (por exemplo, B7-H4 humano) conforme determinado, por exemplo, por ELISA ou outros ensaios de ligação ao antígeno conhecidos na técnica ou nos Exemplos fornecidos no presente documento. Em modalidades particulares, um anticorpo monoclonal ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo pode ser um anticorpo quimérico ou humanizado ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo. Em certas modalidades, um anticorpo monoclonal ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo pode ser um fragmento Fab ou um fragmento F(ab')2. Os anticorpos monoclonais ou fragmentos de ligação ao antígeno dos mesmos descritos no presente documento podem ser, por exemplo, produzidos pelo método de hibridoma, conforme descrito em Kohler G & Milstein C (1975) Nature 256: 495 ou podem ser, por exemplo, isolados das bibliotecas de fago com o uso das

técnicas conforme descrito no presente documento, por exemplo. Outros métodos para a preparação de linhagens celulares clonais e de anticorpos monoclonais e fragmentos de ligação ao antígeno dos mesmos expressados deste modo são bem conhecidos na técnica (consulte, por exemplo, o Capítulo 11 em: Short Protocols in Molecular Biology, (2002) 5<sup>a</sup> Edição, Ausubel FM et al., supra).

[0236] Os fragmentos de ligação ao antígeno de anticorpos descritos no presente documento podem ser gerados por qualquer técnica conhecida por aqueles versados na técnica. Por exemplo, os fragmentos Fab e F(ab')2 descritos no presente documento podem ser produzidos por clivagem proteolítica de moléculas de imunoglobulina, com o uso de enzimas, tal como papaína (para produzir fragmentos Fab) ou pepsina (para produzir fragmentos F(ab')2). Um fragmento Fab corresponde a um dos dois braços idênticos de uma molécula de anticorpo tetramérica e contém a cadeia leve completa emparelhada com os domínios VH e CH1 da cadeia pesada. Um fragmento F(ab')2 contém os dois braços de ligação ao antígeno de uma molécula de anticorpo tetramérica ligada por ligações dissulfeto na região de dobradiça.

[0237] Ademais, os anticorpos ou fragmentos de ligação ao antígeno dos mesmos descritos no presente documento também podem ser gerados com o uso de vários métodos de exibição de fago e/ou apresentação à base de levedura conhecidos na técnica. Nos métodos de exibição de fago, as proteínas são exibidas na superfície de partículas de fago que transportam as sequências de polinucleotídeos que codificam as mesmas. Em particular, as sequências de DNA que codificam os domínios VH e VL são amplificadas a partir de bibliotecas de cDNA animal (por exemplo, bibliotecas de cDNA humano ou murino de tecidos afetados). O DNA que codifica os domínios VH e VL é recombinado em conjunto com um ligante scFv por PCR e克隆ado num vetor de fagomídeo. O vetor é eletroporado em *E. coli* e a *E. coli* é infectada com fago auxiliar. O fago usado nestes métodos é tipicamente fago filamentoso que inclui fd e M13, e os domínios VH e VL são geralmente fundidos de modo recombinante ao gene de fago III ou gene VIII. O fago que expressa um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo que se liga a particular antígeno pode ser selecionado ou identificado com antígeno, por exemplo, com o uso de antígeno identificado ou antígeno ligado

ou capturado a uma superfície ou microesfera sólida. Exemplos de métodos de exibição em fago que podem ser usados para produzir os anticorpos ou fragmentos descritos no presente documento incluem aqueles revelados em Brinkman U et al., (1995) J Immunol Methods 182: 41-50; Ames RS et al., (1995) J Immunol Methods 184: 177-186; Kettleborough CA et al., (1994) Eur J Immunol 24: 952-958; Persic L et al., (1997) Gene 187: 9-18; Burton DR & Barbas CF (1994) Advan Immunol 57: 191-280; pedido PCT nº PCT/GB91/001134; publicações internacionais nº WO 90/02809, WO 91/10737, WO 92/01047, WO 92/18619, WO 93/1 1236, WO 95/15982, WO 95/20401, e WO 97/13844; e patentes nº U.S. 5.698.426, 5.223.409, 5.403.484, 5.580.717, 5.427.908, 5.750.753, 5.821.047, 5.571.698, 5.427.908, 5.516.637, 5.780.225, 5.658.727, 5.733.743 e 5.969.108.

[0238] Um anticorpo humanizado ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo pode ser selecionado dentre qualquer classe imunoglobulinas, incluindo IgM, IgG, IgD, IgA e IgE, e qualquer isotipo, incluindo IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4.

### **1.2.1 POLINUCLEOTÍDEOS**

[0239] Em certos aspectos, são fornecidos no presente documento polinucleotídeos que compreendem uma sequência de nucleotídeos que codifica um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo descrito no presente documento ou um domínio do mesmo (por exemplo, uma região de cadeia leve variável e/ou região de cadeia pesada variável) que se liga imunoespecificamente a um antígeno B7-H4 (por exemplo, B7-H4 humano), e vetores, por exemplo, vetores que compreendem tais polinucleotídeos para expressão recombinante em células hospedeiras (por exemplo, *E. coli* e células de mamífero).

[0240] Em aspectos particulares, são fornecidos no presente documento polinucleotídeos que compreendem sequências de nucleotídeos que codificam anticorpos ou fragmentos de ligação ao antígeno dos mesmos, que se ligam imunoespecificamente a um polipeptídeo B7-H4 (por exemplo, B7-H4 humano) e compreendem uma sequência de aminoácidos conforme descrito no presente documento, assim como anticorpos ou fragmentos de ligação ao antígeno que competem com tais anticorpos ou fragmentos de ligação ao antígeno para se ligar a um polipeptídeo B7-H4 (por exemplo, de uma forma dependente de dose), ou que se ligam ao mesmo epítopo que aquele de tais anticorpos ou fragmentos de ligação

ao antígeno.

[0241] É fornecido também no presente documento um polinucleotídeo que compreende uma sequência de nucleotídeos que codifica um polinucleotídeo que compreende uma sequência selecionada do grupo que consiste nas SEQ ID NOs:11, 12, 21, 22, 31, 32, 41, 464, 42, 51, 52, 61, 62, 71, 72, 81, 82, 91, 92, 101, 102, 111, 112, 121, 122, 131, 132, 141, 142, 151, 152, 161, 162, 171, 172, 181, 182, 191, 192, 201 e 202. Em algumas modalidades, um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo que compreende o polipeptídeo se liga imunoespecificamente a B7-H4.

[0242] É fornecido também no presente documento um polinucleotídeo que compreende uma sequência de nucleotídeos que codifica um polinucleotídeo que compreende uma sequência selecionada do grupo que consiste nas SEQ ID NOs:13, 14, 23, 24, 33, 34, 43, 469, 44, 53, 54, 63, 64, 73, 74, 83, 84, 93, 94, 103, 104, 113, 114, 123, 124, 133, 134, 143, 144, 153, 154, 163, 164, 173, 174, 183, 184, 193, 194, 203 e 204. Em algumas modalidades, um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo que compreende o polipeptídeo se liga imunoespecificamente a B7-H4.

[0243] São fornecidos também no presente documento polinucleotídeos que compreendem uma sequência de nucleotídeos de codificação de cadeia pesada variável mostrada na Tabela 9, por exemplo, em que um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo que compreende a cadeia pesada variável codificada se liga a B7-H4.

**TABELA 9: SEQUÊNCIAS DE POLINUCLEOTÍDEOS DE CODIFICAÇÃO DE CADEIA PESADA VARIÁVEL**

Anticorpo	Sequência de polinucleotídeos de codificação de cadeia pesada variável (SEQ ID NO)
15461	CAGCTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCAGGACTGGTGAAGCCTT CGGAGACCCTGTCCCTCACCTGCACTGTCTCTGGTGGCTCCATC AGCAGTAGTTAGTTACTACTGGGGCTGGATCCGCCAGCCCCCAGG GAAGGGGCTGGAGTGGATTGGGAACATCTATTATAGTGGGAGCA CCTACTACAACCCGTCCCTCAAGAGTCGAGTCACCATATCCGTAG ACACGTCCAAGAACCAAGCTCTCCCTGAAGCTGAGTTCTGTGACC GCCGCAGACACGGCGGTGTACTACTGCGCCAGAGAAGGATCTT ACCCCAATTGGTTGATCCATGGGGACAGGGTACATTGGTCACC GTCTCCTCA (SEQ ID NO:213)

20500	CAGCTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCAGGACTGGTGAAGCCTT CGGAGACCCTGTCCCTCACCTGCACTGTCTTGGTGGCTCCATC AAGAGTGGTAGTCACTACTGGGGCTGGATCCGCCAGCCCCCAG GGAAGGGGCTGGAGTGGATTGGAACATCTATTATAGTGGGAGC ACCTACTACAACCGTCCCTCAGAAGAGTCGAGTCACCATATCCGTA GACACGTCCAAGAACCAAGTTCTCCCTGAAGCTGAGTTCTGTGAC CGCCGCAGACACGGCGGTGTACTACTGCGCCAGAGAAGGATCT TACCCCAATTGGTTGATCCATGGGACAGGGTACATTGGTCACC GTCTCCTCA (SEQ ID NO:223)
20501	CAGCTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCAGGACTGGTGAAGCCTT CGGAGACCCTGTCCCTCACCTGCACTGTCTTGGTGGCTCCATC AAGAGTGGTAGTCACTACTGGGGCTGGATCCGCCAGCCCCCAG GGAAGGGGCTGGAGTGGATTGGAACATCTATTATAGTGGGAGC ACCTACTACAACCGTCCCTCAAGAGTCGAGTCACCATATCCGTA GACACGTCCAAGAACCAAGTTCTCCCTGAAGCTGAGTTCTGTGAC CGCCGCAGACACGGCGGTGTACTACTGCGCCAGAGAAGGATCT TACCCCAATTGGTTGATCCATGGGACAGGGTACATTGGTCACC CGTCTCCTCA (SEQ ID NO:233)
20502	CAGCTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCAGGACTGGTGAAGCCTT CGGAGACCCTGTCCCTCACCTGCACTGTCTTGGTGGCTCCATC AAAAGTGGTAGTTACTACTGGGGCTGGATCCGCCAGCCCCCAGG GAAGGGGCTGGAGTGGATTGGAACATCTATTATAGTGGGAGCA CCTACTACAACCGTCCCTCAGAAGAGTCGAGTCACCATATCCGTAG ACACGTCCAAGAACCAAGTTCTCCCTGAAGCTGAGTTCTGTGACC GCCGCAGACACGGCGGTGTACTACTGCGCCAGAGAAGGATCTT ACCCCCAATCAGTTGATCCATGGGACAGGGTACATTGGTCACC GTCTCCTCA (SEQ ID NO:470)
20502.1	CAGCTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCAGGACTGGTGAAGCCTT CGGAGACCCTGTCCCTCACCTGCACTGTCTTGGTGGCTCCATC AAGAGTGGTAGTTACTACTGGGGCTGGATCCGCCAGCCCCCAG GGAAGGGGCTGGAGTGGATTGGAACATCTATTATAGTGGGAGC ACCTACTACAACCGTCCCTCAAGAGTCGAGTCACCATATCCGTA GACACGTCCAAGAACCAAGTTCTCCCTGAAGCTGAGTTCTGTGAC CGCCGCAGACACGGCGGTGTACTACTGCGCCAGAGAAGGATCT TACCCCAATCAGTTGATCCATGGGACAGGGTATATTGGTCACC GTCTCCTCA (SEQ ID NO:243)
22208	CAGCTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCAGGACTGGTGAAGCCTT CGGAGACCCTGTCCCTCACCTGCACTGTCTTGGTGGCTCCATC AAGAGTGGTAGTCACTACTGGGGCTGGATCCGCCAGCCCCCAG GGAAGGGGCTGGAGTGGATTGGAACATCTATTATAGTGGGAGC ACCTACTACAACCGTCCCTCAAGAGTCGAGTCACCATGTCCGT AGACACGTCCAAGAACCAAGTTCTCCCTGAAGCTGAGTTCTGTGA CCGCCGCAGACACGGCGGTGTACTACTGCGCCAGAGAAGGATCT TTACCCCAATTGGTTGATCCATGGGACAGGGTACATTGGTCACC CGTCTCCTCA (SEQ ID NO:253)

15462	CAGCTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCAGGACTGGTGAAGCCTT CGGAGACCCTGTCCCTCACCTGCACTGTCTCTGGTGGCTCCATC AGCAGTAGTAGTTACTACTGGGGCTGGATCCGCCAGCCCCCAGG GAAGGGGCTGGAGTGGATTGGAACATCTATTATAGTGGGAGCA CCTACTACAACCGTCCCTCAAGAGTCGAGTCACCATATCCGTAG ACACGTCCAAGAACCAAGTTCTCCCTGAAGACTGAGTTCTGTGACC GCCGCAGACACGGCGGTGTACTACTGCGCCAGAGAAGGATCTT ACACAACCGTGTAAACGTATGGGTCAAGGTACAATGGTCACC GTCTCCTCA (SEQ ID NO:263)
22213	CAGCTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCAGGACTGGTGAAGCCTT CGGAGACCCTGTCCCTCACCTGCACTGTCTCTGGTGGCTCCATC GGGAGGGGGAGTTACTACTGGGGCTGGATCCGCCAGCCCCCAG GGAAGGGGCTGGAGTGGATTGGAACATCTATTATAGTGGGAGC ACCTACTACAACCGTCCCTCAAGAGTCGAGTCACCATATCCGTAG GACACGTCCAAGAACCAAGTTCTCCCTGAAGACTGAGTTCTGTGAC CGCCGCAGACACGGCGGTGTACTACTGCGCCAGAGAAGGATCTT TACACAACCGTGTAAACGTATGGGTCAAGGTACAATGGTCACC GTCTCCTCA (SEQ ID NO:273)
15465	CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCAGGACTGGTGAAGCCTT CACAGACCCTGTCCCTCACCTGTAUTGTCTCTGGTGGCTCCATC AGCAGTGGTGGTTACTACTGGAGCTGGATCCGCCAGCACCCAG GGAAGGGCCTGGAGTGGATTGGAACATCTATTACAGTGGGAGC ACCTACTACAACCGTCCCTCAAGAGTCGAGTTACCATATCAGTA GACACGTCTAAGAACCAAGTTCTCCCTGAAGACTGAGTTCTGTGAC CGCCGCAGACACGGCGGTGTACTACTGCGCCAGAGAATCTAGC ACCATATCTGCCGACTTCGACCTATGGGGAGAGGTTACCTTGGT CACCGTCTCCTCA (SEQ ID NO:283)
20506	CAGCTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCAGGACTGGTGAAGCCTT CGGAGACCCTGTCCCTCACCTGTAUTGCCTCTGGTGGCTCCATC AGCCATGGTGGTTACTACTGGAGCTGGATCCGCCAGCACCCAG GGAAGGGCCTGGAGTGGATTGGAACATCTATTACAGTGGGAGC ACCTACTACAATCCGTCCCTCAAGAGTCGAGTTACCATGTCAGTA GACACGTCTAAGAACCAAGTTCTCCCTGAAGACTGAGTTCTGTGAC CGCCGCAGACACGGCGGTGTACTACTGCGCCAGAGAATCTAGC ACCATATCTGCCGACTTCGACCTATGGGGAGAGGTTACCTTGGT CACCGTCTCCTCA (SEQ ID NO:293)
15483	CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCAGGACTGGTGAAGCCTT CACAGACCCTGTCCCTCACCTGTAUTGTCTCTGGTGGCTCCATC AGCAGTGGTGGTTACTACTGGAGCTGGATCCGCCAGCACCCAG GGAAGGGCCTGGAGTGGATTGGAACATCTATTACAGTGGGAGC ACCTACTACAACCGTCCCTCAAGAGTCGAGTTACCATATCAGTA GACACGTCTAAGAACCAAGTTCTCCCTGAAGACTGAGTTCTGTGAC CGCCGCAGACACGGCGGTGTACTACTGCGCCAGAGGTTGAGC ACCATAGACGAGGCAATTGACCCATGGGGACAGGGTACATTGGT CACCGTCTCCTCA (SEQ ID NO:303)

20513	CAGCTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCAGGACTGGTGAAGCCTT CGGAGACCTGTCCCTCACCTGCACTGTCTGGTGGCTCCATC AGCGATGGTAGTTACTACTGGAGCTGGATCCGCCAGCACCCAGG GAAGGGCCTGGAGTGGATTGGAAACATCTATTACAGTGGGAGCA CCTACTACAACCCGTCCCTCAGGAGTCGAGTTACCATGTCAGTA GACACGTCTAAGAACCAAGTTCTCCCTGAAGCTGAGTTCTGTGAC CGCCGCAGACACGGCGGTGTACTACTGCGCCAGAGGGTTGAGC ACCATAGACGAGGCATTGACCCATGGGGACAGGGTACATTGGT CACCGTCTCCTCA (SEQ ID NO:313)
22216	CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCAGGACTGGTGAAGCCTT CACAGACCTGTCCCTCACCTGTACTGTCTGGTGGCTCCATC AGCGATGGTAGTTACTACTGGAGCTGGATCCGCCAGCACCCAGG GAAGGGCCTGGAGTGGATTGGAAACATCTATTACAGTGGGAGCA CCTACTACAACCCGTCCCTCAGGAGTCGAGTTACCATGTCAGTA GACACGTCTAAGAACCAAGTTCTCCCTGAAGCTGAGTTCTGTGAC CGCCGCAGACACGGCGGTGTACTACTGCGCCAGAGGGTTGAGC ACCATAGACGAGGCATTGACCCATGGGGACAGGGTACATTGGT CACCGTCTCCTCA (SEQ ID NO:323)
15489	CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCAGGACTGGTGAAGCCTT CGGAGACCTGTCCCTCACCTGCACTGTCTGGTGGCTCCATC AGTAGTTACTACTGGAGCTGGATCCGGCAGCCCCAGGGAAAGG GACTGGAGTGGATTGGGTATATCTATAGTAGTGGAGCACCAACT ACAACCCCTCCCTCAAGAGTCGAGTCACCATACTAGTAGACACG TCCAAGAACCAAGTTCTCCCTGAAGCTGAGTTCTGTGACCGCCGC AGACACGGCGGTGTACTACTGCGCCAGAGGCTCTGGACAGTAT GCAGCTCCTGATTATGGAATGGACGTATGGGGCCAGGGAACAAAC TGTCACCGTCTCCTCA (SEQ ID NO:333)
20516	CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCAGGACTGGTGAAGCCTT CGGAGACCTGTCCCTCACCTGCACTGTCTGGTGGCTCCATC ATTAGTTACTACTGGGGGTGGATCCGGCAGCCCCAGGGAAAGG GACTGGAGTGGATTGGGTATATCTATTCTAGTGGAGCACCTCGT ACAACCCCTCCCTCAAGAGTCGAGTCACCATACTAGTAGACACG TCCAAGAACCAAGTTCTCCCTGAAGCTGAGTTCTGTGACCGCCGC AGACACGGCGGTGTACTACTGCGCCAGAGGCTCTGGACTGTATG CAGCTCCTGATTATGGACTTGACGTATGGGTAGGGAACAAACT GTCACCGTCTCCTCA (SEQ ID NO:343)
15472	GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGAGGCTTGGTACAGCCTG GGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTT AGCAGCTATGCCATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAAGG GGCTGGAGTGGGTCTCAACCATTAGTGGTAGTGGTGGTAGCACA TACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTCAACCATCTCCAGAGA CAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAG CCGAGGACACGGCGGTGTACTACTGCGCCAGAGGTGCCGGACA CTACGACCTCGTCGGACGATACTGGGGACAGGGTACATTGGTCA CCGTCTCCTCA (SEQ ID NO:353)

15503	GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTG GGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACACCTT AGCAGCTATGCCATGAGCTGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAAGG GGCTGGAGTGGGTCTCAGCTATTAGTGGTAGTGGTAGCACA TACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTCACCATCTCCAGAGA CAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAG CCGAGGACACGGCGGTGTACTACTGCGCCAGAGTGGGATTCA AGCATTAAACTACTGGGGACAGGGTACAACACTGTCACCGTCTCCT CA (SEQ ID NO:363)
15495	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAACGCCTG GGTCCTCGGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGAGGGCACCTT CAGCAGCTATGCTATCAGCTGGTGCACAGGCCCTGGACAA GGGCTTGAGTGGATGGGAGGGATCATCCCTATCTTGGTACAGC AAGCTACGCACAGAACAGTCCAGGGCAGAGTCACGATTACCGCG GACGAATCCACGAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGA GATCTGAGGACACGGCGGTGTACTACTGCGCAAGACAGCAATAC GACGGTAGACGATACTCGGCCTATGGGGAGAGGTACCTTGGT CACCGTCTCCTCA (SEQ ID NO:373)
15478	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAACGCCTG GGTCCTCGGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGAGGGCACCTT CAGCAGCTATGCTATCAGCTGGTGCACAGGCCCTGGACAA GGGCTTGAGTGGATGGGAGGGATCATCCCTATCTTGGTACAGC AAACTACGCACAGAACAGTCCAGGGCAGAGTCACGATTACCGCG ACGAATCCACGAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGA ATCTGAGGACACGGCGGTGTACTACTGCGCCAGAGGTGGCCT TGGTTGATCCATGGGACAGGGTACATTGGTCACCGTCTCCTC A (SEQ ID NO:383)
15441	GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTG GGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACACCTT AGCAGCTATGCCATGAGCTGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAAGG GGCTGGAGTGGGTCTCAGCTATTAGTGGTAGTGGTAGCACA TCCTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTCACCATCTCCAGAGA CAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAG CCGAGGACACGGCGGTGTACTACTGCGCCAAGCCTTGGC AACAAATGTTAGCCTTCGATATCTGGGTCAAGGGTACAATGGTCAC CGTCTCCTCA (SEQ ID NO:393)
20496	CAGCTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCAGGACTGGTGAAGCCTT CGGAGACCCCTGTCCCTCACCTGCACGTCTCTGGTGCTCCATC AGCAGTAGTGTAACTACTGGAGTTGGATGGAGTATCCTGGTAGTGGAGC GAAGGGGTTGGAGTGGATTGGAGTATCCTGGTAGTGGAGC ACCTACTACAACCCGTCCCTCAAGAGTCGAGTCACCATATCCGTA GACACGTCCAAGAACCAAGTTCTCCCTGAAGCTGAGTTCTGTGAC CGCCGCAGACACGGCGGTGTACTACTGCGCCAGAGCTGTATCC TTCTTAGACGTATGGGTCAAGGGTACAATGGTCATCGTCTCCTCA (SEQ ID NO:403)

[0244] São fornecidos também no presente documento polinucleotídeos que compreendem uma sequência de nucleotídeos de codificação de cadeia leve variável mostrada na Tabela 10, por exemplo, em que um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo que compreende a cadeia leve variável codificada se liga a B7-H4.

**TABELA 10: SEQUÊNCIAS DE POLINUCLEOTÍDEO DE CODIFICAÇÃO DE CADEIA LEVE VARIÁVEL**

Anticorpo	Sequência de polinucleotídeos de codificação de cadeia leve variável (SEQ ID NO)
15461	GAAATAGTGATGACGCAGTCTCCAGCCACCCCTGTCTGTGTCTCC AGGGGAAAGAGCCACCCCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTT AGCAGCAACTTAGCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTC CCAGGCTCCTCATCTATGGTGCATCCACCAGGGCCACTGGTATC CCAGGCCAGGTTAGTGGCAGTGGTCTGGGACAGAGTTCACTC TCACCATCAGCAGCCTGCAGTCTGAAGATTTGCAGTTATTACT GTCAGCAGTACCACTCCTCCCTTCACTTTGGCGGAGGGAC CAAGGTTGAGATCAAA (SEQ ID NO:214)
20500	GAAATAGTGATGACGCAGTCTCCAGCCACCCCTGTCTGTGTCTCC AGGGGAAAGAGCCACCCCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTT AGCAGCAACTTAGCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTC CCAGGCTCCTCATCTATGGTGCATCCACCAGGGCCACTGGTATC CCAGGCCAGGTTAGTGGCAGTGGTCTGGGACAGAGTTCACTC TCACCATCAGCAGCCTGCAGTCTGAAGATTTGCAGTTATTACT GTCAGCAGTACCACTCCTCCCTTCACTTTGGCGGAGGGAC CAAGGTTGAGATCAAA (SEQ ID NO:224)
20501	GAAATAGTGATGACGCAGTCTCCAGCCACCCCTGTCTGTGTCTCC AGGGGAAAGAGCCACCCCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTT AGCAGCAACTTAGCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTC CCAGGCTCCTCATCTATGGTGCATCCACCAGGGCCACTGGTATC CCAGGCCAGGTTAGTGGCAGTGGTCTGGGACAGAGTTCACTC TCACCATCAGCAGCCTGCAGTCTGAAGATTTGCAGTTATTACT GTCAGCAGTACCACTCCTCCCTTCACTTTGGCGGAGGGAC CAAGGTTGAGATCAAA (SEQ ID NO:234)
20502 e 20502.1	GAAATAGTGATGACGCAGTCTCCAGCCACCCCTGTCTGTGTCTCC AGGGGAAAGAGCCACCCCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTT AGCAGCAACTTAGCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTC CCAGGCTCCTCATCTATGGTGCATCCACCAGGGCCACTGGTATC CCAGGCCAGGTTAGTGGCAGTGGTCTGGGACAGAGTTCACTC TCACCATCAGCAGCCTGCAGTCTGAAGATTTGCAGTTATTACT GTCAGCAGTACCACTCCTCCCTTCACTTTGGCGGAGGGAC CAAGGTTGAGATCAAA (SEQ ID NO:244)
22208	GAAATAGTGATGACGCAGTCTCCAGCCACCCCTGTCTGTGTCTCC

	AGGGGAAAGAGCCACCCCTCCTGCAGGGCCAGTCAGTCCGTT AGCACCAACTTAGCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTC CCAGGCTCCTCATCTATGACGCATCCGCCAGGGTCACTGGTATC CCAGCCAGGTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGAGTTCACTC TCACCATCAGCAGCCTGCAGTCTGAAGATTTCAGTTATTACT GTCAGCAGTACCACTCCTCCCTTCACTTTGGCGGAGGGAC CAAGGTTGAGATCAAA (SEQ ID NO:254)
15462	GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCCCTGTCTTGTCCTCC AGGGGAAAGAGCCACCCCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTT AGCAGCAGCTACTTAGCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCAGG CTCCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCATCCAGCAGGGCCACTGG CATCCCAGACAGGTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTC ACTCTCACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTCAGTGTA TTACTGTCAGCAGGCCAGTTACCCCTCTCACTTTGGCGGA GGGACCAAGGTTGAGATCAAA (SEQ ID NO:264)
22213	GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCCCTGTCTTGTCCTCC AGGGGAAAGAGCCACCCCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTT GCCAGCAGCCACTTAGCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCAGG CTCCCAGGCTCCTCATCTATGACGCAGTCAGCAGGGCCACTGG CATCCCAGACAGGTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTC ACTCTCACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTCAGTGTA TTACTGTCAGCAGGCCAGTTACCCCTCTCACTTTGGCGGA GGGACCAAGGTTGAGATCAAA (SEQ ID NO:274)
15465	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCTTCCGTGTCTGCATCTGT AGGAGACAGAGTCACCATCACTTGTGGCGAGTCAGGGTATT AGCAGGTGGTTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCC CTAAGCTCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTGCAAAGTGGGGTC CCATCAAGGTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGATTCACTCT CACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATTTCAGTATTACT GTCAGCAGGCACACACCTCCCTACACTTTGGCGGAGGGAC CAAGGTTGAGATCAAA (SEQ ID NO:284)
20506	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCTTCCGTGTCTGCATCTGT AGGAGACAGAGTCACCATCACTTGTGGCGAGTCAGGGTATT AGCAGGTGGTTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCC CTAAGCTCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTGCAAAGTGGGGTC CCATCAAGGTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGATTCACTCT CACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATTTCAGTATTACT GTCAGCAGGCACACACCTCCCTACACTTTGGCGGAGGGAC CAAGGTTGAGATCAAA (SEQ ID NO:294)
15483	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCTCCACCCCTGTCTGCATCTGT AGGAGACAGAGTCACCATCACTTGCCTGGCGAGTCAGAGTATT AGTAGCTGGTTGGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCC CTAAGCTCCTGATCTATAAAGCCTCCAGTTGGAAAGTGGGGTC CCATCAAGGTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGAATTCACTCT CACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGATTTGCAAACATTACTG

	CCAGCAGGACAACAGTTACCCTTACACTTTGGCGGAGGGACC AAGGTTGAGATCAAA (SEQ ID NO:304)
20513	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCTTCCACCCCTGTCTGCATCTGT AGGAGACAGAGTCACCATCACTGCCGGGCCAGTCAGAGTATT AGTAGCTGGTTGGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCC CTAAGCTCCTGATCTATAAACGCCTCCAGTTGGAAAGTGGGGTC CCATCAAGGTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGAATTCACTCT CACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGATGATTTGCAACTTATTACTG CCAGCAGGACAACAGTTACCCTTACACTTTGGCGGAGGGACC AAGGTTGAGATCAAA (SEQ ID NO:314)
22216	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCTTCCACCCCTGTCTGCATCTGT AGGAGACAGAGTCACCATCACTGCCGGGCCAGTAAAAGTATT GTTCCCTGGTTGGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCC TAAGCTCCTGATCTATGAAGCCTCCCTTGACAGTGGGGTC CATCAAGGTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGAATTCACTCT ACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGATGATGATTTGCAACTTATTACTG CAGCAGGACAACAGTTACCCTTACACTTTGGCGGAGGGACCA AGGTTGAGATCAAA (SEQ ID NO:324)
15489	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCTTCCACCCCTGTCTGCATCTGT AGGAGACAGAGTCACCATCACTGCCGGGCCAGTCAGAGTATT AGTAGCTGGTTGGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCC CTAAGCTCCTGATCTATAAACGCCTCCAGTTGGAAAGTGGGGTC CCATCAAGGTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGAATTCACTCT CACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGATGATGATTTGCAACTTATTACTG CCAGCAGGACAATAGCTCCCTTACACTTTGGCGGAGGGACC AAGGTTGAGATCAAA (SEQ ID NO:334)
20516	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCTTCCACCCCTGTCTGCATCTGT AGGAGACAGAGTCACCATCACTGCCGGGCCAGTCAGAGTATT AGTAGCTGGTTGGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCC CTAAGCTCCTGATCTATAAACGCCTCCAGTTGGAAAGTGGGGTC CCATCAAGGTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGAATTCACTCT CACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGATGATGATTTGCAACTTATTACTG CCAGCAGGACAATAGCTCCCTTACACTTTGGCGGAGGGACCA AAGGTTGAGATCAAA (SEQ ID NO:344)
15472	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGT AGGAGACAGAGTCACCATCACTGCCGGGCCAGTCAGAGCATT AGCAGCTATTAAATTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCC TAAGCTCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTGCAAAGTGGGGTC CATCAAGGTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTCACTCT ACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTGCAACTTACTACTGT CAGCAACTATACAGTCTCCCTCCTACTTTGGCGGAGGGACCAA GGTTGAGATCAAA (SEQ ID NO:354)
15503	GACATCCAGTTGACCCAGTCTCCATCTTCCGTGTCTGCATCTGT AGGAGACAGAGTCACCATCACTGTCGGGCCAGTCAGGATATTA GCAGCTGGTTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCC

	TAAGCTCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTGCAAAGTGGGGTCC CATCAAGGTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGATTCACTCTC ACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATTTGCAACTTATTACTGT CAGCAGGCAACCAGTTACCCCTCCTGGACTTTGGCGGAGGGA CCAAGGTTGAGATCAAA (SEQ ID NO:364)
15495	GAAATAGTGATGACGCAGTCTCCAGGCCACCCCTGTCTGTCTCC AGGGGAAAGAGGCCACCCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTT AGCAGCAACTTAGCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTC CCAGGCTCCTCATCTATAGCGCATCCACCAGGGCCACTGGTATC CCAGGCCAGGTTCAGTGGCAGTGGCTGGGACAGAGTTCACTC TCACCATCAGCAGCCTGCAGTCTGAAGATTTGCAAGTGGTACT GTCAGCAGGTCAACGTCTGGCCTCCTACTTTGGCGGAGGGA CAAGGTTGAGATCAAA (SEQ ID NO:374)
15478	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCTCCACCCCTGTCTGCATCTGT AGGAGACAGAGTCACCATCACTTGCCGGGCCAGTCAGAGTATT AGTAGCTGGTTGGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCC CTAAGCTCCTGATCTATAAACGCCTCCAGTTGGAAAGTGGGGTC CCATCAAGGTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGAATTCACTCT CACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGATGATTTGCAACTTATTACTG CCAGCAGTACAATAGCTACCCCTCCTTCACTTTGGCGGAGGGA CCAAGGTTGAGATCAAA (SEQ ID NO:384)
15441	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCTCCACCCCTGTCTGCATCTGT AGGAGACAGAGTCACCATCACTTGCCGGGCCAGTCAGAGTATT AGTAGCTGGTTGGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCC CTAAGCTCCTGATCTATGATGCCTCCAGTTGGAAAGTGGGGTC CCATCAAGGTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGAATTCACTCT CACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGATGATGATTTGCAACTTATTACTG CCAGCAGTCCAAAAGTTACCCCTAGGACTTTGGCGGAGGGA AAGGTTGAGATCAAA (SEQ ID NO:394)
20496	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGT AGGAGACAGAGTCACCATCACTTGCCGGGCCAGTCAGAGCATT AGCAGCTATTAAATTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCC TAAGCTCCTGATCTATGGTGCATCCAGTTGCAAAGTGGGGTCC CATCAAGGTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTC ACCATCAGCAGTCTGCAGCCTGAAGATTTGCAACTTACTACTGT CAGCAAAGCTACGACCCCCCTGGACTTTGGCGGAGGGACCA AGGTTGAGATCAAA (SEQ ID NO:404)

[0245] São fornecidos também no presente documento polinucleotídeos que compreendem a sequência de nucleotídeos da SEQ ID NO:213, 214, 223, 224, 233, 234, 243, 470, 244, 253, 254, 263, 264, 273, 274, 283, 284, 293, 294, 303, 304, 313, 314, 323, 324, 333, 334, 343, 344, 353, 354, 363, 364, 373, 374, 383, 384, 393, 394, 403 ou 404. São fornecidos também no presente documento

polinucleotídeos que compreendem (i) a sequência de nucleotídeos da SEQ ID NO:213, 214, 223, 224, 233, 234, 243, 470, 244, 253, 254, 263, 264, 273, 274, 283, 284, 293, 294, 303, 304, 313, 314, 323, 324, 333, 334, 343, 344, 353, 354, 363, 364, 373, 374, 383, 384, 393, 394, 403 ou 404 e (ii) a sequência de nucleotídeos da SEQ ID NO:408 ou 406.

[0246] São fornecidos também no presente documento polinucleotídeos que compreendem uma sequência de nucleotídeos que codifica a SEQ ID NO:11, 12, 21, 22, 31, 32, 41, 464, 42, 51, 52, 61, 62, 71, 72, 81, 82, 91, 92, 101, 102, 111, 112, 121, 122, 131, 132, 141, 142, 151, 152, 161, 162, 171, 172, 181, 182, 191, 192, 201 ou 202 e é pelo menos cerca de 80%, 85% ou 90% idêntica à SEQ ID NO:213, 214, 223, 224, 233, 234, 243, 470, 244, 253, 254, 263, 264, 273, 274, 283, 284, 293, 294, 303, 304, 313, 314, 323, 324, 333, 334, 343, 344, 353, 354, 363, 364, 373, 374, 383, 384, 393, 394, 403 ou 404, respectivamente.

[0247] São fornecidos também no presente documento polinucleotídeos que compreendem uma sequência de nucleotídeos que codifica SEQ ID NO:11, 12, 21, 22, 31, 32, 41, 464, 42, 51, 52, 61, 62, 71, 72, 81, 82, 91, 92, 101, 102, 111, 112, 121, 122, 131, 132, 141, 142, 151, 152, 161, 162, 171, 172, 181, 182, 191, 192, 201 ou 202 e é pelo menos cerca de 95% idêntica à SEQ ID NO:213, 214, 223, 224, 233, 234, 243, 470, 244, 253, 254, 263, 264, 273, 274, 283, 284, 293, 294, 303, 304, 313, 314, 323, 324, 333, 334, 343, 344, 353, 354, 363, 364, 373, 374, 383, 384, 393, 394, 403 ou 404, respectivamente.

[0248] São fornecidos também no presente documento polinucleotídeos que compreendem uma sequência de nucleotídeos que codifica SEQ ID NO:11, 12, 21, 22, 31, 32, 41, 464, 42, 51, 52, 61, 62, 71, 72, 81, 82, 91, 92, 101, 102, 111, 112, 121, 122, 131, 132, 141, 142, 151, 152, 161, 162, 171, 172, 181, 182, 191, 192, 201 ou 202 e é pelo menos cerca de 96% idêntica à SEQ ID NO:213, 214, 223, 224, 233, 234, 243, 470, 244, 253, 254, 263, 264, 273, 274, 283, 284, 293, 294, 303, 304, 313, 314, 323, 324, 333, 334, 343, 344, 353, 354, 363, 364, 373, 374, 383, 384, 393, 394, 403 ou 404, respectivamente.

[0249] São fornecidos também no presente documento polinucleotídeos que compreendem uma sequência de nucleotídeos que codifica SEQ ID NO:11, 12, 21, 22, 31, 32, 41, 464, 42, 51, 52, 61, 62, 71, 72, 81, 82, 91, 92, 101, 102, 111, 112,

121, 122, 131, 132, 141, 142, 151, 152, 161, 162, 171, 172, 181, 182, 191, 192, 201 ou 202 e é pelo menos cerca de 97% idêntica à SEQ ID NO:213, 214, 223, 224, 233, 234, 243, 470, 244, 253, 254, 263, 264, 273, 274, 283, 284, 293, 294, 303, 304, 313, 314, 323, 324, 333, 334, 343, 344, 353, 354, 363, 364, 373, 374, 383, 384, 393, 394, 403 ou 404, respectivamente.

[0250] São fornecidos também no presente documento polinucleotídeos que compreendem uma sequência de nucleotídeos que codifica SEQ ID NO:11, 12, 21, 22, 31, 32, 41, 464, 42, 51, 52, 61, 62, 71, 72, 81, 82, 91, 92, 101, 102, 111, 112, 121, 122, 131, 132, 141, 142, 151, 152, 161, 162, 171, 172, 181, 182, 191, 192, 201 ou 202 e é pelo menos cerca de 98% idêntica à SEQ ID NO:213, 214, 223, 224, 233, 234, 243, 470, 244, 253, 254, 263, 264, 273, 274, 283, 284, 293, 294, 303, 304, 313, 314, 323, 324, 333, 334, 343, 344, 353, 354, 363, 364, 373, 374, 383, 384, 393, 394, 403 ou 404, respectivamente.

[0251] São fornecidos também no presente documento polinucleotídeos que compreendem uma sequência de nucleotídeos que codifica SEQ ID NO:11, 12, 21, 22, 31, 32, 41, 464, 42, 51, 52, 61, 62, 71, 72, 81, 82, 91, 92, 101, 102, 111, 112, 121, 122, 131, 132, 141, 142, 151, 152, 161, 162, 171, 172, 181, 182, 191, 192, 201 ou 202 e é pelo menos cerca de 99% idêntica à SEQ ID NO:213, 214, 223, 224, 233, 234, 243, 470, 244, 253, 254, 263, 264, 273, 274, 283, 284, 293, 294, 303, 304, 313, 314, 323, 324, 333, 334, 343, 344, 353, 354, 363, 364, 373, 374, 383, 384, 393, 394, 403 ou 404, respectivamente.

[0252] Em certos aspectos, são fornecidos no presente documento polinucleotídeos que compreendem uma sequência de nucleotídeos que codifica a cadeia leve ou cadeia pesada de um anticorpo ou um fragmento de ligação ao antígeno descrito no presente documento. Os polinucleotídeos podem compreender sequências de nucleotídeos que codificam a cadeia pesada que compreende os FRs de VH e CDRs de anticorpos descritos no presente documento (*consulte*, por exemplo, as Tabelas 1 e 5). Os polinucleotídeos podem compreender sequências de nucleotídeos que codificam uma cadeia leve que compreende os FRs de VL e CDRs de anticorpos descritos no presente documento (*consulte*, por exemplo, as Tabelas 2 e 6).

[0253] Em modalidades específicas, um polinucleotídeo descrito no presente

documento codifica um domínio VH que comprehende a sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO:464. Em modalidades específicas, um polinucleotídeo descrito no presente documento codifica um domínio VL que comprehende a sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO:42.

[0254] Em modalidades específicas, um polinucleotídeo descrito no presente documento codifica um domínio VH que comprehende a sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO:41. Em modalidades específicas, um polinucleotídeo descrito no presente documento codifica um domínio VL que comprehende a sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO:42.

[0255] Em modalidades específicas, um polinucleotídeo descrito no presente documento codifica um domínio VH que comprehende a sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO:71. Em modalidades específicas, um polinucleotídeo descrito no presente documento codifica um domínio VL que comprehende a sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO:72.

[0256] Em modalidades particulares, são fornecidos no presente documento polinucleotídeos que comprehendem uma sequência de nucleotídeos que codifica um anticorpo anti-B7-H4 que comprehende três CDRs de cadeia VH, por exemplo, contendo CDR1 de VH, CDR2 de VH, CDR3 de VH VL de qualquer um dos anticorpos descritos no presente documento (por exemplo, consulte a Tabela 1). Em modalidades específicas, são fornecidos no presente documento polinucleotídeos que comprehendem três CDRs de cadeia VL, por exemplo, contendo CDR1 de VL, CDR2 de VL, e CDR3 de VL de qualquer um dos anticorpos descritos no presente documento (por exemplo, consulte a Tabela 2). Em modalidades específicas, são fornecidos no presente documento polinucleotídeos que comprehendem uma sequência de nucleotídeos que codifica um anticorpo anti-B7-H4 que comprehende três CDRs de cadeia VH, por exemplo, contendo CDR1 de VH, CDR2 de VH, e CDR3 de VH de qualquer um dos anticorpos descritos no presente documento (por exemplo, consulte a Tabela 1) e três CDRs de cadeia VL, por exemplo, contendo CDR1 de VL, CDR2 de VL e CDR3 de VL de qualquer um dos anticorpos descritos no presente documento (por exemplo, consulte a Tabela 2).

[0257] Em modalidades particulares, são fornecidos no presente documento

polinucleotídeos que compreendem uma sequência de nucleotídeos que codifica um anticorpo anti-B7-H4 ou um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo ou um fragmento do mesmo que compreende um domínio VH, por exemplo, que contém FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4, que compreende uma sequência de aminoácidos descrita no presente documento (por exemplo, consulte as Tabelas 1 e 5, por exemplo, as CDRs de VH e FRs de VH de um anticorpo particular identificado pelo nome nas Tabelas). Em modalidades específicas, são fornecidos no presente documento polinucleotídeos que compreendem uma sequência de nucleotídeos que codifica um anticorpo anti-B7-H4 ou um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo ou fragmento do mesmo que compreende um domínio VL, por exemplo, que contém FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4, que compreende uma sequência de aminoácidos descrita no presente documento (por exemplo, consulte as Tabelas 2 e 6, por exemplo, as CDRs de VL e FRs de VL de um anticorpo particular identificado pelo nome nas Tabelas).

[0258] Em certas modalidades, um polinucleotídeo descrito no presente documento compreende uma sequência de nucleotídeos que codifica uma região variável de cadeia pesada que compreende uma sequência de aminoácidos descrita no presente documento (por exemplo, SEQ ID NO:464, 41 ou 71), em que um anticorpo que contém a região variável de cadeia pesada se liga imunoespecificamente a B7-H4 (por exemplo, B7-H4 humano). Numa certa modalidade, um polinucleotídeo descrito no presente documento compreende uma sequência que codifica a região variável de cadeia pesada fornecida no presente documento (por exemplo, a porção que codifica a região variável da SEQ ID NO:470, 243 ou 273), em que um anticorpo que contém a região variável de cadeia pesada se liga imunoespecificamente a B7-H4 (por exemplo, B7-H4 humano).

[0259] Em certas modalidades, um polinucleotídeo descrito no presente documento compreende uma sequência de nucleotídeos que codifica uma região variável de cadeia leve que compreende uma sequência de aminoácidos descrita no presente documento (por exemplo, SEQ ID NO:42 ou 72), em que um anticorpo que contém a região variável de cadeia leve se liga imunoespecificamente a B7-H4 (por exemplo, B7-H4 humano). Numa certa modalidade, um polinucleotídeo descrito no presente documento compreende uma sequência que codifica a região

variável de cadeia leve fornecida no presente documento (por exemplo, a porção que codifica a região variável da SEQ ID NO:244 ou 274), em que um anticorpo que contém a região variável de cadeia pesada se liga imunoespecificamente a B7-H4 (por exemplo, B7-H4 humano).

[0260] Numa modalidade particular, um polinucleotídeo ou combinação de polinucleotídeos fornecidos no presente documento compreende uma sequência de nucleotídeos ou combinação de sequências de nucleotídeos que codificam um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo que se liga imunoespecificamente a B7-H4 (por exemplo, B7-H4 humano), em que o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo compreende uma cadeia pesada, em que a cadeia pesada compreende um domínio variável de cadeia pesada que compreende uma sequência de aminoácidos apresentada na Tabela 3 (por exemplo, SEQ ID NO:464, 41 ou 71) e uma região constante que compreende a sequência de aminoácidos de uma região constante de cadeia pesada gama ( $\gamma$ ) humana.

[0261] Numa modalidade particular, um polinucleotídeo ou combinação de polinucleotídeos fornecidos no presente documento compreende uma sequência de nucleotídeos ou combinação de sequências de nucleotídeos que codificam um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo que se liga imunoespecificamente a B7-H4 (por exemplo, B7-H4 humano), em que o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo compreende uma cadeia leve, em que a cadeia leve compreende um domínio variável de cadeia leve que compreende uma sequência de aminoácidos apresentada na Tabela 4 (por exemplo, SEQ ID NO:42 ou 72) e uma região constante que compreende a sequência de aminoácidos de uma região constante de cadeia leve lambda humana.

[0262] Numa modalidade particular, um polinucleotídeo ou combinação de polinucleotídeos fornecidos no presente documento compreende uma sequência de nucleotídeos ou combinação de sequências de nucleotídeos que codificam um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo que se liga imunoespecificamente a B7-H4 (por exemplo, B7-H4 humano), em que o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo compreende (i) uma cadeia pesada, em que a cadeia pesada compreende um domínio variável de cadeia

pesada que compreende uma sequência de aminoácidos apresentada na Tabela 3 (por exemplo, SEQ ID NO:464, 41 ou 71) e uma região constante que compreende a sequência de aminoácidos de uma região constante de cadeia pesada gama ( $\gamma$ ) humana e (ii) uma cadeia leve, em que a cadeia leve compreende um domínio variável de cadeia leve que compreende uma sequência de aminoácidos apresentada na Tabela 4 (por exemplo, SEQ ID NO:42 ou 72) e uma região constante que compreende a sequência de aminoácidos de uma região constante de cadeia leve lambda humana.

[0263] Numa modalidade, uma combinação de polinucleotídeos fornecidos no presente documento compreende um polinucleotídeo que compreende a sequência de nucleotídeos da SEQ ID NO:470 e um polinucleotídeo que compreende a sequência de nucleotídeos da SEQ ID NO:244.

[0264] Numa modalidade, uma combinação de polinucleotídeos fornecidos no presente documento compreende um polinucleotídeo que compreende a sequência de nucleotídeos da SEQ ID NO:243 e um polinucleotídeo que compreende a sequência de nucleotídeos da SEQ ID NO:244.

[0265] Numa modalidade, uma combinação de polinucleotídeos fornecidos no presente documento compreende um polinucleotídeo que compreende a sequência de nucleotídeos da SEQ ID NO:273 e um polinucleotídeo que compreende a sequência de nucleotídeos da SEQ ID NO:274.

[0266] Numa modalidade específica, são fornecidos no presente documento polinucleotídeos que compreendem uma sequência de nucleotídeos que codifica um anticorpo anti-B7-H4 ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo ou um domínio do mesmo, designado no presente documento, consulte, por exemplo, Tabelas 1 a 8.

[0267] São fornecidos também no presente documento polinucleotídeos que codificam um anticorpo anti-B7-H4 ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo descrito no presente documento ou um domínio do mesmo que são otimizados, por exemplo, por otimização de códon/RNA, substituição por sequências de sinais heterólogos, e eliminação de elementos de instabilidade de mRNA. Os métodos para gerar ácidos nucleicos otimizados que codificam um anticorpo anti-B7-H4 ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo ou um domínio do mesmo (por

exemplo, cadeia pesada, cadeia leve, domínio VH ou domínio VL) para expressão recombinante introduzindo-se alterações de códon (por exemplo, uma alteração de códon que codifica o mesmo aminoácido devido à degenerescência do código genético) e/ou eliminação de regiões inibitórias no mRNA pode ser realizada adaptando-se os métodos de otimização descritos, por exemplo, na patente nº U.S. 5.965.726; 6.174.666; 6.291.664; 6.414.132; e 6.794.498, consequentemente.

[0268] Um polinucleotídeo que codifica um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo descrito no presente documento ou um domínio do mesmo pode ser gerado a partir do ácido nucleico de uma fonte adequada (por exemplo, um hibridoma) com o uso de métodos bem conhecidos na técnica (por exemplo, PCR e outros métodos de clonagem molecular). Por exemplo, a amplificação por PCR com o uso de iniciadores sintéticos hibridizáveis com as extremidades 3' e 5' de uma sequência conhecida pode ser realizada com o uso de DNA genômico obtido a partir de células de hibridoma que produzem o anticorpo de interesse. Tais métodos de amplificação por PCR podem ser usados para obter ácidos nucleicos que compreendem a sequência a codifica a cadeia leve e/ou cadeia pesada de um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo. Tais métodos de amplificação por PCR podem ser usados para obter ácidos nucleicos que compreendem a sequência que codifica a região de cadeia leve variável e/ou a região de cadeia pesada variável de um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo. Os ácidos nucleicos amplificados podem ser clonados em vetores para expressão em células hospedeiras e para clonagem adicional, por exemplo, para gerar anticorpos químéricos e humanizados ou fragmentos de ligação ao antígeno dos mesmos.

[0269] Os polinucleotídeos fornecidos no presente documento podem ser, por exemplo, sob a forma de RNA ou sob a forma de DNA. O DNA inclui cDNA, DNA genômico e DNA sintético, e o DNA pode ser de fita dupla ou de fita simples. Se o DNA de fita simples puder ser o filamento de codificação ou filamento de não codificação (antisenso). Em certas modalidades, o polinucleotídeo é um cDNA ou um DNA que não tem um ou mais íntrons endógenos. Em certas modalidades, um polinucleotídeo é um polinucleotídeo de ocorrência não natural. Em certas modalidades, um polinucleotídeo é produzido de modo recombinante. Em certas

modalidades, os polinucleotídeos são isolados. Em certas modalidades, os polinucleotídeos são substancialmente puros. Em certas modalidades, um polinucleotídeo é purificado a partir de componentes naturais.

### **1.2.2 CÉLULAS E VETORES**

[0270] Em certos aspectos, são fornecidos no presente documento vetores (por exemplo, vetores de expressão) que compreendem polinucleotídeos que compreendem sequências de nucleotídeos que codificam anticorpos anti-B7-H4 e fragmentos de ligação ao antígeno dos mesmos ou um domínio do mesmo para expressão recombinante em células hospedeiras, de preferência em células de mamífero. São fornecidas também no presente documento células, por exemplo células hospedeiras, que compreendem tais vetores para expressar recombinantemente anticorpos anti-B7-H4 ou fragmentos de ligação ao antígeno dos mesmos descritos no presente documento (por exemplo, anticorpos humanos ou humanizados ou fragmentos de ligação ao antígeno dos mesmos). Num aspecto particular, são fornecidos no presente documento métodos para produzir um anticorpo ou fragmentos de ligação ao antígeno dos mesmos descritos no presente documento, que compreende expressar tal anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo numa célula hospedeira.

[0271] Em certas modalidades, a expressão recombinante de um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo ou domínio do mesmo descrito no presente documento (por exemplo, uma cadeia pesada ou leve descrita no presente documento) que se liga especificamente a B7-H4 (por exemplo, B7-H4 humano) envolve a construção de um vetor de expressão que contém um polinucleotídeo que codifica o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo ou domínio do mesmo. Uma vez que um polinucleotídeo que codifica um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo ou domínio do mesmo (por exemplo, domínio variável de cadeia pesada ou leve) descrito no presente documento foi obtido, o vetor para a produção do anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo pode ser produzido pela tecnologia de DNA recombinante com o uso de técnicas bem conhecidas na técnica. Deste modo, métodos para preparar uma proteína expressando-se um polinucleotídeo que contém um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo ou domínio do mesmo (por exemplo,

cadeia leve ou cadeia pesada) que codifica a sequência de nucleotídeos são descritos no presente documento. Métodos que são bem conhecidos pelos versados na técnica podem ser usados para construir vetores de expressão que contém anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo ou domínio do mesmo (por exemplo, cadeia leve ou cadeia pesada) que codifica sequências e sinais de controle tradicionais e transcricionais adequados. Estes métodos incluem, por exemplo, técnicas de DNA recombinante *in vitro*, técnicas sintéticas e recombinação genética *in vivo*. São fornecidos também vetores replicáveis que compreendem uma sequência de nucleotídeos que codifica um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo descrito no presente documento, uma cadeia pesada ou leve, um domínio variável de cadeia pesada ou leve, ou uma CDR de cadeia pesada ou leve, operacionalmente ligada a um promotor. Tais vetores podem, por exemplo, incluir a sequência de nucleotídeos que codifica a região constante do anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo (consulte, por exemplo, as publicações internacionais nº WO 86/05807 e WO 89/01036; e a patente nº U.S. 5.122.464), e domínios variáveis do anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo podem ser clonados em tal vetor para expressão de toda a cadeia pesada, toda cadeia leve, ou tanto as cadeias pesadas e leves.

[0272] Um vetor de expressão pode ser transferido para uma célula (por exemplo, célula hospedeira) por técnicas convencionais e as células resultantes podem, então ser cultivadas por técnicas convencionais para produzir um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo descrito no presente documento (por exemplo, um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo que compreende as seis CDRs, a VH, a VL, a VH e a VL, a cadeia pesada, a cadeia leve, ou a cadeia pesada e a cadeia leve de 20502, 20502.1 ou 22213) ou um domínio do mesmo (por exemplo, a VH, a VL, a VH e a VL, a cadeia pesada ou a cadeia leve de 20502, 20502.1 ou 22213). Deste modo, são fornecidas no presente documento células hospedeiras que contêm um polinucleotídeo que codifica um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo descrito no presente documento (por exemplo, um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo que compreende as seis CDRs, a VH, a VL, a VH e a VL, a cadeia pesada,

a cadeia leve, ou a cadeia pesada e a cadeia leve de 20502, 20502.1 ou 22213) ou um domínio do mesmo (por exemplo, a VH, a VL, a VH e a VL, a cadeia pesada ou a cadeia leve de 20502, 20502.1 ou 22213), operacionalmente ligado a um promotor para expressão de tais sequências na célula hospedeira. Em certas modalidades, para a expressão de anticorpos de cadeia dupla ou fragmentos de ligação ao antígeno dos mesmos, vetores que codificam tanto as cadeias pesadas como as leves, individualmente, podem ser coexpressados na célula hospedeira para a expressão de toda a imunoglobulina, conforme detalhado abaixo. Em certas modalidades, uma célula hospedeira contém um vetor que compreende um polinucleotídeo que codifica tanto a cadeia pesada como a cadeia leve de um anticorpo descrito no presente documento (por exemplo, a cadeia pesada e a cadeia leve de 20502, 20502.1 ou 22213), ou um domínio do mesmo (por exemplo, a VH e a VL de 20502, 20502.1 ou 22213). Em modalidades específicas, uma célula hospedeira contém dois vetores diferentes, um primeiro vetor que compreende um polinucleotídeo que codifica uma cadeia pesada ou uma região variável de cadeia pesada de um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo descrito no presente documento, e um segundo vetor que compreende um polinucleotídeo que codifica uma cadeia leve ou uma região variável de cadeia leve de um anticorpo descrito no presente documento (por exemplo, um anticorpo que compreende as seis CDRs de 20502, 20502.1 ou 22213), ou um domínio do mesmo. Em outras modalidades, uma primeira célula hospedeira compreende um primeiro vetor que compreende um polinucleotídeo que codifica uma cadeia pesada ou uma região variável de cadeia pesada de um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo descrito no presente documento, e uma segunda célula hospedeira compreende um segundo vetor que compreende um polinucleotídeo que codifica uma cadeia leve ou uma região variável de cadeia leve de um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo descrito no presente documento (por exemplo, um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo que compreende as seis CDRs de 20502, 20502.1 ou 22213). Em modalidades específicas, uma cadeia pesada/região variável de cadeia pesada expressada por uma primeira célula associada a uma cadeia leve/região variável de cadeia leve de uma segunda célula para formar um anticorpo anti-B7-H4 ou fragmento de ligação

ao antígeno do mesmo descrito no presente documento (por exemplo, anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo que compreende as seis CDRs de 20502, 20502.1 ou 22213). Em certas modalidades, é fornecida no presente documento uma população de células hospedeiras que compreende tal primeira célula hospedeira e tal segunda célula hospedeira.

[0273] Numa modalidade particular, é fornecida no presente documento uma população de vetores que compreende um primeiro vetor que compreende um polinucleotídeo que codifica uma cadeia leve/região variável de cadeia leve de um anticorpo anti-B7-H4 ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo descrito no presente documento, e um segundo vetor que compreende um polinucleotídeo que codifica uma cadeia pesada/região variável de cadeia pesada de um anticorpo anti-B7-H4 ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo descrito no presente documento (por exemplo, anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo que compreende as CDRs de 20502, 20502.1 ou 22213). Alternativamente, pode ser usado um único vetor que codifica, e é capaz de expressar, tanto os polipeptídeos de cadeia pesada como leve.

[0274] Uma variedade de sistemas de vetor de expressão de hospedeiro pode ser utilizada para expressar anticorpos e fragmentos de ligação ao antígeno dos mesmos descritos no presente documento (por exemplo, um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo que compreende as CDRs de 20502, 20502.1 ou 22213) (consulte, por exemplo, a patente nº U.S. 5.807.715). Tais sistemas de expressão de hospedeiro representam veículos através dos quais as sequências de codificação de interesse podem ser produzidas e subsequentemente purificadas, porém também representam células que podem, quando transformadas ou transfetadas com as sequências de codificação de nucleotídeos adequadas, expressar um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo descrito no presente documento *in situ*. Estes incluem, porém sem limitação, micro-organismos, tais como bactérias (por exemplo, *E. coli* e *B. subtilis*) transformadas com vetores de expressão de DNA de bacteriófago recombinante, DNA de plasmídeo ou DNA de cosmídeo que contém sequências de codificação de anticorpo; levedura (por exemplo, *Saccharomyces Pichia*) transformada com vetores de expressão de levedura recombinante que contêm

sequências de codificação de anticorpo; sistemas de células de inseto infectados com vetores de expressão de vírus recombinante (por exemplo, baculovírus) que contêm sequências de codificação de anticorpo; sistemas de células vegetais (por exemplo, algas verdes, tal como *Chlamydomonas reinhardtii*) infectados com vetores de expressão de vírus recombinante (por exemplo, vírus do mosaico da couve-flor, CaMV; vírus do mosaico do tabaco, TMV) ou transformados com vetores de expressão de plasmídeo recombinante (por exemplo, plasmídeo de Ti) que contêm sequências de codificação de anticorpo; ou sistemas de células de mamíferos (por exemplo, COS (por exemplo, COS1 ou COS), células CHO, BHK, MDCK, HEK 293, NS0, PER.C6, VERO, CRL7O3O, HsS78Bst, HeLa, e NIH 3T3, HEK-293T, HepG2, SP210, R1.1, B-W, L-M, BSC1, BSC40, YB/20 e BMT10) que abrigam construtos de expressão recombinante que contêm promotores derivados do genoma de células de mamífero (por exemplo, promotor de metalotioneína) ou de vírus de mamíferos (por exemplo, o promotor tardio de adenovírus; o promotor 7,5K de vírus vaccinia). Numa modalidade específica, as células para expressar anticorpos e fragmentos de ligação ao antígeno dos mesmos descritos no presente documento (por exemplo, um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo que compreende as CDRs de 20502, 20502.1 ou 22213) são células CHO, por exemplo células CHO do CHO GS System<sup>TM</sup> (Lonza). Numa modalidade particular, as células para expressar anticorpos descritos no presente documento são células humanas, por exemplo, linhagens celulares humanas. Numa modalidade específica, um vetor de expressão de mamífero é pOptiVEC<sup>TM</sup> ou pcDNA3.3. Numa modalidade particular, células bacterianas, tal como *Escherichia coli*, ou células eucarióticas (por exemplo, células de mamífero), especialmente para a expressão de toda a molécula de anticorpo recombinante, são usadas para a expressão de uma molécula de anticorpo recombinante. Por exemplo, as células de mamífero, tais como as células de ovário de hamster chinês (CHO) em conjunto com um vetor, tal como o principal elemento promotor de genes precoce intermediários do citomegalovírus humano, é um sistema de expressão eficaz para anticorpos (Foecking MK & Hofstetter H (1986) Gene 45: 101-105; e Cockett MI et al., (1990) Biotechnology 8: 662-667). Em certas modalidades, os anticorpos ou fragmentos de ligação ao antígeno dos mesmos descritos no presente documento

são produzidos por células CHO ou células NS0.

[0275] Ademais, pode-se escolher uma cepa de célula hospedeira que modula a expressão das sequências inseridas, ou modifica e processa o produto de gene na forma específica desejada. Tais modificações (por exemplo, glicosilação) e processamento (por exemplo, clivagem) de produtos de proteína podem contribuir com a função da proteína. Para esta finalidade, células hospedeiras eucarióticas que têm os mecanismos celulares para o processamento adequado da transcrição, glicosilação e fosforilação primárias do produto de gene podem ser usadas. Tais células hospedeiras de mamífero incluem, porém sem limitação CHO, VERO, BHK, Hela, MDCK, HEK 293, NIH 3T3, W138, BT483, Hs578T, HTB2, BT2O e T47D, NS0 (uma linhagem celular de mieloma murino que não produz endogenamente nenhuma cadeia de imunoglobulina), células CRL7O3O, COS (por exemplo, COS1 ou COS), PER.C6, VERO, HsS78Bst, HEK-293T, HepG2, SP210, R1.1, B-W, L-M, BSC1, BSC40, YB/20, BMT10 e HsS78Bst. Em certas modalidades, os anticorpos anti-B7-H4 descritos no presente documento (por exemplo, um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo que compreende as CDRs de 20502, 20502.1 ou 22213) são produzidos em células de mamífero, tais como CHO.

[0276] Em certas modalidades, os anticorpos anti-B7-H4 descritos no presente documento (por exemplo, um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo que compreende as CDRs de 20502, 20502.1 ou 22213) são produzidos em células CHOK1SV Potelligent®.

[0277] Em algumas modalidades, são fornecidas células hospedeiras que compreendem ácido nucleico que codifica um anticorpo B7-H4 ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo descrito no presente documento, em que a célula hospedeira não tem um gene alfa-1,6-fucosiltransferase funcional (FUT8). Em algumas modalidades, a célula hospedeira é uma célula CHO.

[0278] Uma vez que um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo descrito no presente documento foi produzido por expressão recombinante, o mesmo pode ser purificado por qualquer método conhecido na técnica para purificação de uma molécula de imunoglobulina, por exemplo, por cromatografia (por exemplo, troca iônica, afinidade, particularmente por afinidade com o antígeno

específico após a Proteína A, e cromatografia em coluna de dimensionamento), centrifugação, solubilidade diferencial, ou qualquer outra técnica padrão para a purificação de proteínas. Ademais, os anticorpos ou fragmentos de ligação ao antígeno dos mesmos descritos no presente documento podem ser fundidos às sequências de polipeptídeo heterólogas descritas no presente documento ou, de outro modo, conhecidas na técnica para facilitar a purificação.

[0279] Em modalidades específicas, um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo descrito no presente documento é isolado ou purificado. Geralmente, um anticorpo isolado ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo é aquele que é substancialmente isento de outros anticorpos ou fragmentos de ligação ao antígeno dos mesmos com especificidades antigênicas diferentes do anticorpo isolado ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo. Por exemplo, numa modalidade particular, uma preparação de um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo descrito no presente documento é substancialmente isenta de material celular e/ou precursores químicos.

### **1.3 COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS**

[0280] São fornecidas no presente documento composições que compreendem um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo descrito no presente documento que tem o grau de pureza desejado num carreador, excipiente ou estabilizante fisiologicamente aceitável (*Remington's Pharmaceutical Sciences* (1990) Mack Publishing Co., Easton, PA). Carreadores, excipientes ou estabilizantes fisiologicamente aceitáveis são não tóxicos aos receptores nas dosagens e concentrações empregadas.

[0281] Em várias modalidades, as composições que compreendem um anticorpo anti-B7-H4 ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo são fornecidas em formulações com um carreador farmaceuticamente aceitável (consulte, por exemplo, Gennaro, *Remington: The Science and Practice of Pharmacy with Facts and Comparisons: Drugfacts Plus*, 20<sup>a</sup> edição (2003); Ansel et al., *Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems*, 7<sup>a</sup> edição, Lippencott Williams and Wilkins (2004); Kibbe et al., *Handbook of Pharmaceutical Excipients*, 3<sup>a</sup> edição, Pharmaceutical Press (2000)).

[0282] As composições farmacêuticas descritas no presente documento

podem ser úteis no bloqueio da atividade inibitória de B7-H4 contra células T e/ou em depleção dependente de ADCC de células que expressam B7-H4. As composições farmacêuticas descritas no presente documento podem ser úteis no tratamento de uma condição, tal como câncer. Exemplos de câncer que podem ser tratados de acordo com os métodos descritos no presente documento incluem, porém sem limitação, câncer de mama (por exemplo, câncer de mama triplo negativo, carcinoma ductal), carcinoma endometrial, câncer de ovário e câncer de pulmão de células não pequenas (por exemplo, carcinoma de célula escamosa), câncer pancreático, câncer de tireoide, câncer de rim (por exemplo, carcinoma de células renais) e câncer de bexiga (por exemplo, carcinoma de células uroteliais). Um câncer de pulmão de células não pequenas pode ser, por exemplo, um adenocarcinoma. Exemplos adicionais de câncer que podem ser tratados de acordo com os métodos descritos no presente documento incluem, porém sem limitação, câncer de cabeça e pescoço, câncer de pulmão de célula pequena, câncer gástrico, melanoma e colangiocarcinoma. Numa modalidade, o câncer de ovário é um adenocarcinoma seroso. Numa modalidade, o câncer de mama é um adenocarcinoma ductal.

[0283] As composições farmacêuticas descritas no presente documento são, numa modalidade, para uso como um medicamento. As composições farmacêuticas descritas no presente documento são, numa modalidade, para uso como um diagnóstico, por exemplo, para detectar a presença de B7-H4 numa amostra obtida a partir de um paciente (por exemplo, um paciente humano).

[0284] As composições a serem usadas para administração *in vivo* podem ser estéreis. Isto é prontamente realizado por filtração, por exemplo, através de membranas de filtração estéreis.

[0285] Em algumas modalidades, são fornecidas composições farmacêuticas, em que a composição farmacêutica compreende anticorpos anti-B7-H4 ou fragmentos de ligação ao antígeno dos mesmos descritos no presente documento e um carreador farmaceuticamente aceitável. Em algumas modalidades, são fornecidas composições farmacêuticas, em que a composição farmacêutica compreende anticorpos anti-B7-H4 afucosilados ou fragmentos de ligação ao antígeno dos mesmos descritos no presente documento e um carreador

farmaceuticamente aceitável. Em modalidades específicas, tal composição farmacêutica compreende anticorpos anti-B7-H4 afucosilados ou fragmentos de ligação ao antígeno por exemplo, em que pelo menos 80% dos anticorpos na composição são afucosilados. Em modalidades específicas, tal composição farmacêutica compreende anticorpos anti-B7-H4 afucosilados ou fragmentos de ligação ao antígeno por exemplo, em que pelo menos 85% dos anticorpos na composição são afucosilados. Em modalidades específicas, tal composição farmacêutica compreende anticorpos anti-B7-H4 afucosilados ou fragmentos de ligação ao antígeno por exemplo, em que pelo menos 90% dos anticorpos na composição são afucosilados. Em modalidades específicas, tal composição farmacêutica compreende anticorpos anti-B7-H4 afucosilados ou fragmentos de ligação ao antígeno por exemplo, em que pelo menos 95% dos anticorpos na composição são afucosilados. Em modalidades específicas, tal composição farmacêutica compreende anticorpos anti-B7-H4 afucosilados ou fragmentos de ligação ao antígeno por exemplo, em que pelo menos 96% dos anticorpos na composição são afucosilados. Em modalidades específicas, tal composição farmacêutica compreende anticorpos anti-B7-H4 afucosilados ou fragmentos de ligação ao antígeno por exemplo, em que pelo menos 97% dos anticorpos na composição são afucosilados. Em modalidades específicas, tal composição farmacêutica compreende anticorpos anti-B7-H4 afucosilados ou fragmentos de ligação ao antígeno por exemplo, em que pelo menos 98% dos anticorpos na composição são afucosilados. Em modalidades específicas, tal composição farmacêutica compreende anticorpos anti-B7-H4 afucosilados ou fragmentos de ligação ao antígeno por exemplo, em que pelo menos 99% dos anticorpos na composição são afucosilados. Em modalidades específicas, tal composição farmacêutica compreende anticorpos anti-B7-H4 afucosilados ou fragmentos de ligação ao antígeno em que a fucose é indetectável na composição.

[0286] Em algumas modalidades, uma composição farmacêutica compreende (i) um anticorpo isolado ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo que se liga especificamente a B7-H4 humano, que compreende (a) as sequências de região determinante de complementaridade (CDR) 1 de região variável de cadeia pesada (VH), CDR2 de VH, CDR3 de VH e região variável de

cadeia leve (VL) CDR1, CDR2, e CDR3 das SEQ ID NOs:458-463, respectivamente, (b) uma região de cadeia pesada variável que compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:464 e uma região de cadeia leve variável que compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:42, ou (c) uma cadeia pesada que compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:469 e uma cadeia leve que compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:44, e (ii) um excipiente farmaceuticamente aceitável.

[0287] É fornecida também no presente documento uma composição farmacêutica que compreende (i) anticorpos ou fragmentos de ligação ao antígeno dos mesmos que se ligam especificamente a B7-H4 humano e compreendem sequências de região determinante de complementaridade (CDR) 1 de região variável de cadeia pesada (VH), CDR2 de VH, CDR3 de VH e região variável de cadeia leve (VL) CDR1, CDR2 e CDR3 das SEQ ID NOs:458-463, respectivamente e (ii) um excipiente farmaceuticamente aceitável, em que pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98% ou pelo menos 99% dos anticorpos ou fragmentos de ligação ao antígeno dos mesmos na composição são afucosilados. Numa modalidade, (i) o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo compreende uma região de cadeia pesada variável que compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:464 e uma região de cadeia leve variável que compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:42 ou (ii) o anticorpo compreende uma cadeia pesada que compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:469 e uma cadeia leve que compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:44.

[0288] Em algumas modalidades, uma composição farmacêutica compreende (i) um anticorpo isolado ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo que se liga especificamente a B7-H4 humano, que compreende (a) as sequências de região determinante de complementaridade (CDR) 1 de região variável de cadeia pesada (VH), CDR2 de VH, CDR3 de VH e região variável de cadeia leve (VL) CDR1, CDR2, e CDR3 das SEQ ID NOs:35-40, respectivamente, (b) uma região de cadeia pesada variável que compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:41 e uma região de cadeia leve variável que compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:42, ou (c) uma cadeia

pesada que compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:43 e uma cadeia leve que compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:44, e (ii) um excipiente farmaceuticamente aceitável.

[0289] É fornecida também no presente documento uma composição farmacêutica que compreende (i) anticorpos ou fragmentos de ligação ao antígeno dos mesmos que se ligam especificamente a B7-H4 humano e compreendem sequências de região determinante de complementaridade (CDR) 1 de região variável de cadeia pesada (VH), CDR2 de VH, CDR3 de VH e região variável de cadeia leve (VL) CDR1, CDR2 e CDR3 das SEQ ID NOs:35-40, respectivamente e (ii) um excipiente farmaceuticamente aceitável, em que pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98% ou pelo menos 99% dos anticorpos ou fragmentos de ligação ao antígeno dos mesmos na composição são afucosilados. Numa modalidade, (i) o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo compreende uma região de cadeia pesada variável que compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:41 e uma região de cadeia leve variável que compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:42 ou (ii) o anticorpo compreende uma cadeia pesada que compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:43 e uma cadeia leve que compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:44.

[0290] Em algumas modalidades, uma composição farmacêutica compreende (i) um anticorpo isolado ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo que se liga especificamente a B7-H4 humano, que compreende (a) as sequências de região determinante de complementaridade (CDR) 1 de região variável de cadeia pesada (VH), CDR2 de VH, CDR3 de VH e região variável de cadeia leve (VL) CDR1, CDR2, e CDR3 das SEQ ID NOs:65-70, respectivamente, (b) uma região de cadeia pesada variável que compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:71 e uma região de cadeia leve variável que compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:72, ou (c) uma cadeia pesada que compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:73 e uma cadeia leve que compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:74, e (ii) um excipiente farmaceuticamente aceitável.

[0291] É fornecida também no presente documento uma composição

farmacêutica que compreende (i) anticorpos ou fragmentos de ligação ao antígeno dos mesmos que se ligam especificamente a B7-H4 humano e compreendem sequências de região determinante de complementaridade (CDR) 1 de região variável de cadeia pesada (VH), CDR2 de VH, CDR3 de VH e região variável de cadeia leve (VL) CDR1, CDR2 e CDR3 das SEQ ID NOs:65-70, respectivamente e (ii) um excipiente farmaceuticamente aceitável, em que pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98% ou pelo menos 99% dos anticorpos ou fragmentos de ligação ao antígeno dos mesmos na composição são afucosilados. Numa modalidade, (i) o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo compreende uma região de cadeia pesada variável que compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:71 e uma região de cadeia leve variável que compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:72 ou (ii) o anticorpo compreende uma cadeia pesada que compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:73 e uma cadeia leve que compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:74.

## **1.4 USOS E MÉTODOS**

### **1.4.1 USOS E MÉTODOS TERAPÊUTICOS**

[0292] Num aspecto, são apresentados no presente documento métodos para modular uma ou mais funções num indivíduo, que compreendem administrar a um indivíduo que necessite do mesmo, um anticorpo anti-B7-H4 ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo descrito no presente documento ou uma composição farmacêutica do mesmo, conforme descrito acima e no presente documento.

[0293] Em outra modalidade, um anticorpo anti-B7-H4 ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, ou composição farmacêutica, é administrado a um paciente (por exemplo, um paciente humano) para aumentar a proliferação de células T, células T CD4+ ou células T CD8+ no paciente. Em outra modalidade, um anticorpo anti-B7-H4 ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, ou composição farmacêutica, é administrado a um paciente (por exemplo, um paciente humano) para aumentar a produção de interferon gama (IFNy) no paciente. Em outra modalidade, um anticorpo anti-B7-H4 ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, ou composição farmacêutica, é administrado a um paciente (por exemplo,

um paciente humano) para bloquear a atividade inibitória de B7-H4 contra células T no paciente. Em outra modalidade, um anticorpo anti-B7-H4 ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, ou composição farmacêutica, é administrado a um paciente (por exemplo, um paciente humano) para esgotar as células de câncer que expressam B7-H4 no paciente. Em outra modalidade, o anticorpo anti-B7-H4 ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, ou composição farmacêutica, é administrado para obter dois ou mais dos efeitos acima.

[0294] Numa certa modalidade, são fornecidos no presente documento métodos de tratamento um câncer, por exemplo, um câncer que expressa B7-H4. O método de tratamento de câncer pode compreender administrar um anticorpo anti-B7-H4 ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo fornecido no presente documento ou uma composição farmacêutica que compreende um anticorpo anti-B7-H4 ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo fornecido no presente documento a um paciente (por exemplo, um paciente humano) que necessite do mesmo.

[0295] Numa certa modalidade, são fornecidos no presente documento métodos de tratamento de um câncer selecionado do grupo que consiste em: câncer de mama (por exemplo, câncer de mama triplo negativo, carcinoma ductal), carcinoma endometrial, câncer de ovário, câncer de pulmão de células não pequenas (por exemplo, carcinoma de célula escamosa), câncer pancreático, câncer de tireoide, câncer de rim (por exemplo, carcinoma de células renais), e câncer de bexiga (por exemplo, carcinoma de células uroteliais). Numa certa modalidade, são fornecidos no presente documento métodos de tratamento um câncer de pulmão de células não pequenas que é um adenocarcinoma. Numa certa modalidade, são fornecidos no presente documento métodos de tratamento de um câncer selecionado do grupo que consiste em: câncer de cabeça e pescoço, câncer de pulmão de célula pequena, câncer gástrico, melanoma e colangiocarcinoma. Numa modalidade, o câncer de ovário é um adenocarcinoma seroso. Numa modalidade, o câncer de mama é um adenocarcinoma ductal. Em algumas modalidades, tais métodos compreendem administrar um anticorpo anti-B7-H4 ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo fornecido no presente documento ou uma composição farmacêutica que compreende um anticorpo anti-B7-H4 ou

fragmento de ligação ao antígeno do mesmo fornecido no presente documento a um paciente (por exemplo, um paciente humano) que necessite do mesmo. Em algumas modalidades, o câncer é um câncer que expressa B7-H4.

[0296] Numa certa modalidade, é fornecido no presente documento um método de tratamento de um câncer que é um respondente inadequado de inibidor PD-1/PD-L1. Um câncer que é um respondente inadequado de inibidor PD-1/PD-L1, pode ter respondido anteriormente a um inibidor PD-1/PD-L1, porém pode ter se tornado menos responsivo ao inibidor PD-1/PD-L1, ou o câncer pode nunca ter respondido ao inibidor PD-1/PD-L1. A resposta inadequada a um inibidor PD-1/PD-L1 significa que os aspectos do câncer que poderiam melhorar após uma dose padrão do inibidor PD-1/PD-L1 não melhoram, e/ou a melhora ocorre apenas se uma dose maior que a padrão for administrada. Em algumas modalidades, um indivíduo com um câncer que é um respondente inadequado de inibidor PD-1/PD-L1 sofreu ou está sofrendo uma resposta inadequada ao inibidor PD-1/PD-L1 após receber uma dose padrão por pelo menos duas semanas, pelo menos três semanas, pelo menos quatro semanas, pelo menos seis semanas ou pelo menos doze semanas. Uma dose “padrão” é determinada por um profissional médico, e pode depender da idade, peso, histórico de saúde, gravidade da doença, a frequência de dosagem do indivíduo, etc. Em algumas modalidades, o indivíduo com um câncer que é um respondente inadequado de inibidor PD-1/PD-L1 sofreu ou está sofrendo uma resposta inadequada a um anticorpo anti-PD-1 e/ou um anticorpo anti-PD-L1. Em algumas modalidades, um indivíduo com câncer que é um respondente inadequado de inibidor PD-1/PD-L1 sofreu ou está sofrendo, uma resposta inadequada a AMP-224. Em algumas modalidades, um indivíduo com câncer que é um respondente inadequado de inibidor PD-1/PD-L1 sofreu ou está sofrendo, uma resposta inadequada a um inibidor PD-1/PD-L1 selecionado dentre nivolumab, pembrolizumab e atezolizumab.

[0297] Numa certa modalidade, é fornecido no presente documento um método para tratar um câncer que expressa um baixo nível de PD-L1. Em algumas modalidades, um câncer que expressa um “baixo nível de PD-L1” ou expressa “PD-L1 a um baixo nível”, indica que o nível de PD-L1 está abaixo do nível de expressão para um câncer que é indicado para o tratamento com um antagonista de PD-1 ou

PD-L1 em que os pacientes são selecionados para tratamento com base nos níveis de expressão de PD-L1. Em algumas modalidades, um “baixo nível de PD-L1” é aquele em que menos de 1% das células no tumor têm coloração de membrana. Em algumas modalidades, um “baixo nível” em relação a PD-L1 é menor que 1% de coloração, por exemplo, 0,9, 0,8, 0,7, 0,6, 0,5, 0,4, 0,3, 0,2, 0,1% ou 0% das células do tumor são manchadas. Em algumas modalidades, os níveis de expressão de PD-L1 podem ser medidos por IHC cromogênica ou IHC por imunofluorescência (pontuação Aqua). Em certas modalidades, a coloração de PD-L1 de 5% ou menos (incluindo células tumorais e/ou imunes) pode indicar que uma amostra expressa um “baixo nível de PD-L1”. Em certas modalidades, a coloração de PD-L1 de 10% ou menos (incluindo células tumorais e/ou imunes) pode indicar que uma amostra expressa um “baixo nível de PD-L1”. A menos que indicado de outro modo no presente documento, um limiar de 5% é usado no presente documento (isto é, 5% ou menos indica um “baixo nível de PD-L1”).

[0298] Em outra modalidade, um anticorpo anti-B7-H4 ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, ou composição farmacêutica, é administrado a um paciente (por exemplo, um paciente humano) diagnosticado com câncer para aumentar a proliferação de células T, células T CD4+ ou células T CD8+ no paciente. Em outra modalidade, um anticorpo anti-B7-H4 ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, ou composição farmacêutica, é administrado a um paciente (por exemplo, um paciente humano) diagnosticado com câncer para aumentar a produção de interferon gama (IFN $\gamma$ ) no paciente. Em outra modalidade, um anticorpo anti-B7-H4 ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, ou composição farmacêutica, é administrado a um paciente (por exemplo, um paciente humano) diagnosticado com câncer para bloquear a atividade inibitória de B7-H4 contra células T no paciente. Em outra modalidade, um anticorpo anti-B7-H4 ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, ou composição farmacêutica, é administrado a um paciente (por exemplo, um paciente humano) diagnosticado com câncer para esgotar células de câncer que expressam B7-H4 no paciente.

[0299] Em modalidades adicionais, um anticorpo anti-B7-H4 ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, ou composição farmacêutica, é administrado a um paciente conforme fornecido acima, e adicionalmente em combinação com um

agente terapêutico adicional, por exemplo, um agente quimioterápico ou um agente estimulante imune, tal como um inibidor de ponto de verificação de células T.

[0300] Numa modalidade exemplificativa, o agente terapêutico adicional é um antagonista de PD-1, tal como um anticorpo PD-1 antagonista. Os anticorpos PD-1 adequados incluem, por exemplo, OPDIVO (nivolumab), KEYTRUDA (pembrolizumab) ou MEDI-0680 (AMP-514; WO2012/145493). Os anticorpos PD-1 adequados também incluem, por exemplo, camrelizumab (SHR-1210), tislelizumab (BGB-A317) ou spartalizumab (NPVPDR001, NVS240118, PDR001). O agente terapêutico adicional também pode incluir pidilizumab (CT-011). Uma proteína recombinante composta do domínio extracelular de PD-L2 (B7-DC) fundido à porção Fc da IgG1, chamada de AMP-224, também pode ser usada para antagonizar o receptor de PD-1.

[0301] Em outra modalidade exemplificativa, o agente terapêutico adicional é um antagonista de PD-L1, tal como um anticorpo PD-L1 antagonista. Os anticorpos PD-L1 adequados incluem, por exemplo, TECENTRIQ (atezolizumab), durvalumab (MEDI4736), BMS-936559 (WO2007/005874), MSB0010718C (WO2013/79174) ou rHigM12B7.

[0302] Em ainda outra modalidade exemplificativa, o agente terapêutico adicional é um agonista de GITR, tal como um anticorpo GITR agonista. Os anticorpos GITR adequados incluem, por exemplo, TRX-518 (WO06/105021, WO09/009116), MK-4166 (WO11/028683) ou um anticorpo GITR revelado no documento WO2015/031667. Em outra modalidade, o agente terapêutico adicional é um anticorpo GITR revelado no documento WO2017/015623. Numa modalidade particular, o anticorpo GITR é selecionado dentre: a) um anticorpo que comprehende um domínio de ligação GITR (GITR-BD) que comprehende uma CDR1 que comprehende a sequência da SEQ ID NO:411, uma CDR2 que comprehende a sequência da SEQ ID NO:412, e uma CDR3 que comprehende a sequência da SEQ ID NO:413; b) um anticorpo que comprehende um GITR-BD que comprehende a sequência da SEQ ID NO:414; c) uma molécula tetravalente que comprehende duas cópias de um polipeptídeo que tem a estrutura (GITR-BD)-Ligante-(GITR-BD)-Ligante-Dobradiça-Fc, em que (i) o GITR-BD comprehende uma CDR1 que comprehende a sequência da SEQ ID NO:411, uma CDR2 que comprehende a

sequência da SEQ ID NO:412, e uma CDR3 que comprehende a sequência da SEQ ID NO:413, (ii) o Ligante é um polipeptídeo, (iii) a Dobradiça é um polipeptídeo derivado de uma região de dobradiça de imunoglobulina, e (iv) o Fc é um polipeptídeo Fc de imunoglobulina; d) uma molécula tetravalente que comprehende duas cópias de um polipeptídeo que tem a estrutura (GITR-BD)-Ligante-(GITR-BD)-Ligante-Dobradiça-Fc, em que (i) o GITR-BD comprehende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:414, (ii) o Ligante é um polipeptídeo, (iii) a Dobradiça é um polipeptídeo derivado de uma região de dobradiça de imunoglobulina, e (iv) o Fc é um polipeptídeo Fc de imunoglobulina; e e) uma molécula tetravalente que comprehende duas cópias de um polipeptídeo que comprehende a sequência da SEQ ID NO: 415. Em qualquer uma das modalidades acima de uma molécula tetravalente, uma Dobradiça pode compreender a sequência da SEQ ID NO:416, 417 ou 418. Em qualquer uma das modalidades acima de uma molécula tetravalente, um Ligante pode compreender uma sequência de aminoácidos selecionada dentre GG, GGG, e SEQ ID NOs:419-425. Em certas modalidades, a Dobradiça comprehende SEQ ID NO:417 e o Ligante comprehende qualquer uma das SEQ ID NOs:419-423.

[0303] Em ainda outra modalidade exemplificativa, o agente terapêutico adicional é um domínio extracelular CD80 (ECD CD80), por exemplo, SEQ ID NO:426; ou uma molécula de fusão ECD CD80 que comprehende ECD CD80 e um parceiro de fusão, conforme revelado no documento WO2017/079117. Em certas modalidades, a molécula de fusão ECD CD80 é uma proteína de fusão ECD-Fc CD80. Numa modalidade específica, a proteína de fusão ECD-Fc CD80 comprehende a sequência da SEQ ID NO:427 ou 428.

[0304] Em ainda outras modalidades exemplificativas, o agente terapêutico adicional é um anticorpo anti-CSF1R revelado nos documentos US8.182.813, US8.206.715, US8.263.079, US8.513.199 ou US9.221.910. Numa modalidade particular, o anticorpo anti-CSF1R é selecionado dentre: a) um anticorpo que comprehende uma cadeia pesada que comprehende a sequência da SEQ ID NO:429 e uma cadeia leve que comprehende a sequência da SEQ ID NO:430; b) um anticorpo que comprehende uma cadeia pesada que comprehende uma região determinante de complementaridade 1 (CDR1) de cadeia pesada (HC) que

compreende a sequência da SEQ ID NO:431, uma CDR2 HC que comprehende a sequência da SEQ ID NO:432, e uma CDR3 HC que comprehende a sequência da SEQ ID NO:433, e uma cadeia leve que comprehende uma CDR1 de cadeia leve (LC) que comprehende a sequência da SEQ ID NO:434, uma CDR2 LC que comprehende a sequência da SEQ ID NO:435, e uma CDR3 LC que comprehende a sequência da SEQ ID NO:436; e c) um anticorpo que comprehende uma cadeia pesada que comprehende a sequência da SEQ ID NO:437 e uma cadeia leve que comprehende a sequência da SEQ ID NO:438.

[0305] Geralmente, o paciente é um ser humano, porém mamíferos não humanos incluindo mamíferos transgênicos também podem ser tratados.

[0306] Em algumas modalidades, a presente invenção se refere a um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo ou composição farmacêutica fornecida no presente documento para uso como um medicamento. Em alguns aspectos, a presente invenção se refere a um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo ou composição farmacêutica fornecida no presente documento, para uso num método para o tratamento de câncer. Em alguns aspectos, a presente invenção se refere a um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo ou composição farmacêutica fornecida no presente documento, para uso num método para o tratamento de câncer num indivíduo, que comprehende administrar ao indivíduo uma quantidade eficaz de um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo ou composição farmacêutica fornecida no presente documento.

#### **1.4.1.1 VIAS DE ADMINISTRAÇÃO & DOSAGEM**

[0307] Um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo ou composição descrito no presente documento pode ser entregue a um indivíduo por meio de uma variedade de vias, tal como parenteral, subcutânea, intravenosa, intradérmica, transdérmica, intranasal, intratumoral e administração a um linfonodo de drenagem tumoral. Numa modalidade, o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo ou composição é administrado por uma via intravenosa.

[0308] A quantidade de um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo ou composição que será eficaz no tratamento de uma afecção irá depender da natureza da doença. A dose precisa a ser empregada numa

composição também irá depender da via de administração e da gravidade da doença.

#### **1.4.2 DETECÇÃO & USOS DE DIAGNÓSTICO**

[0309] Um anticorpo anti-B7-H4 ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo descrito no presente documento (consulte, por exemplo, Seção 5.2) pode ser usado para analisar os níveis de proteína B7-H4 numa amostra biológica com o uso de métodos clássicos conhecidos por aqueles versados na técnica, incluindo imunoensaios, tal como ensaio imunossorvente ligado à enzima (ELISA), imunoprecipitação ou Western blotting. Identificações de ensaio de anticorpo adequadas são conhecidas na técnica e incluem identificações de enzima, tais como, glicose oxidase; radioisótopos, tais como iodo (125I, 121I), carbono (14C), enxofre (35S), trítio (3H), índio (121In) e tecnécio (99Tc); identificações luminescentes, tal como luminol; e identificações fluorescentes, tais como fluoresceína e rodamina, e biotina. Tais identificações podem ser usadas para identificar um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo descrito no presente documento. Alternativamente, um segundo anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo que reconhece um anticorpo anti-B7-H4 ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo descrito no presente documento pode ser identificado e usado em combinação com um anticorpo anti-B7-H4 ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo para detectar níveis de proteína B7-H4.

[0310] A análise do nível de expressão de proteína B7-H4 se destina a incluir medição ou estimativa qualitativa ou quantitativa do nível de uma proteína B7-H4 numa primeira amostra biológica direta (por exemplo, ao determinar ou estimar o nível de proteína absoluto) ou relativamente (por exemplo, ao comparar com o nível de proteína associado à doença numa segunda amostra biológica). O nível de expressão de polipeptídeo B7-H4 na primeira amostra biológica pode ser medido ou estimado e comparado com um nível de proteína B7-H4 padrão, sendo que o padrão é tomado a partir de uma segunda amostra biológica obtida a partir de um indivíduo que não tem distúrbio ou é determinado calculando-se a média dos níveis de uma população de indivíduos que não têm o distúrbio. Conforme será observado na técnica, uma vez que o nível de polipeptídeo B7-H4 “padrão” é conhecido, o mesmo pode ser usado repetidamente como um padrão para comparação.

[0311] Conforme usado no presente documento, o termo “amostra biológica” se refere a qualquer amostra biológica obtida a partir de um indivíduo, linhagem celular, tecido ou outra fonte de células que expressam potencialmente B7-H4. Métodos para obter biópsias de tecido e fluidos corporais de animais (por exemplo, seres humanos) são bem conhecidos na técnica. Amostras biológicas incluem células mononucleares do sangue periférico. Uma amostra biológica também pode ser uma amostra sanguínea, na qual células tumorais circulantes (ou “CTCs”) podem expressar B7-H4 e serem detectadas.

[0312] Um anticorpo anti-B7-H4 descrito no presente documento pode ser usado para aplicações de prognóstico, diagnóstico, monitoramento e triagem, incluindo aplicações *in vitro* e *in vivo* bem conhecidas e padrão para a pessoa versada na técnica e com base na presente descrição. Os ensaios de prognóstico, diagnóstico, monitoramento e triagem e kits para análise e avaliação *in vitro* de situação de sistema imune e/ou resposta imune podem ser utilizados para prever, diagnosticar e monitorar para avaliar as amostras de paciente que incluem aquelas conhecidas por ter ou com suspeita de ter uma disfunção do sistema imune ou câncer. Este tipo de monitoramento e avaliação de prognóstico e diagnóstico já está em prática utilizando anticorpos contra a proteína HER2 em câncer de mama (HercepTestTM, Dako) em que o ensaio também é usado para avaliar pacientes para terapia com anticorpos com o uso de Herceptin®. As aplicações *in vivo* incluem terapia celular direta e modulação de sistema imune e radioimageamento de respostas imunes.

[0313] Antianticorpos B7-H4 e fragmentos de ligação ao antígeno dos mesmos descritos no presente documento podem portar uma identificação detectável ou funcional. Quando as identificações de fluorescência são usadas, a microscopia atualmente disponível e a análise de classificador de célula ativada por fluorescência (FACS) ou combinação de ambos os procedimentos de métodos conhecidos na técnica pode ser utilizada para identificar e quantificar os membros de ligação específicos. Anticorpos anti-B7-H4 ou fragmentos de ligação ao antígeno dos mesmos descritos no presente documento podem portar uma identificação de fluorescência. As identificações de fluorescência exemplificativas incluem, por exemplo, sondas reativas e conjugadas, por exemplo, Aminocumarina,

Fluoresceína e corantes vermelho Texas, Alexa Fluor, corantes Cy e corantes DyLight. Um anticorpo anti-B7-H4 pode portar uma identificação radioativa, tais como os isótopos 3H, 14C, 32P, 35S, 36Cl, 51Cr, 57Co, 58Co, 59Fe, 67Cu, 90Y, 99Tc, 111In, 117Lu, 121I, 124I, 125I, 131I, 198Au, 211At, 213Bi, 225Ac e 186Re. Quando identificações radioativas são usadas, procedimentos de contagem atualmente disponíveis conhecidos na técnica podem ser utilizados para identificar e quantificar a ligação específica do anticorpo anti-B7-H4 ou fragmento de ligação ao antígeno a B7-H4 (por exemplo, B7-H4 humano). No caso em que a identificação é uma enzima, a detecção pode ser realizada por qualquer uma das técnicas colorimétricas, espectrofotométricas, fluorospectrofotométricas, amperométricas ou gasométricas atualmente utilizadas, conforme conhecido na técnica. Isto pode ser realizado colocando-se uma amostra ou uma amostra de controle em contato com um anticorpo anti-B7-H4 ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo sob condições que permitam a formação de um complexo entre o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo e B7-H4. Quaisquer complexos formados entre o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo e B7-H4 são detectados e comparados na amostra e no controle. À luz da ligação específica dos anticorpos ou fragmentos de ligação ao antígeno dos mesmos descritos no presente documento para B7-H4, os anticorpos ou fragmentos de ligação ao antígeno dos mesmos podem ser usados para detectar especificamente a expressão de B7-H4 sobre a superfície das células. Os anticorpos ou fragmentos de ligação ao antígeno dos mesmos descritos no presente documento também podem ser usados para purificar B7-H4 por meio de purificação por imunoafinidade.

[0314] É incluído também no presente documento um sistema de ensaio que pode ser preparado sob a forma de um kit de teste para a análise quantitativa da extensão da presença, por exemplo, de B7-H4. O sistema ou kit de teste pode compreender um componente identificado, por exemplo, um anticorpo identificado ou fragmento de ligação ao antígeno, e um ou mais reagentes imunoquímicos adicionais. Consulte, por exemplo, a Seção 5.6 abaixo para mais sobre kits.

[0315] Em alguns aspectos, métodos para detecção *in vitro* de B7-H4 numa amostra, que compreendem colocar a referida amostra em contato com um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, são fornecidos no

presente documento. Em alguns aspectos, é fornecido no presente documento o uso de um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo fornecido no presente documento, para detecção *in vitro* de B7-H4 numa amostra. Num aspecto, é fornecido no presente documento um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo ou composição farmacêutica fornecida no presente documento para uso na detecção de B7-H4 num indivíduo ou numa amostra obtida a partir de um indivíduo. Num aspecto, é fornecido no presente documento um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo ou composição farmacêutica fornecida no presente documento para uso como um diagnóstico. Numa modalidade preferida, o anticorpo comprehende uma identificação detectável. Numa modalidade preferida, B7-H4 é B7-H4 humano. Numa modalidade preferida, o indivíduo é um ser humano.

### **1.5 KITS**

[0316] São fornecidos no presente documento kits que compreendem um ou mais anticorpos ou fragmentos de ligação ao antígeno dos mesmos descritos no presente documento ou conjugados dos mesmos. Numa modalidade específica, é fornecida no presente documento uma embalagem farmacêutica ou kit que comprehende um ou mais recipientes carregados com um ou mais dos ingredientes das composições farmacêuticas descritas no presente documento, tais como um ou mais anticorpos ou fragmentos de ligação ao antígeno dos mesmos fornecidos no presente documento. Um aviso opcionalmente associado com esse recipiente (ou recipientes) na forma prescrita por uma agência governamental que regula a fabricação, uso ou venda de produtos farmacêuticos ou biológicos, cujo aviso reflete a aprovação pela agência de fabricação, uso ou venda para administração humana.

[0317] São fornecidos também no presente documento kits que podem ser usados em métodos de diagnóstico. Numa modalidade, um kit comprehende um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo descrito no presente documento, de preferência um anticorpo purificado ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, num ou mais recipientes. Numa modalidade específica, os kits descritos no presente documento contêm um antígeno B7-H4 substancialmente isolado (por exemplo, B7-H4 humano) que pode ser usado como um controle. Em

outra modalidade específica, os kits descritos no presente documento compreendem adicionalmente um anticorpo de controle ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo que não reage com um antígeno B7-H4. Em outra modalidade específica, os kits descritos no presente documento contêm um ou mais elementos para ligação de um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo a um antígeno B7-H4 (por exemplo, o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo pode ser conjugado com um substrato detectável, tal como um composto fluorescente, um substrato enzimático, um composto radioativo ou um composto luminescente, ou um segundo anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo que reconhece que o primeiro anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo pode ser conjugado com um substrato detectável). Em modalidades específicas, um kit fornecido no presente documento pode incluir um antígeno B7-H4 recombinantemente produzido ou quimicamente sintetizado. O antígeno B7-H4 fornecido no kit também pode ser ligado a um suporte sólido. Numa modalidade mais específica, o meio de detecção do kit descrito acima inclui um suporte sólido ao qual um antígeno B7-H4 é ligado. Tal kit também pode incluir um anticorpo anti-humano identificado com repórter não ligado ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo ou anticorpo anticamundongo/rato ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo. Nesta modalidade, a ligação do anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo ao antígeno B7-H4 pode ser detectada pela ligação do referido anticorpo identificado com repórter ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo.

[0318] Os seguintes exemplos são oferecidos a título de ilustração e não a título de limitação.

### **EXEMPLOS**

[0319] Os exemplos nesta Seção (*isto é*, Seção 6) são oferecidos a título de ilustração, e não a título de limitação.

#### **EXEMPLO 1: AVALIAÇÃO DE PREVALÊNCIA DE EXPRESSÃO DE B7-H4 EM MÚLTIPLAS INDICAÇÕES**

[0320] O anticorpo monoclonal de camundongo B7-H4 A57.1 (nº de Catálogo ATCC PTA-5180) foi usado para detectar a presença de B7-H4 em amostras de arquivo, uma mistura de seções inteiras e microarranjos de tumores. As amostras

foram tratadas com anticorpo primário e detectadas com o uso de um sistema de detecção de polímero ligado a DAB (Ventana Medical Systems).

[0321] B7-H4 foi prontamente detectado na membrana e o citosol em tecidos tumorais colhido a partir de uma variedade de pacientes com câncer, incluindo carcinoma ductal invasivo, câncer de mama triplo negativo, câncer de ovário, câncer de pulmão de células não pequenas e câncer de endométrio. (Figura 1). Além disto, a frequência de expressão também foi alta nas indicações listadas na Tabela 11.

**TABELA 11: DETECÇÃO DE B7-H4 EM TUMORES**

<b>Tipo de Tumor</b>	<b>nº Total</b>	<b>nº de Positivos</b>	<b>Porcentagem de Positivos</b>
<b>Câncer de Mama Triplo Negativo</b>	74	58	78%
<b>Carcinoma Ductal Invasivo</b>	51	38	74,50%
<b>Carcinoma de Endométrio</b>	77	54	70%
<b>Câncer de ovário</b>	141	85	60%
<b>Câncer de Pulmão de Células Não Pequenas (Escamoso)</b>	47	19	40%

[0322] B7-H4 é expressado em outros cânceres, tal como câncer de rim (por exemplo, carcinoma de células renais), câncer de bexiga (por exemplo, carcinoma de células uroteliais), câncer pancreático e câncer de tireoide. Consulte por exemplo, Zhu, J., et al., Asian Pacific J. Cancer Prev. 14: 3011-3015 (2011), Krambeck A, et al., PNAS 103: 10391-10396 (2006), Fan, M. et al., Int. J. Clin. Exp. Pathol. 7: 6768-6775 (2014), Xu, H., et al., Oncology Letters 11: 1841-1846 (2016), e Liu, W., et al., Oncology Letters 8: 2527-2534 (2014).

[0323] Num experimento subsequente, a prevalência de B7-H4 em vários tipos de tumor foi avaliada por imuno-histoquímica (IHC) (Figura 1B). O seguintes tipos e estágios de tumor foram testados: endométrio, carcinoma ductal invasivo de mama (IDC), triplo negativo de mama (TN), triplo negativo de mama (estágio avançado), câncer de ovário, câncer de bexiga (estágio inicial), câncer de pulmão de células não pequenas (sq (escamoso), estágio inicial), câncer de pulmão de células não pequenas (sq, estágio avançado), câncer de cabeça e pescoço, bexiga (estágio avançado), câncer de pulmão de célula pequena, colangiocarcinoma,

câncer de pulmão de células não pequenas (ad (adenocarcinoma)), câncer de tireoide, câncer pancreático, câncer gástrico, melanoma, glioblastoma ou glioblastoma multiforme (GBM) e carcinoma de células de merkel. A expressão de proteína de superfície B7-H4 em células tumorais foi avaliada em amostras tumorais adquiridas de vários tipos de tumor e estágios de doença quando disponíveis (estágio inicial (I/II), estágio avançado (III/IV)). A intensidade de IHC com o anticorpo A57.1 foi pontuada com categoria 0 a 3, e atribuiu-se às amostras uma única pontuação IHC com a intensidade mais alta observada num mínimo de 10% de todas as células tumorais por seção inteira. Um total de 50 a 100 amostras por tipo de tumor foi avaliado.

### **EXEMPLO 2: GERAÇÃO DE ANTICORPOS INOVADORES CONTRA B7-H4 HUMANO**

[0324] Anticorpos específicos de B7-H4 foram isolados de bibliotecas de anticorpos naïve de IgG1 humana de comprimento total com o uso de um sistema de apresentação de levedura *in vitro*. As bibliotecas foram projetadas para imitar o sistema imune; elas não contêm pares de cadeia pesada e leve predefinidos. As bibliotecas foram submetidas a múltiplas rodadas de estratégias de seleção positivas e negativas com o uso de proteína B7-H4 para enriquecer IgG que foram cruzadas de modo reativo com alvo B7-H4 humano, de cinomolgo e murino. Após quatro rodadas de seleção, as IgG resultantes foram sequenciadas, e anticorpos exclusivos foram produzidos e avaliados tanto quanto à afinidade de ligação ávida como monomérica ao ectodomínio B7-H4 recombinante, para compartimentalização de epítopos e para ligação celular específica do alvo.

[0325] Uma descrição mais detalhada da seleção, maturação de afinidade e métodos analíticos que foram usados para gerar e caracterizar os anticorpos B7-H4 é fornecida abaixo.

### **MATERIAIS E MÉTODOS**

[0326] Antígenos foram biotinilados com o uso do kit EZ-Link Sulfo-NHS-Biotinylation Kit disponível junto à Pierce. Kappa-FITC anti-humano de cabra F(ab')2 (LC-FITC), ExtrAvidina-PE (EA-PE) e Esteptavidina-AF633 (SA-633) foram obtidos junto à Southern Biotech, Sigma e Molecular Probes, respectivamente. Microesferas de esteptavidina e colunas de separação Streptavidin MACS LC

foram adquiridas junto à Miltenyi Biotec. IgG-PE anti-humana de cabra (Human-PE) foi obtida junto à Southern Biotech.

### **DESCOBERTA NAIÔVE**

[0327] Oito bibliotecas de levedura sintética humanas naïve cada uma com uma diversidade de ~ 109, foram propagadas conforme anteriormente descrito (consulte Y. Xu et al, Addressing polyspecificity of antibodies selected from an in vitro yeast presentation system: a FACS-based, high-throughput selection and analytical tool. PEDS 26.10, 663-70 (2013); WO2009036379; WO2010105256; e WO2012009568.) Para as duas primeiras rodadas de seleção, uma técnica de classificação de microesfera magnética que utiliza o sistema MACS Miltenyi foi realizada, conforme anteriormente descrito (consulte Siegel et al, High efficiency recovery and epitope-specific sorting of an scFv yeast display library". J Immunol Methods 286(1-2), 141-153 (2004).) Resumidamente, as células de levedura (~1010 células/biblioteca) foram incubadas com 10 ml de antígeno de fusão Fc biotinilado 10 nM por 30 min a 30°C em tampão de lavagem (solução salina tamponada com fosfato (PBS)/0,1% de albumina sérica bovina (BSA)). Após a lavagem uma vez com 40 ml de tampão de lavagem gelado, o pélete de célula foi ressuspenso em 20 ml de tampão de lavagem, e microesferas de estreptavidina (500 µl) foram adicionadas à levedura e incubadas por 15 min a 4°C. A seguir, as leveduras foram peletizadas, ressuspensas em 20 ml de tampão de lavagem, e carregadas numa coluna LS Miltenyi. Após os 20 ml serem carregados, a coluna foi lavada 3 vezes com 3 ml de tampão de lavagem. A coluna foi, então, removida do campo magnético, e as leveduras foram eluídas com 5 ml de meio de crescimento e, então, cultivadas de um dia para o outro. As rodadas de seleção seguintes foram realizadas com o uso de citometria de fluxo. Aproximadamente 2×107 leveduras foram peletizadas, lavadas três vezes com tampão de lavagem, e incubadas a 30°C com concentrações decrescentes de antígeno de fusão Fc biotinilado (10 a 1 nM) sob condições de equilíbrio, antígenos de fusão Fc biotinilados 10 nM de diferentes espécies a fim de obter reatividade cruzada entre espécies, ou com um reagente de depleção de poliespecificidade (PSR) para remover anticorpos não específicos da seleção. Para a depleção PSR as bibliotecas foram incubadas com uma diluição 1:10 de reagente PSR biotinilado conforme anteriormente descrito (consulte Y. Xu

et al., addressing polyspecificity of antibodies selected from an in vitro yeast presentation system: a FACS-based, high-throughput selection and analytical tool. PEDS 26.10, 663-70 (2013).) As leveduras foram, então lavadas duas vezes com tampão de lavagem e manchadas com reagentes secundários LC-FITC (diluído 1:100) e SA-633 (diluído 1:500) ou EAPE (diluído 1:50) por 15 min a 4°C. Após a lavagem duas vezes com tampão de lavagem, os péletes de células foram ressuspensos em 0,3 ml de tampão de lavagem e transferidos para tubos de classificação com tampa filtrante. A classificação foi realizada com o uso de um classificador FACS ARIA (BD Biosciences) e foram determinadas portas de classificação para selecionar anticorpos com características desejadas. As rodadas de seleção foram repetidas até que a população com todas as características desejadas fosse obtida. Após o ciclo de classificação final, as leveduras foram colocadas em placas e colônias individuais foram escolhidas para caracterização.

### **OTIMIZAÇÃO DE ANTICORPO**

[0328] A otimização de anticorpos foi realizada por meio de um método de embaralhamento em lote de cadeia leve e, então, introduzindo-se diversidades nas regiões variáveis de cadeia pesada e cadeia leve, conforme descrito abaixo. Uma combinação de algumas destas abordagens foi usada para cada anticorpo.

[0329] Embaralhamento em lote de cadeia leve: Os plasmídeos de cadeia pesada de uma saída de seleção naïve foram extraídos da levedura por meio de esmagamento e captação, propagados e subsequentemente purificados de E.coli, e transformados numa biblioteca de cadeia leve com uma diversidade de  $5 \times 10^6$ . As seleções foram realizadas com uma rodada de MACS e quatro rodadas de FACS empregando as mesmas condições que a descoberta naïve.

[0330] Seleção de CDRH1 e CDRH2: A CDRH3 de um único anticorpo foi recombinada numa biblioteca pré-fabricada com variantes de CDRH1 e CDRH2 de uma diversidade de  $1 \times 10^8$  e seleções foram realizadas com uma rodada de MACS e quatro rodadas de FACS, conforme descrito na descoberta naïve. Para cada rodada FACS as bibliotecas foram pesquisadas quanto à ligação PSR, reatividade cruzada entre espécies e pressão de afinidade, e a classificação foi realizada a fim de obter uma população com as características desejadas. Para estas seleções, pressões de afinidade foram aplicadas com o uso de concentrações decrescentes

de antígeno HIS-B7-H4 biotinilado (100 a 1 nM) sob condições de equilíbrio a 30°C.

[0331] Seleção Mut VH: A região variável de cadeia pesada (VH) foi mutagenizada por meio de PCR propenso a erros. A biblioteca foi, então, criada transformando-se esta VH mutagenizada e o vetor de expressão de cadeia pesada na levedura já contendo o plasmídeo de cadeia leve do original. As seleções foram realizadas de modo similar aos ciclos anteriores com o uso de classificação FACS por duas rodadas. Para cada rodada FACS, as bibliotecas foram pesquisadas quanto à ligação PSR e pressão de afinidade, e a classificação foi realizada a fim de obter uma população com as características desejadas. As pressões de afinidade para estas seleções foram realizadas conforme descrito acima na seleção CDRH1 e CDRH2.

[0332] Seleção CDRL1 e CDRL2: A CDRL3 de um único anticorpo foi recombinada numa biblioteca pré-fabricada com variantes de CDRL1 e CDRL2 de uma diversidade de ~5 x 10<sup>5</sup> e as seleções foram realizadas de modo similar aos ciclos anteriores com o uso de classificação FACS por três rodadas. Para cada rodada FACS, as bibliotecas foram pesquisadas quanto à ligação PSR e pressão de afinidade, e a classificação foi realizada a fim de obter uma população com as características desejadas. As pressões de afinidade para estas seleções foram realizadas conforme descrito acima na seleção CDRH1 e CDRH2.

### **PRODUÇÃO E PURIFICAÇÃO DE ANTICORPOS**

[0333] Clones de levedura foram cultivados até saturação e, então, induzidos por 48 h a 30°C com agitação. Após a indução, células de levedura foram peletizadas e os sobrenadantes foram coletados para purificação. IgGs foram purificadas com o uso de uma coluna de Proteína A e eluídas com ácido acético, pH 2,0. Os fragmentos Fab foram gerados pela digestão de papaína e purificados através de KappaSelect (GE Healthcare LifeSciences).

### **Medições K<sub>D</sub> FORTEBIO**

[0334] As medições de afinidade ForteBio foram realizadas num Octet RED384 geralmente conforme anteriormente descrito (consulte Estep et al, High throughput solution-based measurement of antibody-antigen affinity and epitope binning. Mabs 5(2), 270-278 (2013)). Em suma, as medições de afinidade por ForteBio foram realizadas carregando-se IgGs online em sensores AHQ. Os

sensores foram equilibrados offline em tampão de ensaio por 30 min e, então, monitorados online por 60 segundos para estabelecimento de linha de base. Os sensores com IgGs carregadas foram expostos a antígeno 100 nM por 3 minutos, e posteriormente, foram transferidos para tampão de ensaio por 3 min para medição de taxa de dissociação. Para avaliação de afinidade monovalente Fabs foram usados em vez de IgGs. Para esta avaliação, o antígeno de fusão Fc não biotinilado foi carregado em linha nos sensores AHQ. Os sensores foram equilibrados offline em tampão de ensaio por 30 min e, então, monitorados online por 60 segundos para estabelecimento de linha de base. Os sensores com antígeno carregado foram expostos a Fab 100 nM por 3 minutos, e posteriormente eles foram transferidos para o transferido de ensaio por 3 min para medição de constante de dissociação. Todas as cinéticas foram analisadas com o uso de modelo de ligação 1:1.

#### **Compartimentalização de Epítopo/Bloqueio de Ligante ForteBio**

[0335] A compartimentação de epítopo/bloqueio de ligante foi realizada com o uso de um ensaio de bloqueio cruzado em formato de sanduíche padrão. A IgG antialvo de controle foi carregada em sensores AHQ e sítios de ligação Fc não ocupados no sensor foram bloqueados com um anticorpo IgG1 humana irrelevante. Os sensores foram, então expostos ao antígeno alvo 100 nM seguido de um segundo anticorpo ou ligante antialvo. A ligação adicional pelo segundo anticorpo ou ligante após a associação de antígeno indica um epítopo não ocupado (não competidor), enquanto nenhuma ligação indica bloqueio do epítopo (bloqueio do competidor ou ligante).

[0336] Quatro anticorpos não competidores (“anticorpos compartimentalização” 1, 2, 3 e 4) foram usados para identificar quatro porções distintas do ecotodomínio B7-H4 por SPR. Todos os anticorpos gerados durante essa etapa foram então avaliados quanto à ligação competitiva com estes quatro anticorpos de compartimentalização ao ecotodomínio B7-H4. Se um anticorpo B7-H4 competir com dois dos quatro anticorpos de compartimentalização (por exemplo, anticorpo de compartimentalização 1), determina-se que o anticorpo B7-H4 se situe neste BIN (por exemplo, BIN 1). Se um anticorpo B7-H4 competir com dois dos quatro anticorpos de compartimentalização (por exemplo, anticorpos de compartimentalização 2 e 3), determina-se que o anticorpo B7-H4 se situe em

ambos destes BINS (por exemplo, BIN2/3).

[0337] Os anticorpos IgG caíram em pelo menos quatro compartimentos de ligação, com >90% dos anticorpos se ligando a B7-H4 humano/de cino ou de camundongo com uma resposta de afinidade na faixa entre >0,1 nm e <100 nM. Dos ligantes de proteína recombinantes, aproximadamente 75% também se ligam a B7-H4 nas células.

### **ANÁLISE DE LIGAÇÃO CELULAR**

[0338] 100000 células que superexpressam o antígeno foram lavadas com tampão de lavagem e incubadas com 100 ul de IgG 100 nM por 5 minutos à temperatura ambiente. As células foram, então lavadas duas vezes com tampão de lavagem e incubadas com 100 ul de IgGPE anti-humano 1:100 por 15 minutos em gelo. As células foram então lavadas duas vezes com tampão de lavagem e analisadas num analisador FACS Canto II (BD Biosciences.)

### **ENSAIO DE LIGAÇÃO PSR**

[0339] O ensaio PSR foi realizado conforme anteriormente descrito (consulte Xu Y, et al. (2013) Addressing polyspecificity of antibodies selected from an in vitro yeast presentation system: A FACS-based, high-throughput selection and analytical tool. *Protein Eng Des Sel* **26(10)**:663–670). Em suma, as proteínas de membrana solúveis foram preparadas a partir de células CHO. A fração de membrana enriquecida foi biotinilada com o uso de NHS-LCBiotin (Pierce, Thermo Fisher). Este reagente de polidispersidade foi incubado com levedura apresentadora de IgG, seguido de lavagem. Então, a mistura de identificação secundária (Extravidin-R-PE, LC-FITC anti-humano, e iodeto de propídio) foi adicionada à mistura. As amostras foram analisadas num analisador FACSCanto II (BD Biosciences) com o uso de um injetor de amostra HTS. Os dados de citometria de fluxo foram analisados quanto à intensidade de fluorescência média (MFI) no canal R-PE para avaliar a ligação não específica. Os valores MFI foram normalizados de 0 a 1 com base em três anticorpos de referência que exibem valores MFI PSR baixos, médios e altos.

### **FLUORIMETRIA POR VARREDURA DINÂMICA**

[0340] 10 uL de 20x Sypro Orange foram adicionados a 20 uL de 0,2 a 1mg/ml de solução mAb ou Fab. Um instrumento RT-PCR (BioRad CFX96 RT PCR)

é usado para elevar a temperatura de placa de amostra de 40 para 95 °C em incrementos de 0,5 °C, com 2 min de equilíbrio em cada temperatura. O negativo da primeira derivada para os dados brutos é usado para extrair Tm.

### **AC-SINS**

[0341] O ensaio AC-SINS foi realizado conforme descrito anteriormente (consulte Liu Y, et al. (2014) High-throughput screening for developability during early-stage antibody discovery using self-interaction nanoparticle spectroscopy. *MAbs* **6(2)**:483–492). Em suma, nanopartículas de ouro (Ted Pella Inc.) foram revestidas com 80% de captura de Fc IgG de cabra anti-humano (Jackson ImmunoResearch) e 20% com anticorpo não específico de cabra policlonal (Jackson ImmunoResearch). Os anticorpos de interesse foram, então incubados com as partículas por 2 h e o deslocamento do comprimento de onda foi medido com o uso de Molecular Devices SpectraMax M2 com software SoftMax Pro6. Os clones de autointeração mostram um deslocamento de comprimento de onda maior na direção oposta à amostra PBS.

### **EXEMPLO 3: CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DE ANTICORPOS MONOCLONais HUMANOS CONTRA B7-H4**

[0342] Os anticorpos B7-H4 são isotipo IgG1/kappa humano. As regiões de cadeia pesada variável (VH) são compreendidas de alelos dos genes de linhagem germinativa VH1, VH3, e VH4, e de cadeia leve variável (VL) dos alelos dos genes de linhagem germinativa que incluem Vk1 e Vk3. Alguns subconjuntos dos anticorpos compartilham alta identidade dentro das respectivas regiões CDR da VH e VL que podem se situar na faixa de 72 a 100%. Anticorpos que compartilham o mesmo alelo de linhagem germinativa têm alta identidade em suas regiões de framework (FR) VH e VL que se situam na faixa de 88 a 100%. As sequências dos anticorpos B7-H4 são fornecidas nas Tabelas 1 a 10.

### **EXEMPLO 4: CARACTERIZAÇÃO DE LIGAÇÃO DE ANTICORPO MONOCLONAL À PROTEÍNA B7-H4**

[0343] As afinidades de ligação de anticorpos anti-B7-H4 ao domínio extracelular B7-H4 (ECD) foram determinadas por interferometria de biocamada (BLI). Os ensaios de afinidade ForteBio são descritos em mais detalhes acima no Exemplo 2. Resumidamente, a proteína B7-H4-hulgG1 humana recombinante

(SEQ ID NO:409) foi imobilizada nas pontas da proteína A, seguida por uma hlgG1 de controle de isotipo a fim de saturar quaisquer sítios de ligação restantes na ponta de captura. Antanticorpos B7-H4 foram avaliados quanto à ligação. Além disto, a ligação de anticorpo a B7-H4 de macaco cinomolgo (SEQ ID NO: 2) e de camundongo (SEQ ID NO: 3) também foi avaliada com o uso do mesmo protocolo. Os resultados são resumidos na Tabela 12.

[0344] B7-H4-hulgG1:

MASLGQILFWIISIIILAGAIALIIGFGISGRHSITVTTVASAGNIGEDGILSCTFEPDI  
 KLSDIVIQWLKEGVGLVHEFKEGKDELSEQDEMFRGRTAVFADQVIVGNASLRL  
 KNVQLTDAGTYKCYIITSKGKGNANLEYKTGAFSMPEVNVDYNASSETLRCEAPR  
 WFPQPTVVWASQVDQGANFSEVSNTSFELNSENVTMKVSVLYNVTINNTYSC  
 MIENDIAKATGDIKVTESEIKRRSHLQLLNSKASGSEPKSSDKTHTCPCPAPELL  
 GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPETVCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT  
 KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQP  
 REPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPV  
 LDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

(SEQ ID NO:409)

**TABELA 12: LIGAÇÃO DE ANTICORPO B7-H4 AO DOMÍNIO EXTRACELULAR POR INTERFEROMETRIA DE BIOCAMADA**

Anticorpo	BIN	B7-H4 humano			B7-H4 de cinomolgo			B7-H4 de camundongo		
		K <sub>D</sub> (M)	k <sub>on</sub> (1/Ms)	k <sub>off</sub> (1/s)	K <sub>D</sub> (M)	k <sub>on</sub> (1/Ms)	k <sub>off</sub> (1/s)	K <sub>D</sub> (M)	k <sub>on</sub> (1/Ms)	k <sub>off</sub> (1/s)
15441	2	7,15 E-09	1,22E+06	8,72 E-03	5,46 E-08	1,33E+06	7,27 E-02	NB	-	-
15461	2/3	6,29 E-08	3,81E+05	2,40 E-02	6,21 E-08	4,34E+05	2,70 E-02	5,57 E-08	3,05E+05	1,70 E-02
15462	2/3	PF	-	-	6,65 E-08	6,72E+05	4,47 E-02	8,31 E-08	4,59E+05	3,81 E-02
15465	2/3	5,13 E-08	4,84E+05	2,48 E-02	5,11E-08	5,44E+05	2,78 E-02	8,96 E-08	2,96E+05	2,65 E-02
15472	4	7,11E-09	7,00E+05	4,97 E-03	7,80 E-09	7,46E+05	5,82 E-03	3,80 E-08	4,22E+05	1,60 E-02
15478	4	3,25 E-08	4,77E+05	1,55 E-02	3,11E-08	5,44E+05	1,69 E-02	NB	-	-

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

[0345] Além disto, as afinidades de ligação dos anticorpos anti-B7-H4 selecionados ao domínio N-terminal de B7-H4 humano (B7-H4 IgV-hulgG1; SEQ ID NO:410) foram determinadas por ressonância de plásmon de superfície (SPR). Resumidamente, anticorpo Fab anti-humano foi imobilizado numa superfície de chip SPR derivatizada de carboxila, e os anticorpos anti-B7-H4 foram capturados na superfície resultante em 5 ug/ml por 30 segundos. B7-H4 IgV-hulgG1 em várias concentrações (0 nM, 3,7 nM, 11,1 nM, 33,3 nM, 100 nM, e 300 nM) foi, então,

escoado sobre a superfície e deixado se ligar aos anticorpos anti-B7-H4 durante a fase de associação, seguido de uma lavagem com tampão durante a fase de dissociação. Os dados foram ajustados com o uso de um modelo de ligação 1:1, e os resultados são resumidos na Tabela 13.

[0346] B7-H4 IgV-hulgG1:

[0347] MASLGQILFWIISIIILAGAIALIIGFGISGRHSITVTTVASAGNIGEDG  
ILSCTFEPDIKLSDIVIQWLKEGVGLVHEFKEGKDELSEQDEMFRGRTAVFADQV  
IVGNASLRLKNVQLTDAGTYKCYIITSKGKGNANLEYKTGAFSGSEPKSSDKTHT  
CPPCPAPELLGGPSVFLPPKPKDLMISRPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV  
DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE  
KTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP  
ENNYKTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKS  
LSLSPGK (SEQ ID NO:410)

**TABELA 13: LIGAÇÃO DE ANTICORPO B7-H4 AO DOMÍNIO N-TERMINAL POR RESSONÂNCIA DE PLÁSMON DE SUPERFÍCIE**

Anticorpo	BIN	B7-H4 humano		
		K <sub>D</sub> (M)	k <sub>on</sub> (1/Ms)	k <sub>off</sub> (1/s)
15461	2/3	3,04E-08	1,71E+05	5,19E-03
15462	2/3	1,69E-08	2,95E+05	4,98E-03
15465	2/3	1,73E-08	2,41E+05	4,17E-03
15483	2/3	1,84E-08	2,41E+05	4,43E-03
15489	2/3	2,37E-08	1,64E+05	3,89E-03
20502	3	2,03E-09	1,78E+05	3,61E-04

[0348] Deste modo, múltiplos ensaios demonstram que os anticorpos se ligam a B7-H4.

#### **EXEMPLO 5: MAPEAMENTO DE EPÍTOPO**

[0349] Os compartimentos de ligação de anticorpo anti-B7-H4 foram determinados por interferometria de biocamada (BLI). Os ensaios de mapeamento de epítopo são descritos em mais detalhes acima no Exemplo 2. Resumidamente, um primeiro anticorpo anti-B7-H4 foi capturado nas pontas de Proteína A, seguido de um anticorpo hulgG1 de controle para saturar sítios de ligação adicionais nas pontas. A seguir, as pontas de sensor foram expostas ao antígeno (B7-H4-hulgG1)

(SEQ ID NO:409) seguido do segundo anticorpo anti-B7-H4, que foi, então, avaliado quanto à ligação. Os compartimentos de epítopo foram determinados em comparação com a ligação após um anticorpo não B7-H4 ser usado como o primeiro anticorpo. O resultados estão resumidos na Tabela 12.

#### **EXEMPLO 6: CARACTERIZAÇÃO DE LIGAÇÃO DE ANTICORPO MONOCLONAL AO B7-H4 EXPRESSADO NA SUPERFÍCIE DAS CÉLULAS**

[0350] As linhagens celulares HEK293T foram transfectadas para expressar B7-H4 humano, de macaco cinomolgo, de camundongo ou de rato de comprimento total. Além disto, a linhagem celular de câncer de mama SK-BR-3 que expressa B7-H4 humano endógeno foi usada para avaliar a capacidade de os anticorpos se ligarem a B7-H4 expressado na superfície celular.  $1 \times 10^5$  linhagens celulares de HEK293T parentais ou HEK293T transfectadas foram incubadas com 100 nM dos anticorpos B7-H4. Após a incubação, as células foram peletizadas, lavadas e incubadas com um anticorpo de identificação secundário, e as amostras foram adquiridas numa citometria de fluxo. A ligação de dobra em relação à linhagem celular parental (FOP) foi calculada da seguinte forma: células HEK293T transfectadas por MFI/células HEK293T parentais MFI. Um valor FOP maior que 10 foi considerado para demonstrar a ligação específica.

[0351] Para avaliar a potência de ligação celular dos anticorpos B7-H4,  $1 \times 10^5$  células SK-BR-3 ou 293 células transfectadas para expressar B7-H4 de macaco cinomolgo, camundongo ou rato foram incubadas com doses de titulação dos anticorpos B7-H4. Após a incubação, as células foram peletizadas, lavadas e incubadas com um anticorpo de identificação secundário, e as amostras foram adquiridas numa citometria de fluxo. Os dados foram analisados com o uso do software FlowJo e a MFI foi plotada vs. concentração de anticorpos. A potência de ligação celular EC<sub>50</sub> foi calculada com o uso de ajuste de curva de regressão não linear (GraphPad Prism).

[0352] Todos os anticorpos B7-H4 demonstraram ligação a células HEK293T que expressaram B7-H4 humano, B7-H4 de macaco cinomolgo ou B7-H4 de camundongo. Os anticorpos também demonstraram ligação dependente de dose potente a células SK-BR-3 que expressam endogenamente B7-H4 humano na superfície celular ou linhagens celulares HEK293T transfectadas para expressar

B7-H4 de macaco cinomolgo, de camundongo ou de rato na superfície celular. Estes dados demonstram que a maior parte dos anticorpos B7-H4 é totalmente reativa de modo cruzado a B7-H4 de macaco cinomolgo, de camundongo e de rato (Figuras 2A e 2B, Tabela 14).

**TABELA 14: LIGAÇÃO DE ANTICORPO B7-H4 A B7-H4 DE SUPERFÍCIE CELULAR**

Anticorp o	BIN	293-huB7-H4 (FOP)	293-cynoB7-H4 (FOP)	293-moB7-H4 (FOP)	SK-BR-3 (EC50; nM)	293-cynoB7-H4 (EC50; nM)	293-mouse B7-H4 (EC50; nM)	293-ratB7-H4 (EC50; nM)
15441	2	67	9	3	34,29	ND	ND	ND
15461	2/3	333	610	887	5,66	6,77	6,37	1,67
15462	2/3	530	416	456	4,55	5,29	5,40	1,13
15465	2/3	626	1324	690	2,13	4,90	5,34	1,47
15472	4	580	1279	685	8,86	-	-	-
15478	4	518	1130	125	PF	-	-	-
15483	2/3	805	1012	1402	14,81	17,4	8,82	1,87
15489	2/3	612	1118	674	31,73	13,7	17,5	4,55
15495	2	619	524	6	61,2	-	-	-
15503	2	289	877	5	PF	-	-	-
20496	outros	179	758	604	7,60	7,91	6,70	ND
20500	3	182	630	478	1,54	3,38	4,00	1,14
20501	3	205	728	546	1,90	3,89	4,67	1,15
20502,1	3	200	683	559	2,50	4,94	5,57	1,26

**EXEMPLO 7: CARACTERIZAÇÃO DE ATIVIDADE DE BLOQUEIO DE PONTO DE VERIFICAÇÃO DE CÉLULA T DE ANTICORPO MONOCLONAL**

[0353] A fim de caracterizar a atividade de bloqueio de ponto de verificação de célula T dos anticorpos B7-H4, células T humanas primárias foram enriquecidas de células mononucleares de sangue periférico (PBMCs) com o uso do kit EasySep™ Human T Cell Enrichment Kit com base nas instruções do fabricante. As células T enriquecidas foram incubadas a  $2 \times 10^5$  célula/ml com Dynabeads anti-CD3/anti-CD28, a uma razão de microesfera por célula, a 37°C. Seis dias depois,

as microesferas foram magneticamente removidas, e as células T foram lavadas e incubadas a  $1 \times 10^6$  célula/ml com 10 U/ml de IL-2 a 37°C. Quatro dias depois, as células T foram lavadas e incubadas a  $1 \times 10^6$  células/ml juntamente com células apresentadoras de antígeno artificiais (aAPCs) a  $2 \times 10^6$  células/ml a 37°C na presença de 10 ug/ml de anticorpo ou uma titulação de dose de anticorpo. aAPCs são uma linhagem celular HEK293T que foi transfetada para coexpressar um formato scFv de clone CD3 anti-humano OKT3 e B7-H4 humano de comprimento total na superfície celular. aAPCs foram tratadas com Mitomicina C por uma hora a 37°C e, então, cuidadosamente lavadas antes da adição da cocultura de células T. 72 horas após a cocultura de células T, aAPCs e anticorpos B7-H4, placas foram centrifugadas, sobrenadantes colhidos e avaliados quanto à produção de IFNy por ELISA, e as células foram colhidas e manchadas para avaliar a proliferação por FACS (especificamente, as células em cada poço foram incubadas com anticorpos contra CD4 e CD8). As células foram, então lavadas, fixadas, permeabilizadas e incubadas com o reagente Edu-Click de acordo com as instruções do fabricante. As células foram lavadas, e o número de células T CD4+, CD8+ ou totais foi medido com o uso de citometria de fluxo. Os dados foram analisados com o uso do software FlowJo. Para amostras tratadas apenas com uma única concentração de anticorpo, os dados foram calculados e relatados como um aumento de dobra em relação às amostras tratadas hulgG de controle. Para amostras tratadas com uma titulação de dose de anticorpo, a produção de IFNy foi plotada vs. concentração de anticorpo e a potência EC50 foi calculada com o uso de ajuste de curva de regressão não linear (GraphPad Prism).

[0354] Todos os anticorpos BIN2/3 e BIN3 resultaram de modo reproduzível na atividade de bloqueio de ponto de verificação de célula T conforme medida por um aumento na produção de IFNy e/ou proliferação de células T CD4+, CD8+ ou totais. A Figura 3A mostra que o anticorpo 15441 aumenta a proliferação de células T em pelo menos 3% e aumenta a proliferação de células T CD4+ e CD8+ em pelo menos 2%. A Figura 3A também mostra que o anticorpo 15461 aumenta a proliferação de células T em pelo menos 21%, aumenta a proliferação de células T CD4+ em pelo menos 9% e aumenta a proliferação de células T CD8+ em pelo menos 11%. As Figuras 3B a 3D mostram outras atividades de bloqueio de ponto

de verificação de células T dependentes de dose.

**TABELA 15: ANTICORPO B7-H4 – ATIVIDADE DE BLOQUEIO DE PONTO DE VERIFICAÇÃO DE CÉLULAS T**

Anticorpo	BIN	Ensaio aAPC (EC50 +/- STD; nM)	Doador 1 (Max IFN $\gamma$ , pg/ml)	Doador 2 (Max IFN $\gamma$ , pg/ml)	Doador 3 (Max IFN $\gamma$ , pg/ml)	Doador 4 (Max IFN $\gamma$ , pg/ml)
15461	2/3	531,18 +/- 403,66	311,64	164,66	1957,34	986,73
15462	2/3	1312,01 +/- 1112,5	205,72	176,33	1661,59	484,8
15465	2/3	4310,72 +/- 7642,6	230,45	133,64	1523,82	865,22
15483	2/3	728,84 +/- 711,1	93,2	87,84	1382,03	939,04
15489	2/3	291,31 +/- 327,82	82,47	96,63	1133,02	799,9

**TABELA 16: LIGAÇÃO DE ANTICORPO B7-H4 A B7-H4 DE SUPERFÍCIE CELULAR**

Anticorpo	BIN	Ensaio aAPC (EC50 +/- STD; nM)	Doador 1 (Max IFN $\gamma$ , pg/ml)	Doador 2 (Max IFN $\gamma$ , pg/ml)	Doador 3 (Max IFN $\gamma$ , pg/ml)	Doador 4 (Max IFN $\gamma$ , pg/ml)	
20496	outros	PF	185,88	ND	ND	ND	
20500	3	0,84 +/- 0,35	821	273,83	117,9	4027,1	
20501	3	0,79 +/- 0,18	849,6	310	135,6	4493,1	
20502,1	3	0,79 +/- 0,03	937	303,9	174,02	4269,7	
20506	3	1,25 +/- 0,26	980,8	258,8	86,1	2301,8	
20513	3	1,16 +/- 0,16	658,8	240,3	91,1	1634,5	
20516	3	PF	ND	441,1	ND	ND	
22213	3	1,79 +/-	ND	ND	ND	ND	

		1,83					
--	--	------	--	--	--	--	--

**EXEMPLO 8: GERAÇÃO DE ANTICORPOS MONOCLONais AFUCOSILADOS E FUCOSILADOS**

[0355] Os anticorpos com regiões Fc que têm teor de fucose reduzido em porções químicas de glicano podem exibir atividade de ADCC mais alta em comparação com um anticorpo totalmente fucosilado (Niwa R et al., *Clinical Cancer Research* 11(6):2327-36 (2005)). Os anticorpos B7-H4 foram gerados em células CHO-x (Yamane-Ohnuki N, et al. *Biotechnology and Bioengineering* 87(5): 614-22 (2004)) para produzir anticorpos geralmente fucosilados e numa linhagem celular CHO geneticamente modificada para produzir anticorpos afucosilados (células CHO-y) (*id.*).

**EXEMPLO 9: CARACTERIZAÇÃO DE LIGAÇÃO DE ANTICORPOS MONOCLONais AFUCOSILADOS E FUCOSILADOS**

[0356] Os anticorpos anti-B7-H4 fucosilados e afucosilados foram caracterizados por SPR seguindo o protocolo conforme descrito no Exemplo 4. Os anticorpos mostraram ligação similar à proteína B7-H4 humana e, deste modo, não há impacto da glicosilação na ligação (Tabela 17).

**TABELA 17: LIGAÇÃO DE ANTICORPOS AFUCOSILADOS E FUCOSILADOS**

		B7-H4 humano								
Anticorpo	BIN		K <sub>D</sub> (M)	k <sub>on</sub> (1/Ms)	k <sub>off</sub> (1/s)	SK-BR-3 (EC <sub>50</sub> ; nM)	293-cynoB7-H4 (EC <sub>50</sub> ; nM)	293-mouse B7-H4 (EC <sub>50</sub> ; nM)	293-ratB7-H4 (EC <sub>50</sub> ; nM)	
20502	3	Fucosilado	2,58E-09	4,28E+05	1,10E-03	0,571	3,291	4,371	2,486	
20502	3	Afucosilado	2,74E-09	4,19E+05	1,15E-03	0,483	2,923	1,655	2,446	
20506	3	Fucosilado	1,93E-09	3,65E+05	7,03E-04	0,739	1,770	1,77	3,249	
20506	3	Afucosilado	2,01E-09	3,60E+05	7,25E-04	0,767	1,769	1,769	PF	

22213	3	Fucosilado	5,81E-09	1,53E+05	8,88E-04	0,651	5,199	2,445	4,401
22213	3	Afucosilado	5,11E-09	1,69E+05	8,62E-04	0,667	3,878	2,453	3,545

[0357] Os anticorpos anti-B7-H4 fucosilados e afucosilados também foram caracterizados por citometria de fluxo. Nestes experimentos, as linhagens celulares HEK293T foram transfectadas para expressar B7-H4 de macaco cinomolgo, de camundongo ou de rato de comprimento total. Além disto, as linhagens celulares de câncer de mama SK-BR-3 que expressam B7-H4 humano foram usadas para avaliar a potência de ligação celular dos anticorpos B7-H4. 1X105 células SK-BR-3 ou 293 células transfectadas para expressar B7-H4 humano, de macaco cinomolgo, de camundongo ou de rato de comprimento total foram incubadas com doses de titulação dos anticorpos B7-H4. Após a incubação, as células foram peletizadas, lavadas, incubadas com um anticorpo de identificação secundário, e executadas num citômetro de fluxo. Os dados foram analisados com o uso do software FlowJo. A MFI foi plotada vs. concentração de anticorpos, e a potência de ligação celular EC50 foi calculada com o uso de ajuste de curva de regressão não linear (GraphPad Prism).

[0358] Os anticorpos B7-H4 demonstraram ligação dependente de dose potente a células SK-BR-3 que expressam endogenamente B7-H4 na superfície celular ou 293 linhagens celulares transfectadas para expressar B7-H4 de macaco cinomolgo, de camundongo ou de rato na superfície celular. A potência de ligação e a reatividade cruzada entre espécies não sofreram impacto pelo fato de um anticorpo ser fucosilado ou afucosilado (Figuras 4A a 4D e Tabela 17).

#### **EXEMPLO 10: LIGAÇÃO DE ANTICORPOS MONOCLONais AFUCOSILADOS E FUCOSILADOS AO ALELO V158 do RECEPTOR FCγ IIIa (FcγRIIIa)**

[0359] O anticorpo 20502 foi produzido tanto como fucosilado (Ab-F) como afucosilado (Ab-A) e testado quanto à afinidade de ligação da região Fc a FcgRIIIa (V158) por ressonância de plásmon de superfície (SPR). Resumidamente, a Proteína A foi covalentemente ligada a um chip de dextrano com o uso do kit de acoplamento de amina com etilenodiamina 100 mM em solução 100 mM de tampão

de Borato de Sódio, pH 8,0 como o reagente de bloqueio. Ab-A ou Ab-F foi capturado em 2 densidades em células de fluxo separadas, e um fluxo derivatizado de Proteína A serviu como um controle de referência. Fc gama RIIIA (V158) foi diluído em tampão contínuo de HBS-P+ e injetado em 6 concentrações (0 nM, 1,37 nM, 12,3 nM, 37 nM, 111 nM, 333 nM e 1000 nM) em duplicata. A constante de associação, constante de dissociação, e afinidade para ligação Ab-A foram calculadas com o uso do modelo de ligação 1:1 Biacore T200 Evaluation Software. A constante de afinidade para ligação Ab-A e Ab-F foi determinada com o uso do modelo de afinidade de estado de equilíbrio Biacore T200 Evaluation Software. O anticorpo B7-H4 afucosilado (Ab-A) tem uma afinidade 140 vezes maior para o receptor gama Fc IIIA (V158) que o mesmo anticorpo com um Fc fucosilado (Ab-F) (Figuras 5A e 5B, Tabela 18).

**Tabela 18: Ligação de alelo V158 do receptor Fc $\gamma$  IIIa (Fc $\gamma$ RIIIa)**

	ka (1/Ms)	kd (1/s)	K <sub>D</sub> (nM)
Ab-A	6,46E+05	9,54E-10	15
Ab-F	N/A	N/A	210

#### **EXEMPLO 11: ATIVIDADE DE BLOQUEIO DE PONTO DE VERIFICAÇÃO DE CÉLULAS T DE ANTICORPOS MONOCLONAIOS AFUCOSILADOS E FUCOSILADOS**

[0360] As células T humanas primárias foram enriquecidas com PBMCs com o uso do EasySep™ Human T Cell Enrichment Kit com base nas instruções do fabricante. As células T enriquecidas foram incubadas a  $2 \times 10^5$  célula/ml com Dynabeads anti-CD3/anti-CD28, a uma razão de microesfera por célula, a 37°C. Seis dias depois, as microesferas foram magneticamente removidas, e as células T foram lavadas e incubadas a  $1 \times 10^6$  célula/ml com 10 U/ml de IL-2 a 37°C. Quatro dias depois, as células T foram lavadas e incubadas a  $1 \times 10^6$  células/ml juntamente com células apresentadoras de antígeno artificiais (aAPCs) a uma concentração de  $2 \times 10^6$  células/ml a 37°C na presença de titulação de dose de anticorpo B7-H4. aAPCs foram tratadas com Mitomicina C por uma hora a 37°C e, então, cuidadosamente lavadas antes da adição da cocultura de células T. 72 horas após a cocultura de células T, aAPCs e anticorpos B7-H4, placas foram centrifugadas,

sobrenadantes colhidos e avaliados quanto à produção de IFNy por ELISA. A produção de IFNy foi plotada vs. A concentração de anticorpos e a potência EC50 foi calculada com o uso de ajuste de curva de regressão não linear (GraphPad Prism).

[0361] Os anticorpos B7-H4 demonstraram atividade de bloqueio de ponto de verificação de célula T potente conforme medida por um aumento na produção de IFNy. Além disto, não houve diferença demonstrável na potência entre anticorpos afucosilados e fucosilados (Figura 6A e Tabela 19.)

**TABELA 19: POTÊNCIA DE BLOQUEIO DE PONTO DE VERIFICAÇÃO DE CÉLULA T**

		Ensaio aAPC (EC50 +/- STD; nM)	
Anticorpo	BIN	Afucosilado	Fucosilado
20502	3	0,89+/-0,44	0,74+/-0,39
20506	3	1,05+/-0,28	0,95+/-0,46
22213	3	0,16+/-0,05	0,17+/-0,08

[0362] A seguir, as células T humanas primárias foram enriquecidas com PBMCs doadores de HLA-A2+ com o uso do Human Pan T Cell Isolation Kit seguindo as instruções do fabricante. As células T que expressam MART-I TCR foram geradas ativando-se primeiro 5x106 células T Pan enriquecidas com 1,5x10<sup>7</sup> de Dynabeads anti-CD3/anti-CD28, 100 ng/ml de IL-2 e 15 ng/ml de IL-7 por 48 horas. 5x106 células T ativadas foram, então transduzidas com partículas lentivirais MART-I TCR na presença de 200ng/ml de IL-2, 30ng/ml de IL-7 e 10ug/ml de polibreno. 24 horas após a transdução, as células T Pan MART-I TCR+ foram expandidas ao longo de um período de 15 dias na presença de 33,3 ng/ml de IL-2 e 5ng/ml de IL-7. Para gerar linhagens celulares alvo que expressam HLA-A2, as linhagens celulares de câncer de mama humano que expressa B7-H4 endógeno MDA-MB-468 e SK-BR-3 foram transduzidas com partículas lentivirais HLA-A2 por 48 horas. Além disto, B7-H4 foi *knocked-out* da linhagem celular SK-BR-3 HLA-A2+. As células T Pan MART-I TCR+ foram cocultivadas na presença das várias linhagens celulares alvo a uma razão 1:1 E:T, 500µg/ml de peptídeo MART-I e 67nM do anticorpo B7-H4 20502 (afucosilado) ou um controle de isotipo humano.

24 horas após a coincubação, placas foram centrifugadas e os sobrenadantes foram colhidos e avaliados quanto à produção de IL-2 por AlphaLisa, de acordo com as instruções do fabricante.

[0363] Conforme mostrado na Figura 6B, B7-H4 demonstrou atividade de ligante de ponto de verificação de célula T neste ensaio quando expresso endogenamente em níveis fisiológicos à medida que a produção de IL-2 foi reduzida em poços contendo células B7-H4+ SK-BR-3 em relação às células KO SK-BR-3. Além disto, o anticorpo B7-H4 também demonstrou atividade de bloqueio de ponto de verificação de célula T conforme medida por um aumento na produção de IL-2 em relação às células tratadas com controle de isotipo (Figura 6B). Deste modo, os dados confirmam a atividade de bloqueio de ponto de verificação de célula T de anticorpo B7-H4 20502 (afucosilado) e mostram que o anticorpo B7-H4 20502 fornece atividade de bloqueio de ponto de verificação de célula T em células que expressam endogenamente B7-H4.

#### **EXEMPLO 12: ATIVIDADE DE ADCC DE ANTICORPOS MONOCLONIAIS AFUCOSILADOS E FUCOSILADOS**

[0364] Os anticorpos B7-H4 foram avaliados quanto à atividade de ADCC contra uma linhagem celular alvo que expressa B7-H4. Especificamente, as células PBMCs humanas primárias foram ativadas por citocina a  $1 \times 10^6$  células/ml com 200 IU/ml de IL-2 a 37°C. No dia seguinte, as células foram lavadas e incubadas a uma razão 40:1 efetor:alvo com células alvo SK-BR-3 que foram identificadas com Calceína-AM. 4 horas após a incubação, a lise de célula alvo foi quantificada com o uso de um fluorímetro. Uma amostra tratada com Triton/X serviu como a amostra de controle de lise máxima, enquanto uma amostra tratada apenas com meio serviu como amostra de controle de lise de fundo. A porcentagem (%) de lise específica foi calculada da seguinte forma:  $[1 - (\text{amostra} - \text{controle de meio}) / (\text{lide máx} - \text{controle de meio})] \times 100$ . A porcentagem (%) de lise específica foi plotada vs. concentração de anticorpo e a potência EC50 foi calculada com o uso do ajuste de curva de regressão não linear (GraphPad Prism).

[0365] Os anticorpos B7-H4 demonstraram atividade de ADCC dependente de dose potente contra a linhagem celular de câncer de mama SK-BR-3 que expressa B7-H4 endógeno. Além disto, os anticorpos afucosilados demonstraram

atividade de ADCC significativamente mais potente em comparação com os anticorpos fucosilados (Figura 7 e Tabela 20).

**TABELA 20: ATIVIDADE DE ADCC**

		Ensaio de ADCC (EC50 +/- STD; nM)	
Anticorpo	BIN	Afucosilado	Fucosilado
20502	3	0,0007 +/-1,1x10E-3	0,0370 +/-6,2E-2
20506	3	0,0015 +/-2,5x10E-3	0,0135 +/-2,1E-2
22213	3	0,0015	0,014

**EXEMPLO 13: CORRELAÇÃO DE ATIVIDADE DE ADCC COM DENSIDADE DE RECEPTOR**

[0366] A densidade de B7-H4 foi quantificada na superfície de células SK-BR-3, HCC1569, ZR-75-1, MDA-MB-48 e HCC1964 por FACS de acordo com as especificações do fabricante. Especificamente,  $1 \times 10^5$  células foram incubadas com 15 ug/ml de anticorpo B7-H4 em gelo por 25 minutos. Em paralelo, uma gota de microesferas Quantum™ Simply Cellular (QSC) (pré-revestidas com concentrações crescentes de anticorpo de captura de IgG anticomundongo) também foi incubada com 15 ug/ml de anticorpo B7-H4 em gelo pro 25 minutos. Após a incubação, as células e microesferas QSC foram peletizadas e lavadas, e as amostras foram adquiridas num citotômetro de fluxo. Os dados foram analisados com o uso do software FlowJo. A intensidade de fluorescência média (MFI) foi calculada e inserida na planilha QuickCal®. Uma regressão que associa cada valor de canal de fluorescência da microesfera ao seu valor de Capacidade de Ligação de Anticorpos (ABC) pré-atribuído será calculada automaticamente. Um valor ABC foi atribuído uma vez que os valores MFI para as células identificadas também são adicionados no modelo).

[0367] Os anticorpos B7-H4 foram avaliados quanto à atividade de ADCC contra linhagens celulares alvo que expressam B7-H4 com diferente níveis de densidade de superfície celular de B7-H4. Especificamente,  $1 \times 10^4$  de células alvo SK-BR-3, HCC1569, ZR-75-1, MDA-MB-468 ou HCC1964 foram co-incubadas com titulações de dose de anticorpo B7-H4 a 4 °C. 25 minutos depois, um frasco de uso

único de células repórter Jurkat-huCD16 disponível junto à Promega foi descongelado, e  $7,5 \times 10^4$  células foram adicionadas à mistura de células alvo/anticorpo B7-H4 e incubadas a 37 °C. 24 horas depois, as amostras foram colocadas à temperatura ambiente (RT) e incubadas com tampão Bio-Glo. O substrato e a luminescência foram quantificados num leitor de rótulos múltiplos EnVision. Os dados foram plotados como luminescência vs. concentração de anticorpo e a potência EC50 foi calculada com o uso de ajuste de curva de regressão não linear (GraphPad Prism).

[0368] A atividade de ADCC de anticorpo B7-H4 era dependente da densidade de superfície de B7-H4: à medida que os números de moléculas de superfície celular diminuiu, a quantidade de atividade de ADCC máxima também diminuiu. Além disto, os anticorpos afucosilados aprimoraram a atividade de ADCC em comparação aos anticorpos fucosilados, especialmente contra células alvo com níveis inferiores de densidade de superfície celular de B7-H4 (Figura 8).

#### **EXEMPLO 14: EFICÁCIA ANTITUMORAL *IN VIVO***

[0369] Camundongos BALB/c fêmeas com sete semanas de idade foram adquiridos junto à Charles River Laboratories (Hollister, CA) e foram aclimatados por até três semanas antes do início dos estudos. A linhagem celular de carcinoma colorretal murino CT26 foi geneticamente modificada para expressar uma proteína quimérica que consiste no domínio extracelular de B7-H4 murino com o domínio transmembranar de B7H3 murino. Estas células tumorais foram implantadas subcutaneamente sobre o flanco direito dos camundongos a  $1,0 \times 10^6$  células/200 µl/camundongo. Antes da inoculação, as células foram cultivadas por não mais que três passagens em meio RPMI 1640 suplementado com 10% de soro bovino fetal inativado por aquecimento (FBS), L-Glutamina 2 mM. As células foram cultivadas a 37 °C numa atmosfera umidificada com 5% de CO<sub>2</sub>. Após atingir 80 a 85% de confluência, as células foram colhidas e ressuspensas numa mistura 1:1 de RPMI 1640 sem soro e Matrigel a  $5 \times 10^6$  células por mililitro).

[0370] Os camundongos foram monitorados duas vezes por semana após a implantação celular para crescimento tumoral. Para medições de tumor, o comprimento e a largura de cada tumor foram medidos com o uso de calibres e o volume foi calculado de acordo com a fórmula: volume (mm<sup>3</sup>) = (largura (mm) x

comprimento (mm<sup>2</sup>)/2 de tumor. No dia do início do tratamento, todos os tumores foram medidos, resultados fora dos limites foram excluídos, e os camundongos foram aleatoriamente atribuídos a grupos de tratamento. Para tratamento anti-B7-H4, os anticorpos usados incluem 20502 (Figura 9A) e 22213 (Figura 9B). Como controles, administrou-se aos camundongos IgG humano policlonal (Bio X Cell, BE0092) ou IgG2a de camundongo (Bio X Cell, BE0085). Administrou-se aos camundongos quatro vezes por via injeção intravenosa (i.v.), duas vezes por semana, iniciando no dia 4 ou 5 após a inoculação.

[0371] Os tumores continuaram a ser medidos pelo menos duas vezes por semana até o volume do tumor exceder 10% do peso do animal, ou aproximadamente 2000 mm<sup>3</sup>. A alteração no tamanho de tumor é mostrada por meio da representação gráfica de tumores individuais em relação ao dia em que os animais foram inoculados com células CT26. Os valores de P foram calculados com o uso de análises de teste t bicaudais não pareados dos volumes tumorais calculados em cada dia do estudo. O tratamento com 20502 ou 22213 reduziu significativamente o crescimento tumoral em comparação com o controle IgG humano ( $p<0,05$ ) quando administrado entre doses de 10 a 20 mg/kg (Figuras 9A e 9B).

[0372] Experimentos similares foram realizados com o uso de camundongos com células 4T1 implantadas (uma linhagem celular de carcinoma de mama murino) ou B16 (uma linhagem celular de melanoma murino). Estes camundongos foram tratados com 20 mg/kg de um substituto de camundongo de 20502 chamado 20502-msIgG2a-F, que contém a região variável 20502 fundida à IgG2a de camundongo fucosilada, ou ao anticorpo de controle IgG murino. O tratamento com 20502-msIgG2a-F reduziu significativamente o crescimento tumoral em comparação com o controle IgG murino tanto nos modelos de carcinoma de mama 4T1 como de melanoma B16 (Figura 10).

[0373] Experimentos adicionais também foram realizados com o uso de 20502 afucosilado num modelo de xenoenxerto de câncer de mama humano MX-1. Os camundongos NSG fêmea (NOD-scid, IL2R gammanull) foram adquiridos junto à Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME) e foram aclimatados por uma semana antes do início dos estudos. A linhagem celular de câncer de mama humano MX-1

foi anteriormente mostrada para expressar a proteína B7H4 na superfície celular. Estas células tumorais foram implantadas subcutaneamente sobre o flanco direito dos camundongos a 1,0x10<sup>6</sup> células/100 µl/camundongo numa mistura 1:1 de RPMI 1640 sem soro e Matrigel a 5 x10<sup>6</sup> células por mililitro.

[0374] Os camundongos foram monitorados duas vezes por semana após a implantação celular para crescimento tumoral. Para medições tumorais, o comprimento e a largura de cada tumor foram medidos com o uso de calibres, e o volume foi calculado de acordo com a fórmula: Volume (mm<sup>3</sup>) = (largura (mm) x comprimento (mm)<sup>2</sup>)/2 de tumor. No dia 7 após a inoculação, todos os tumores foram medidos, resultados fora dos limites foram excluídos, e os camundongos foram aleatoriamente atribuídos a grupos de tratamento. Administrou-se a todos os animais um construto de DNA que induziu a expressão de IL-15 humana constitutiva na circulação para o restante do estudo. No dia 9, metade dos camundongos recebeu uma injeção intravenosa (i.v.) de 20x10<sup>6</sup> células monocíticas de sangue periférico humano (PBMCs), adquiridas junto à StemCell Technologies (Tukwila, WA). A partir do dia 11, administrou-se aos camundongos 20502 afucosilado (20 mg/kg) ou solução salina como um controle negativo. A terapêutica foi administrada quatro vezes por meio de injeção intravenosa (i.v.) duas vezes por semana.

[0375] Os tumores continuaram a ser medidos pelo menos duas vezes por semana até o volume tumoral exceder 10% do peso do animal ou até os animais demonstrarem uma perda de 15% ou mais do peso corporal inicial. Os valores P foram calculados com o uso de One-Way ANOVA em comparação com os volumes tumorais médios ao longo de todos os grupos de tratamento no Dia 28. Conforme mostrado na Figura 11, o tratamento com 20502 afucosilado reduziu significativamente o crescimento tumoral em comparação com o controle de solução salina ( $p<0,05$ ) apenas quando administrado a camundongos anteriormente injetados com PBMCs humanos.

### **EXEMPLO 15: EFICÁCIA ANTITUMORAL *IN VIVO* EM COMBINAÇÃO COM ANTICORPO ANTI-PD-1**

#### **MÉTODOS**

[0376] Oito camundongos BALB/c fêmeas com sete semanas de idade foram

adquiridos junto à Charles River Laboratories (Hollister, CA) e foram aclimatados por até duas semanas antes do início do estudo. A linhagem celular de carcinoma de mama murino 4T1 foi geneticamente modificada para expressar uma proteína quimérica que contém o domínio extracelular de B7-H4 murino e o domínio transmembranar de B7H3 murino. As células tumorais foram implantadas ortotopicamente na camada de gordura mamária dos camundongos a 0,5x10<sup>5</sup> células/50 µl/camundongo. Antes da inoculação, as células foram cultivadas por não mais que três passagens em meio RPMI 1640 suplementado com 10% de soro bovino fetal inativado por aquecimento (FBS). As células foram cultivadas a 37 °C numa atmosfera umidificada com 5% de CO<sub>2</sub>. Após atingir 80 a 85% de confluência, as células foram colhidas e ressuspensas em RPMI 1640 sem soro no flanco ventral de cada camundongo na camada de gordura mamária.

[0377] Os camundongos foram monitorados duas vezes por semana após a implantação celular para crescimento tumoral. O comprimento e a largura de cada tumor foram medidos com o uso de calibres, e o volume foi calculado de acordo com a fórmula: Volume (mm<sup>3</sup>) = (largura (mm) x comprimento (mm)<sup>2</sup>)/2 de tumor. No dia do início do tratamento, todos os tumores foram medidos, resultados fora dos limites foram excluídos, e os camundongos foram aleatoriamente atribuídos a grupos de tratamento. Para o tratamento anti-B7-H4, um substituto de camundongo de 20502 chamado 20502-msIgG2a-F, que contém a região variável 20502 fundida à IgG2a de camundongo fucosilada, foi utilizado. Como um controle, administrou-se aos camundongos msIgG2a (anti-HEL). 20502-msIgG2a-F ou msIgG2a foram administrados quatro vezes por meio de injeção intravenosa (i.v.), duas vezes por semana, começando no Dia 11 após a inoculação. Anti-PD-1 (uma versão modificada de RMP1-14 (Bio X Cell) contendo um domínio msIgG2a silencioso Fc) foi administrado três vezes por meio de injeção intraperitoneal (i.p.), duas vezes por semana, começando no Dia 11 após a inoculação. Os tumores continuaram a ser medidos pelo menos duas vezes por semana até o volume tumoral exceder 10% do peso do animal, ou aproximadamente 2000 mm<sup>3</sup>.

## **RESULTADOS**

[0378] A alteração no tamanho tumoral, a alteração no volume tumoral e a porcentagem de sobrevivência são mostradas nas Figuras 12A, 12B e 12C,

respectivamente. O tratamento com 20502-msIgG2a-F ou anti-PD-1 reduziu significativamente o crescimento tumoral em comparação com o controle msIgG2a ( $p<0,05$ ). A coadministração de 20502-msIgG2a-F e anti-PD-1 melhorou significativamente a inibição do crescimento tumoral em comparação com a monoterapia ( $p<0,05$ ). Além disto, a terapia de combinação resultou na regressão tumoral completa em 5 dentre 12 camundongos. Os valores P foram calculados com o uso de análises One-Way ANOVA dos volumes tumorais calculados em cada dia do estudo com múltiplas comparações entre cada grupo.

#### **EXEMPLO 16: ANTI-ANTICORPO B7-H4 AUMENTA A INFILTRAÇÃO DE CÉLULAS NK E T E REGULA POSITIVAMENTE PD-L1**

[0379] Camundongos BALB/c fêmeas com oito semanas de idade foram adquiridos junto à Charles River Laboratories (Hollister, CA) e implantados ortotopicamente na camada de gordura mamária dos camundongos com células 4T1+moB7-H4/H3 a  $0,5 \times 10^5$  células/50  $\mu\text{l}$ /camundongo. No dia do início do tratamento, todos os tumores foram medidos, resultados fora dos limites foram excluídos, e os camundongos foram aleatoriamente atribuídos a grupos de tratamento. Administrou-se aos camundongos hulgG1 (anti-HEL) ou 20502 afucosilado a 20 mg/kg por meio de injeção intravenosa (i.v.), duas vezes (Dia 11 e Dia 14 após a inoculação).

[0380] 24 horas após a segunda administração de dose, os camundongos foram submetidos à eutanásia e perfusão com solução salina tamponada com fosfato (PBS). Os tumores foram, então extraídos, fixados em 10% de formalina por cinco horas, enxaguados em PBS, e colocados numa solução de sacarose a 30% por pelo menos 24 horas. Os tumores foram incorporados em Composto Tissue-Tek® O.C.T. e seccionados a 20  $\mu\text{m}$  numa câmara de -15°C (cryostat). As lâminas montadas em tecido foram enxaguadas em Triton a 0,3% em PBS, bloqueadas com soro de cabra normal a 5%, e manchados com anticorpo primário (anti-NKp46, anti-CD3 ou anti-PD-L1; 1:500) de um dia para o outro. Duas seções em série de cada tumor foram manchadas.

[0381] Após a incubação de um dia para o outro, as lâminas foram enxaguadas em Triton a 0,3%, então incubadas com anticorpo secundário (1:400) por três horas numa câmara úmida e enxaguadas. O tecido foi, então, fixado em

paraformaldeído a 1% e enxaguado em PBS. Lamelas foram montadas com o uso de Vectashield® com DAPI, vedadas com Cytoseal™, e deixadas secar numa câmara escura. As imagens foram adquiridas manualmente com um microscópio e câmera de fluorescência. Conforme mostrado na Figura 13, o tratamento com 20502 afucosilado resultou no aumento de células natural killer (NK) (conforme medido pelo anticorpo anti-NKp46) e no aumento de células T CD3+ em bordas tumorais com um aumento moderado de células T CD3+ no núcleo do tumor. A expressão PD-L1 aumentada também foi observada.

**EXEMPLO 17: ANTI-ANTICORPO B7-H4 REDUZ SIGNIFICATIVAMENTE O CRESCIMENTO TUMORAL *IN VIVO* EM MODELOS 4T1- E B16-MOB7-H4/H3 DE UMA MANEIRA DEPENDENTE DE DOSE**

[0382] Camundongos BALB/c ou C57Bl/6 fêmeas com seis a oito semanas de idade foram adquiridos junto à Charles River Laboratories (Hollister, CA) e foram aclimatados por até três semanas antes do início dos estudos. A linhagem celular de carcinoma de mama 4T1 e a linhagem celular de melanoma B16-F10 murino foram geneticamente modificadas para expressar em murino uma proteína quimérica que consiste no domínio extracelular de B7-H4 murino com o domínio transmembranar de B7-H3 murino. Estas células tumorais foram implantadas ortotopicamente na camada de gordura mamária a  $0,05 \times 10^6$  células/50 µl/camundongo para 4T1+moB7-H4/H3 ou subcutaneamente sobre o flanco direito dos camundongos a  $0,5 \times 10^6$  células/100 µl/camundongo para B16+moB7-H4/H3. Antes da inoculação, as células foram cultivadas por não mais que três passagens em meio RPMI-1640 ou DMEM suplementado com soro bovino fetal inativado por aquecimento a 10% (FBS) e L-Glutamina 2mM. As células foram cultivadas a 37°C numa atmosfera umidificada com 5% de CO<sub>2</sub>.

[0383] Os camundongos foram monitorados duas vezes por semana após a implantação celular para crescimento tumoral. Para medições tumorais, o comprimento e a largura de cada tumor foram medidos com o uso de calibres, e o volume foi calculado de acordo com a fórmula: Volume (mm<sup>3</sup>) = (largura (mm) x comprimento (mm)<sup>2</sup>)/2 de tumor. No dia do início do tratamento, todos os tumores foram medidos, resultados fora dos limites foram excluídos, e os camundongos foram aleatoriamente atribuídos a grupos de tratamento. Administrhou-se aos

camundongos anticorpo 20502-msIgG2a-F (anti-B7-H4, msIgG2a, fucosilado (também chamado de “cmFPA150-F”) ou um anticorpo de controle de IgG2 de camundongo quatro vezes por meio de injeção intravenosa (i.v.), duas vezes por semana, começando no Dia 11 (4T1+moB7-H4/H3) ou Dia 6 (B16+moB7-H4/H3) após a inoculação, exceto para o grupo de 20 mg/kg, que foi administrado continuamente dias vezes por semana até o final do estudo.

[0384] Os tumores continuaram a ser medidos pelo menos duas vezes por semana até o volume do tumor exceder 10% do peso do animal, ou aproximadamente 2000 mm<sup>3</sup>. A alteração no tamanho tumoral é mostrada por meio de representação gráfica do volume tumoral médio em relação ao dia em que os animais foram inoculados. O tratamento com 20502-msIgG2a-F reduziu significativamente o crescimento tumoral em comparação com o controle IgG2a de camundongo ( $p < 0,05$ ) quando administrado em doses de 1 mg/kg ou mais no modelo 4T1+moB7-H4/H3 (consulte as Figuras 14A e 14B) e em doses de 3 mg/kg ou mais no modelo B16+moB7-H4/H3 (Figuras 15A e 15B). O significado estatístico foi calculado com o uso de OneWay ANOVA em comparação com todos os grupos de tratamento a msIgG2a.

[0385] As Figuras 14A e 14B mostram que o anticorpo 20502-msIgG2a-F reduz significativamente o crescimento de 4T1 que expressa B7-H4/H3. Camundongos BALB/c foram inoculados ortotopicamente com células de carcinoma de mama 4T1 geneticamente modificadas para expressar ECD B7-H4 murino fundido com TM B7-H3. Administrhou-se aos camundongos anticorpo 20502-msIgG2a-F (anti-B7-H4, msIgG2a, fucosilado) duas vezes por semana começando no Dia 11 após a inoculação. O anticorpo 20502-msIgG2a-F demonstrou uma redução dependente de dose no crescimento tumoral, com inibição do crescimento tumoral significativo em 30 mg/kg ( $p = 0,0003$ ), 20 mg/kg ( $p = 0,0103$ ), 10 mg/kg ( $p = 0,0419$ ), 3 mg/kg ( $p = 0,0277$ ), e 1 mg/kg ( $p = 0,0333$ ) conforme avaliado por OneWay ANOVA no Dia 30.

[0386] As Figuras 15A e 15B mostram que o anticorpo 20502-msIgG2a-F reduz significativamente o crescimento de B16 que expressa B7-H4/H3. Os camundongos C57Bl/6 foram subcutaneamente inoculados com células de melanoma B16-F10 geneticamente modificadas para expressar ECD B7-H4 murino

fundido com TM B7-H3. Administrou-se aos camundongos anticorpo 20502-msIgG2a-F (anti-B7-H4, msIgG2a, fucosilado) duas vezes por semana começando no Dia 6 após a inoculação. O anticorpo 20502-msIgG2a-F demonstrou uma redução dependente de dose no crescimento tumoral (Figura 15A), com inibição do crescimento tumoral significativo em 30 mg/kg ( $p = 0,0085$ ), 20 mg/kg ( $p = 0,0041$ ), 10 mg/kg ( $p = 0,0017$ ), e 3 mg/kg ( $p = 0,0420$ ) conforme avaliado por OneWay ANOVA no Dia 23 (Figura 15B).

[0387] Deste modo, o anticorpo 20502-msIgG2a-F reduziu significativamente o tamanho tumoral de uma maneira dependente de dose em dois modelos de câncer diferentes. Estes dados nas linhagens celulares de carcinoma de mama e melanoma indicam que o anticorpo 20502-msIgG2a-F pode ser usado para tratar pacientes com câncer.

### TABELAS DE SEQUÊNCIAS

#### SEQUÊNCIAS DE ANTICORPOS GITR

SEQ ID NO	Sequência
411	SGSVFSIDAM
412	LSGISSAK
413	YADVSTGWGRDAHGYW
414	EVQLLESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSVFSIDAMGWYRQAPGKQR ELVALSGISSAKYAAASAPGRFTISRDNAKNTVYLQMSSLRAEDTAVY CYADVSTGWGRDAHGYWGQGTLTV
415	EVQLLESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSVFSIDAMGWYRQAPGKQR ELVALSGISSAKYAAASAPGRFTISRDNAKNTVYLQMSSLRAEDTAVY CYADVSTGWGRDAHGYWGQGTLTVKPGGGDKHTCPPCPAPELLGGPSVFLF PPPKDNLMSRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTS KAKGQPREPQVTLPSSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE ALHNHYTQKSLSLSPGK
416	EPKSSDKTHTCPPC
417	DKTHTCPPC
418	ESKYGPPCPPC
419	GGSGGS

420	GGSGGSGGS
421	GGSGGSGGS
422	GGSGGSGGS
423	GGGG
424	GGGG
425	GGGGG

### SEQUÊNCIAS CD80

SEQ ID NO	Sequência
426	VIHVTKEVKEVATLSCGHNVSVEELAQTRIYWQKEKKMVLTMMSG DMNIWPEYKNRTIFDITNNLSIVILRPSDEGTYECSVVKYEKDAF KREHLAEVTLGVKADFPPTPSISDFEIPTSNIIRRIICSTSGGFPEPHLS WLENGEELNAINTTVSQDPETELYAVSSKLDNFNMNTNHSFMCLIY GHLRVNQTFNWNTTKQEHFPDNEPKSSDKHTCPPCPAPELLGG <u>PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV</u> <u>EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK</u> <u>ALPAPIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY</u> <u>PSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ</u> <u>QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</u>
427	VIHVTKEVKEVATLSCGHNVSVEELAQTRIYWQKEKKMVLTMMSG DMNIWPEYKNRTIFDITNNLSIVILRPSDEGTYECSVVKYEKDAF KREHLAEVTLGVKADFPPTPSISDFEIPTSNIIRRIICSTSGGFPEPHLS WLENGEELNAINTTVSQDPETELYAVSSKLDNFNMNTNHSFMCLIY GHLRVNQTFNWNTTKQEHFPDNEPKSSDKHTCPPCPAPE <u>FEGG</u> <u>PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV</u> <u>EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK</u> <u>ALPASIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY</u> <u>PSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ</u> <u>QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</u>
428	VIHVTKEVKEVATLSCGHNVSVEELAQTRIYWQKEKKMVLTMMSG DMNIWPEYKNRTIFDITNNLSIVILRPSDEGTYECSVVKYEKDAF KREHLAEVTLGVKADFPPTPSISDFEIPTSNIIRRIICSTSGGFPEPHLS WLENGEELNAINTTVSQDPETELYAVSSKLDNFNMNTNHSFMCLIY GHLRVNQTFNWNTTKQEHFPDNEPKSSDKHTCPPCPAPE <u>FEGG</u> <u>PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV</u> <u>EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK</u> <u>ALPASIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY</u> <u>PSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ</u> <u>QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</u>

### SEQUÊNCIAS CSFR1

SEQ ID NO	Sequência
429	QVQLVQSGAE VKKPGSSVKV SCKASGYTFT DNYSIWVRQA PGQGLEWMGD INPYNGGTTF NQKFKGRVTI TADKSTSTAY

	MELSSLRSED TAVYYCARES PYFSNLYVMD YWGQGTLVTV SS
430	EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCKASQSVD YDGDNYMNWY QQKPGQAPRL LIYAASNLES GIPARFSGSG SGTDFTLTIS SLEPEDFAVY YCHLSNEDLS TFGGGTKEI K
431	GYTFTDNYMI
432	DINPYNGGTT FNQKFKG
433	ESPYFSNLYV MDY
434	KASQSVDYDG DNYMN
435	AASNLES
436	HLSNEDLST
437	QVQLVQSGAE VKKPGSSVKV SCKASGYTFT DNYMIWVRQA PGQGLEWMGD INPYNGGTTF NQKFKGRVTI TADKSTSTAY MELSSLRSED TAVYYCARES PYFSNLYVMD YWGQGTLVTV SSASTKGPSV FPLAPCSRST SESTAALGCL VKDYFPEPVT VSWNSGALTS GVHTFPAPVLQ SSGLYSLSSV VTPVSSLGT KTYTCNVDHK PSNTKVDKRV ESKYGPCCPP CPAPEFLGGP SVFLFPPKPK DTLMISRTPE VTCVVVDVSQ EDPEVQFNWY VDGVEVHNAK TKPREEQFNS TYRUVSVLTV LHQDWLNGKE YKCKVSNKGL PSSIEKTISK AKGQPREPQV YTLPQSQEEM TKNQVSLTCL VKGFYPSDIA VEWESENQPE NNYKTPPPVL DSDGSFFLYS RLTVDKSRWQ EGNVFSCSVM HEALHNHYTQ KSLSLSLGK
438	EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCKASQSVD YDGDNYMNWY QQKPGQAPRL LIYAASNLES GIPARFSGSG SGTDFTLTIS SLEPEDFAVY YCHLSNEDLS TFGGGTKEI KRTVAAPSVF IFPPSDEQLK SGTASVVCLL NNFYPREAKV QWKVDNALQS GNSQESVTEQ DSKDSTYSLS STTLSKADY EKHKVYACEV THQGLSSPVT KSFNRGEC

### SEQUÊNCIAS DE ANTICORPOS PD-1 (NIVOLUMAB)

SEQ ID NO:	Descrição	Sequência
440	região variável de cadeia pesada	QVQLVESGGVVQPGRSRLLDCKASGITFSNSGMHWVRQAP GKGLEWVAIWYDGSKRYYADSVKGRFTISRDNSKNTLFLQM NSLRAEDTAVYYCATNDDYWGQGTLTVSS
441	região constante de cadeia	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN SGALTSGVHTFPAPVLQSSGLYSLSSVTPVSSLGKTYTCNV DHKPSNTKVDKRVESKYGPCCPPCAPEFLGGPSVFLFPPKP KDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAK

	pesada	TKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVTLPSPQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGK
442	região variável de cadeia leve	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAQYQQKPGQAPRLLIYDASN RATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVY YCQQSSNW PRTFGQGTKVEIK
443	região constante de cadeia leve	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
444	FR1 pesado	QVQLVESGGVVQPGRSRLRDCKASGITFS
445	CDR1 pesada	NSGMH
446	FR2 pesado	WVRQAPGKGLEWVA
447	CDR2 pesada	VIWYDGSKRYYADSVKG
448	FR3 pesado	RFTISRDNSKNTLFLQMNSLRAEDTAVYYCAT
449	CDR3 pesada	NDDY
450	FR4 pesado	WGQGTLTVSS
451	FR1 leve	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSC
452	CDR1 leve	RASQSVSSYLA
453	FR2 leve	WYQQKPGQAPRLLIY
454	CDR2 leve	DASN RAT
455	FR3 leve	GIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYC
456	CDR3 leve	QQSSNW PRT
457	FR4	FGQGTKVEIK

	leve	
--	------	--

[0388] A invenção não deve ser limitada no escopo pelas modalidades específicas descritas no presente documento. De fato, várias modificações da invenção além daquelas descritas irão se tornar evidentes para os versados na técnica a partir da descrição anterior e das Figuras anexas. Tais modificações pretendem ser abrangidas pelo escopo das reivindicações em anexo.

[0389] Todas as referências (por exemplo, publicações ou patentes ou pedidos de patente) citados no presente documento são incorporados ao presente documento a título de referência em sua totalidade e para todos os propósitos na mesma extensão como se cada referência individual (por exemplo, publicação ou pedido de patente) fosse específica e individualmente indicada para ser incorporada a título de referência em sua totalidade para todos os propósitos.

[0390] Outras modalidades são abrangidas pelas reivindicações a seguir.

## REIVINDICAÇÕES

1. Anticorpo isolado ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo que se liga especificamente a B7-H4 humano caracterizado pelo fato de que compreende sequências de região determinante de complementariedade (CDR) 1 de região variável de cadeia pesada (VH), CDR2 de VH, CDR3 de VH e CDR1, CDR2, e CDR3 de região variável de cadeia leve (VL) selecionadas do grupo que consiste em:

- (a). SEQ ID NOs: 458-463, respectivamente;
- (b). SEQ ID NOs: 5-10, respectivamente;
- (c). SEQ ID NOs: 15-20, respectivamente;
- (d). SEQ ID NOs: 25-30, respectivamente;
- (e). SEQ ID NOs: 35-40, respectivamente;
- (f). SEQ ID NOs: 45-50, respectivamente;
- (g). SEQ ID NOs: 55-60, respectivamente;
- (h). SEQ ID NOs: 65-70, respectivamente;
- (i). SEQ ID NOs: 75-80, respectivamente;
- (j). SEQ ID NOs: 85-90, respectivamente;
- (k). SEQ ID NOs: 95-100, respectivamente;
- (l). SEQ ID NOs: 105-110, respectivamente;
- (m). SEQ ID NOs: 115-120, respectivamente;
- (n). SEQ ID NOs: 125-130, respectivamente;
- (o). SEQ ID NOs: 135-140, respectivamente;
- (p). SEQ ID NOs: 145-150, respectivamente;
- (q). SEQ ID NOs: 155-160, respectivamente;
- (r). SEQ ID NOs: 165-170, respectivamente;
- (s). SEQ ID NOs: 175-180, respectivamente;
- (t). SEQ ID NOs: 185-190, respectivamente; e
- (u). SEQ ID NOs: 195-200, respectivamente.

2. Anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo compreende uma VH que compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 11, 21, 31, 41, 464, 51, 61, 71, 81, 91, 101, 111,

121, 131, 141, 151, 161, 171, 181, 191, ou 201.

3. Anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo comprehende uma VL que comprehende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 12, 22, 32, 42, 52, 62, 72, 82, 92, 102, 112, 122, 132, 142, 152, 162, 172, 182, 192, ou 202.

4. Anticorpo isolado ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo que se liga especificamente a B7-H4 humano caracterizado pelo fato de que o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo comprehende uma região variável de cadeia pesada e uma região variável de cadeia leve, em que a região variável de cadeia pesada comprehende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 11, 21, 31, 41, 464, 51, 61, 71, 81, 91, 101, 111, 121, 131, 141, 151, 161, 171, 181, 191, ou 201.

5. Anticorpo isolado ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo que se liga especificamente a B7-H4 humano, caracterizado pelo fato de que o anticorpo comprehende uma região variável de cadeia pesada e uma região variável de cadeia leve, em que a região variável de cadeia leve comprehende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 12, 22, 32, 42, 52, 62, 72, 82, 92, 102, 112, 122, 132, 142, 152, 162, 172, 182, 192, ou 202.

6. Anticorpo isolado ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo que se liga especificamente a B7-H4 humano caracterizado pelo fato de que comprehende uma região variável de cadeia pesada e uma região variável de cadeia leve que comprehende as sequências de aminoácidos das:

- (a). SEQ ID NOs: 464 e 42, respectivamente;
- (b). SEQ ID NOs: 11 e 12, respectivamente;
- (c). SEQ ID NOs: 21 e 22, respectivamente;
- (d). SEQ ID NOs: 31 e 32, respectivamente;
- (e). SEQ ID NOs: 41 e 42, respectivamente;
- (f). SEQ ID NOs: 51 e 52, respectivamente;
- (g). SEQ ID NOs: 61 e 62, respectivamente;
- (h). SEQ ID NOs: 71 e 72, respectivamente;
- (i). SEQ ID NOs: 81 e 82, respectivamente;

- (j). SEQ ID NOs: 91 e 92, respectivamente;
- (k). SEQ ID NOs: 101 e 102, respectivamente;
- (l). SEQ ID NOs: 111 e 112, respectivamente;
- (m). SEQ ID NOs: 121 e 122, respectivamente;
- (n). SEQ ID NOs: 131 e 132, respectivamente;
- (o). SEQ ID NOs: 141 e 142, respectivamente;
- (p). SEQ ID NOs: 151 e 152, respectivamente;
- (q). SEQ ID NOs: 161 e 162, respectivamente;
- (r). SEQ ID NOs: 171 e 172, respectivamente;
- (s). SEQ ID NOs: 181 e 182, respectivamente;
- (t). SEQ ID NOs: 191 e 192, respectivamente; ou
- (u). SEQ ID NOs: 201 e 202, respectivamente.

7. Anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, caracterizado pelo fato de que anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno compreende adicionalmente uma região constante de cadeia pesada.

8. Anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, de acordo com a reivindicação 7, caracterizado pelo fato de que a região constante de cadeia pesada é selecionada do grupo que consiste em regiões constantes de cadeia pesada de imunoglobulinas humanas IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub>, IgG<sub>4</sub>, IgA<sub>1</sub> e IgA<sub>2</sub>.

9. Anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 8, caracterizado pelo fato de que anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno compreende adicionalmente uma região constante de cadeia leve.

10. Anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, de acordo com a reivindicação 9, caracterizado pelo fato de que a região constante de cadeia leve é selecionada do grupo que consiste em imunoglobulinas humanas regiões constantes de cadeia leve IgGκ e IgGλ.

11. Anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, caracterizado pelo fato de que o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno compreende adicionalmente uma região constante de cadeia pesada e uma região constante de cadeia leve, em que

a região constante de cadeia pesada é uma região constante de cadeia pesada de IgG<sub>1</sub> humana, e em que a região constante de cadeia leve é uma região constante de cadeia leve de IgG<sub>k</sub> humana.

12. Anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, caracterizado pelo fato de que o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo compreende uma cadeia pesada que compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 13, 23, 33, 43, 469, 53, 63, 73, 83, 93, 103, 113, 123, 133, 143, 153, 163, 173, 183, 193, ou 203.

13. Anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6 ou 12, caracterizado pelo fato de que o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo compreende uma cadeia leve que compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 14, 24, 34, 44, 54, 64, 74, 84, 94, 104, 114, 124, 134, 144, 154, 164, 174, 184, 194, ou 204.

14. Anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, caracterizado pelo fato de que o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo compreende uma cadeia pesada e cadeia leve que compreende as sequências de aminoácidos das:

- (a). SEQ ID NOs: 469 e 44, respectivamente;
- (b). SEQ ID NOs: 13 e 14, respectivamente;
- (c). SEQ ID NOs: 23 e 24, respectivamente;
- (d). SEQ ID NOs: 33 e 34, respectivamente;
- (e). SEQ ID NOs: 43 e 44, respectivamente;
- (f). SEQ ID NOs: 53 e 54, respectivamente;
- (g). SEQ ID NOs: 63 e 64, respectivamente;
- (h). SEQ ID NOs: 73 e 74, respectivamente;
- (i). SEQ ID NOs: 83 e 84, respectivamente;
- (j). SEQ ID NOs: 93 e 94, respectivamente;
- (k). SEQ ID NOs: 103 e 104, respectivamente;
- (l). SEQ ID NOs: 113 e 114, respectivamente;
- (m). SEQ ID NOs: 123 e 124, respectivamente;
- (n). SEQ ID NOs: 133 e 134, respectivamente;

- (o). SEQ ID NOs: 143 e 144, respectivamente;
- (p). SEQ ID NOs: 153 e 154, respectivamente;
- (q). SEQ ID NOs: 163 e 164, respectivamente;
- (r). SEQ ID NOs: 173 e 174, respectivamente;
- (s). SEQ ID NOs: 183 e 184, respectivamente;
- (t). SEQ ID NOs: 193 e 194, respectivamente; ou
- (u). SEQ ID NOs: 203 e 204, respectivamente.

15. Anticorpo isolado ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo que se liga especificamente a B7-H4 humano, caracterizado pelo fato de que o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo comprehende a CDR1 de VH, CDR2 de VH, CDR3 de VH, CDR1 de VL, CDR2 de VL, e CDR3 de VL de um anticorpo selecionado do grupo que consiste em 15461, 20500, 20501, 20502, 20502.1, 22208, 15462, 22213, 15465, 20506, 15483, 20513, 22216, 15489, 20516, 15472, 15503, 15495, 15478, 15441, e 20496.

16. Anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, de acordo com a reivindicação 15, caracterizado pelo fato de que as CDRs são as CDRs definidas por Kabat, as CDRs definidas por Chothia, ou as CDRs definidas por AbM.

17. Anticorpo isolado ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo que se liga especificamente a B7-H4 humano caracterizado pelo fato de que o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo comprehende a CDR1 de VH, CDR2 de VH, CDR3 de VH, CDR1 de VL, CDR2 de VL, e CDR3 de VL definida por Chothia ou definida por AbM de 20502.1.

18. Anticorpo isolado ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo que se liga especificamente a B7-H4 humano caracterizado pelo fato de que comprehende a sequências de região determinante de complementariedade (CDR) 1 de região variável de cadeia pesada (VH), CDR2 de VH, CDR3 de VH e CDR1, CDR2, e CDR3 de região variável de cadeia leve (VL) das SEQ ID NOs:458-463, respectivamente.

19. Anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, de acordo com a reivindicação 18, caracterizado pelo fato de que (i) o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo comprehende uma região de cadeia pesada variável que comprehende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 464 e uma

região de cadeia leve variável que compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 42 ou (ii) o anticorpo compreende uma cadeia pesada que compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 469 e uma cadeia leve que compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 44.

20. Anticorpo isolado ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo que se liga especificamente a B7-H4 humano caracterizado pelo fato de que compreende a sequências de região determinante de complementariedade (CDR) 1 de região variável de cadeia pesada (VH), CDR2 de VH, CDR3 de VH e CDR1, CDR2, e CDR3 de região variável de cadeia leve (VL) das SEQ ID NOs: 35-40, respectivamente.

21. Anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, de acordo com a reivindicação 20, caracterizado pelo fato de que (i) o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo compreende uma região de cadeia pesada variável que compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 41 e uma região de cadeia leve variável que compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 42 ou (ii) o anticorpo compreende uma cadeia pesada que compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 43 e uma cadeia leve que compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 44.

22. Anticorpo isolado ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo que se liga especificamente a B7-H4 humano caracterizado pelo fato de que compreende a sequências de região determinante de complementariedade (CDR) 1 de região variável de cadeia pesada (VH), CDR2 de VH, CDR3 de VH e CDR1, CDR2, e CDR3 de região variável de cadeia leve (VL) das SEQ ID NOs: 65-70, respectivamente.

23. Anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, de acordo com a reivindicação 22, caracterizado pelo fato de que (i) o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo compreende uma região de cadeia pesada variável que compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 71 e uma região de cadeia leve variável que compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 72 ou (ii) em que o anticorpo compreende uma cadeia pesada que compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 73 e uma cadeia leve que compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 74.

24. Anticorpo isolado ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo caracterizado pelo fato de que se liga ao mesmo epítopo de B7-H4 humano que o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 23.

25. Anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 24, caracterizado pelo fato de que o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo é um anticorpo humano ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo.

26. Anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 15 a 20, 22, ou 24, caracterizado pelo fato de que o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo é um anticorpo murino, humanizado ou quimérico ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo.

27. Anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 26, caracterizado pelo fato de que o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo induz à proliferação de célula T.

28. Anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, de acordo com a reivindicação 27, caracterizado pelo fato de que o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno aumenta a proliferação de célula T em pelo menos 21% em comparação com o tratamento com um anticorpo de controle.

29. Anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, de acordo com a reivindicação 27, caracterizado pelo fato de que o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno aumenta a proliferação de célula T em cerca de 5% a cerca de 35% em comparação com tratamento com um anticorpo de controle.

30. Anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 29, caracterizado pelo fato de que o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo induz à proliferação de célula T CD4+.

31. Anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, de acordo com a reivindicação 30, caracterizado pelo fato de que o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo aumenta a proliferação de célula T CD4+ em pelo menos 9% em comparação com tratamento com um anticorpo de controle.

32. Anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, de acordo com a reivindicação 30, caracterizado pelo fato de que o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo aumenta a proliferação de célula T CD4+ em cerca de 5% a cerca de 15% em comparação com tratamento com um anticorpo de controle.

33. Anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 32, caracterizado pelo fato de que o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo induz à proliferação de célula T CD8+.

34. Anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, de acordo com a reivindicação 33, caracterizado pelo fato de que o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo aumenta a proliferação de célula T CD8+ em pelo menos 11% em comparação com tratamento com um anticorpo de controle.

35. Anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, de acordo com a reivindicação 34, caracterizado pelo fato de que o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo aumenta a proliferação de célula T CD8+ em cerca de 5% a cerca de 15% em comparação com tratamento com um anticorpo de controle.

36. Anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 35, caracterizado pelo fato de que o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo induz à produção de interferon gama (IFN $\gamma$ ).

37. Anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, de acordo com a reivindicação 36, caracterizado pelo fato de que o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo tem capacidade para aumentar a produção de IFN $\gamma$  por pelo menos 2 vezes, pelo menos 3 vezes, pelo menos 4 vezes, e pelo menos 5 vezes, pelo menos 6 vezes, pelo menos 7 vezes, pelo menos 8 vezes, cerca de 2 vezes a cerca de 10 vezes, ou cerca de 3 vezes a cerca de 10 vezes.

38. Anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 37, caracterizado pelo fato de que o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo tem capacidade para induzir à citotoxicidade mediada por célula dependente de anticorpo (ADCC) numa

célula que expressa B7-H4.

39. Anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, de acordo com a reivindicação 38, caracterizado pelo fato de que o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo induz à lise específica em pelo menos 20%, pelo menos 30%, pelo menos 40%, cerca de 20% a cerca de 50%, ou cerca de 30% a cerca de 50% de células que expressam B7-H4.

40. Anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 39, caracterizado pelo fato de que anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo inibe o crescimento de tumor num modelo de carcinoma colorretal CT26 murino, um modelo de 4T1 carcinoma de mama murino, ou um modelo B16-moB7-H4/H3 de linhagem de célula de melanoma.

41. Anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, de acordo com a reivindicação 40, caracterizado pelo fato de que o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo reduz o crescimento de tumor em pelo menos 25%, pelo menos 30%, pelo menos 40%, pelo menos 45%, ou pelo menos 50% em comparação com tratamento com um anticorpo de controle.

42. Anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 27 a 41, caracterizado pelo fato de que a indução de proliferação de célula T, a indução de proliferação de célula T CD4+, a indução de CD8+ proliferação de célula T, a indução de produção de IFN $\gamma$ , a atividade de ADCC, e/ou a inibição de crescimento de tumor é dependente de dose.

43. Anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 42, caracterizado pelo fato de que o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo se liga a B7-H4 de macaco cinomolgo.

44. Anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 43, caracterizado pelo fato de que o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo se liga a B7-H4 de rato.

45. Anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 44, caracterizado pelo fato de que o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo se liga a B7-H4 de

camundongo.

46. Anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 45, caracterizado pelo fato de que o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo se liga ao domínio de IgV de B7-H4 humano.

47. Anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 46, caracterizado pelo fato de que o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo é afucosilado.

48. Anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 47, caracterizado pelo fato de que é um anticorpo de comprimento completo.

49. Anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 47, caracterizado pelo fato de que é um fragmento de ligação ao antígeno.

50. Fragmento de ligação ao antígeno, de acordo com a reivindicação 49, caracterizado pelo fato de que o dito fragmento de ligação ao antígeno compreende um Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fv de cadeia única (scFv), Fv ligado por dissulfeto, domínio V-NAR, IgNar, intracorpo, IgGΔCH2, minicorpo, F(ab')<sub>3</sub>, tetracorpo, triacorpo, diacorpo, anticorpo de domínio único, DVD-Ig, Fcab, mAb<sup>2</sup>, (scFv)<sub>2</sub>, ou scFv-Fc.

51. Anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 50, caracterizado pelo fato de que compreende adicionalmente uma identificação detectável.

52. Polinucleotídeo isolado caracterizado pelo fato de que compreende uma molécula de ácido nucleico que codifica a região variável de cadeia pesada ou cadeia pesada do anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 51.

53. Polinucleotídeo isolado, de acordo com a reivindicação 52, caracterizado pelo fato de que a molécula de ácido nucleico codifica o VH da SEQ ID NO: 11, 21, 31, 41, 464, 51, 61, 71, 81, 91, 101, 111, 121, 131, 141, 151, 161, 171, 181, 191, ou 201 ou a cadeia pesada da SEQ ID NO: 13, 23, 33, 43, 469, 53, 63, 73, 83, 93, 103, 113, 123, 133, 143, 153, 163, 173, 183, 193, ou 203.

54. Polinucleotídeo isolado, de acordo com a reivindicação 52, caracterizado

pelo fato de que a molécula de ácido nucleico compreende a sequência da SEQ ID NO: 213, 223, 233, 243, 470, 253, 263, 273, 283, 293, 303, 313, 323, 333, 343, 353, 363, 373, 383, 393, ou 403.

55. Polinucleotídeo isolado, de acordo com a reivindicação 52, caracterizado pelo fato de que a molécula de ácido nucleico compreende (i) a sequência da SEQ ID NO: 213, 223, 233, 243, 470, 253, 263, 273, 283, 293, 303, 313, 323, 333, 343, 353, 363, 373, 383, 393, ou 403 e (ii) a sequência da SEQ ID NO: 408.

56. Polinucleotídeo isolado caracterizado pelo fato de que compreende uma molécula de ácido nucleico que codifica a região variável de cadeia leve ou cadeia leve do anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 51.

57. Polinucleotídeo isolado, de acordo com a reivindicação 56, caracterizado pelo fato de que a molécula de ácido nucleico codifica a VL da SEQ ID NO: 12, 22, 32, 42, 52, 62, 72, 82, 92, 102, 112, 122, 132, 142, 152, 162, 172, 182, 192, ou 202 ou a cadeia leve da SEQ ID NO: 14, 24, 34, 44, 54, 64, 74, 84, 94, 104, 114, 124, 134, 144, 154, 164, 174, 184, 194, ou 204.

58. Polinucleotídeo isolado, de acordo com a reivindicação 56, caracterizado pelo fato de que a molécula de ácido nucleico compreende a sequência da SEQ ID NO: 214, 224, 234, 244, 254, 264, 274, 284, 294, 304, 314, 324, 334, 344, 354, 364, 374, 384, 394, ou 404.

59. Polinucleotídeo isolado, de acordo com a reivindicação 56, caracterizado pelo fato de que a molécula de ácido nucleico compreende (i) a sequência da SEQ ID NO: 214, 224, 234, 244, 254, 264, 274, 284, 294, 304, 314, 324, 334, 344, 354, 364, 374, 384, 394, ou 404 e (ii) a sequência da SEQ ID NO: 406.

60. Polinucleotídeo isolado caracterizado pelo fato de que compreende a molécula de ácido nucleico que codifica a região variável de cadeia pesada ou cadeia pesada do anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, de acordo com uma das reivindicações 1 a 51, e a região variável de cadeia leve ou cadeia leve do anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, de acordo com uma das reivindicações 1 a 51.

61. Vetor isolado caracterizado pelo fato de que compreende o polinucleotídeo de acordo com qualquer uma das reivindicações 52 a 60.

62. Célula hospedeira caracterizado pelo fato de que compreende o polinucleotídeo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 52 a 60, o vetor de acordo com a reivindicação 61, ou um primeiro vetor que compreende o polinucleotídeo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 52 a 55, e um segundo vetor que compreende o polinucleotídeo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 56 a 59.

63. Célula hospedeira, de acordo com a reivindicação 62, caracterizado pelo fato de que é selecionado do grupo que consiste em *E. coli*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Streptomyces*, levedura, CHO, YB/20, NS0, PER-C6, HEK-293T, NIH-3T3, HeLa, BHK, Hep G2, SP2/0, R1.1, B-W, L-M, COS 1, COS 7, BSC1, BSC40, célula BMT10, célula vegetal, célula de inseto, e célula humana em cultura de tecido.

64. Célula hospedeira, de acordo com a reivindicação 62 ou 63, caracterizado pelo fato de que a célula hospedeira não tem um gene alfa-1,6-fucosiltransferase (FUT8).

65. Método para produzir um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo que se liga a B7-H4 humano que compreende cultivar a célula hospedeira, de acordo com qualquer uma das reivindicações 62 a 64, caracterizado pelo fato de que a molécula de ácido nucleico é expressada e o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo é produzido.

66. Anticorpo isolado ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo que se liga especificamente a B7-H4 humano e é codificado pelo polinucleotídeo caracterizado pelo fato de que é de acordo com qualquer uma das reivindicações 52 a 60.

67. Composição farmacêutica caracterizada pelo fato de que compreende o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 51 ou 66, e um excipiente farmaceuticamente aceitável.

68. Composição farmacêutica caracterizada pelo fato de que compreende (i) anticorpos ou fragmentos de ligação ao antígeno, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 51 ou 66, e (ii) um excipiente farmaceuticamente aceitável, em que pelo menos 95% dos anticorpos ou fragmentos de ligação ao antígeno do mesmo na composição são afucosilados.

69. Composição farmacêutica caracterizada pelo fato de que compreende (i)

anticorpos ou fragmentos de ligação ao antígeno do mesmo que se ligam especificamente a B7-H4 humano e compreendem as sequências de região determinante de complementariedade (CDR) 1 de região variável de cadeia pesada (VH), CDR2 de VH, CDR3 de VH e CDR1 de região variável de cadeia leve (VL), CDR2, e CDR3 das SEQ ID NOs: 458-460, respectivamente, e (ii) um excipiente farmaceuticamente aceitável, em que pelo menos 95% dos anticorpos ou fragmentos de ligação ao antígeno do mesmo na composição são afucosilados.

70. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 69, caracterizado pelo fato de que (i) o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo compreende uma região de cadeia pesada variável que compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 464 e uma região de cadeia leve variável que compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 42 ou (ii) o anticorpo compreende uma cadeia pesada que compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 469 e uma cadeia leve que compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 44.

71. Composição farmacêutica caracterizada pelo fato de que compreende (i) anticorpos ou fragmentos de ligação ao antígeno do mesmo que se ligam especificamente a B7-H4 humano e compreendem as sequências de região determinante de complementariedade (CDR) 1 de região variável de cadeia pesada (VH), CDR2 de VH, CDR3 de VH e CDR1 de região variável de cadeia leve (VL), CDR2, e CDR3 das SEQ ID NOs: 35-40, respectivamente, e (ii) um excipiente farmaceuticamente aceitável, em que pelo menos 95% dos anticorpos ou fragmentos de ligação ao antígeno do mesmo na composição são afucosilados.

72. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 71, caracterizado pelo fato de que (i) o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo compreende uma região de cadeia pesada variável que compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 41 e uma região de cadeia leve variável que compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 42 ou (ii) o anticorpo compreende uma cadeia pesada que compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 43 e uma cadeia leve que compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 44.

73. Composição farmacêutica caracterizada pelo fato de que compreende (i)

anticorpos ou fragmentos de ligação ao antígeno do mesmo que se ligam especificamente a B7-H4 humano e compreendem as sequências de região determinante de complementariedade (CDR) 1 de região variável de cadeia pesada (VH), CDR2 de VH, CDR3 de VH e CDR1 de região variável de cadeia leve (VL), CDR2, e CDR3 das SEQ ID NOs: 65-70, respectivamente, e (ii) um excipiente farmaceuticamente aceitável, em que pelo menos 95% dos anticorpos ou fragmentos de ligação ao antígeno do mesmo na composição são afucosilados.

74. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 73, caracterizada pelo fato de que (i) o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo compreende uma região de cadeia pesada variável que compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 71 e uma região de cadeia leve variável que compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 72 ou (ii) em que o anticorpo compreende uma cadeia pesada que compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 73 e uma cadeia leve que compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 74.

75. Composição farmacêutica, de acordo com qualquer uma das reivindicações 67 a 74, caracterizada pelo fato de que a fucosilação é indetectável na composição.

76. Composição farmacêutica, de acordo com qualquer uma das reivindicações 67 a 75, caracterizada pelo fato de que compreende adicionalmente um anticorpo anti-PD-1 ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo.

77. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 76, caracterizada pelo fato de que o anticorpo anti-PD-1 ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo é nivolumab, ou pembrolizumab.

78. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 76, caracterizada pelo fato de que o anticorpo anti-PD-1 ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo é AMP-514, camrelizumab, tislelizumab e spartalizumab.

79. Composição farmacêutica, de acordo com qualquer uma das reivindicações 67 a 75, caracterizada pelo fato de que compreende adicionalmente um anticorpo anti-PD-L1 ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo.

80. Método para induzir à proliferação de célula T caracterizado pelo fato de que compreende fazer contato de uma célula T com o anticorpo ou fragmento de

ligação ao antígeno do mesmo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 51 ou 66, ou a composição farmacêutica, de acordo com qualquer uma das reivindicações 67 a 79.

81. Método, de acordo com a reivindicação 80, caracterizado pelo fato de que a proliferação de célula T é reduzida em pelo menos 30%, pelo menos 40%, pelo menos 50%, pelo menos 60%, pelo menos 70%, ou pelo menos 80%.

82. Método para induzir à proliferação de célula T CD4+ caracterizado pelo fato de que compreende fazer contato de uma célula T CD4+ com o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 51 ou 66, ou a composição farmacêutica, de acordo com qualquer uma das reivindicações 67 a 79.

83. Método, de acordo com a reivindicação 82, caracterizado pelo fato de que a proliferação de célula T CD4+ é reduzida em pelo menos 30%, pelo menos 40%, pelo menos 50%, pelo menos 60%, pelo menos 70%, ou pelo menos 80%.

84. Método para induzir à proliferação de célula T CD8+ caracterizado pelo fato de que compreende fazer contato de uma célula T CD8+ com o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 51 ou 66, ou a composição farmacêutica, de acordo com qualquer uma das reivindicações 67 a 79.

85. Método, de acordo com a reivindicação 84, caracterizado pelo fato de que a proliferação de célula T CD8+ é reduzida em pelo menos 30%, pelo menos 40%, pelo menos 50%, pelo menos 60%, pelo menos 70%, ou pelo menos 80%.

86. Método para induzir à produção de interferon gama caracterizado pelo fato de que compreende fazer contato de uma célula T com o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 51 ou 66, ou a composição farmacêutica, de acordo com qualquer uma das reivindicações 67 a 79.

87. Método, de acordo com a reivindicação 86, caracterizado pelo fato de que a produção de interferon gama é aumentada em pelo menos 30%, pelo menos 40%, pelo menos 50%, pelo menos 60%, pelo menos 70%, ou pelo menos 80%.

88. Método para exterminar uma célula que expressa B7-H4 caracterizado pelo fato de que compreende fazer contato da célula com o anticorpo ou fragmento

de ligação ao antígeno do mesmo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 51 ou 66, ou a composição farmacêutica, de acordo com qualquer uma das reivindicações 67 a 79.

89. Método para esgotar células que expressam B7-H4 de uma população de células caracterizado pelo fato de que compreende fazer contato da população de células com o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 51 ou 66, ou a composição farmacêutica, de acordo com qualquer uma das reivindicações 67 a 79.

90. Método, de acordo com a reivindicação 88 ou 89, caracterizado pelo fato de que o extermínio ou esgotamento ocorre por meio de ADCC.

91. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 80 a 90, caracterizado pelo fato de que compreende fazer contato da célula T, da célula T CD4+, da célula T CD8+, da célula ou da população de células com um anticorpo anti-PD-1 ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo.

92. Método, de acordo com a reivindicação 91, caracterizado pelo fato de que o contato com o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 51 ou 66, ou a composição farmacêutica, de acordo com qualquer uma das reivindicações 67 a 78, e o contato com o anticorpo anti-PD-1 ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo ocorrem simultaneamente.

93. Método, de acordo com a reivindicação 91, caracterizado pelo fato de que o contato com o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 51 ou 66, ou a composição farmacêutica, de acordo com qualquer uma das reivindicações 67 a 78, e o contato com o anticorpo anti-PD-1 ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo ocorrem sequencialmente.

94. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 80 a 90, caracterizado pelo fato de que compreende fazer contato da célula T, da célula T CD4+, da célula T CD8+, da célula ou da população de células com um anticorpo anti-PD-L1 ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo.

95. Método, de acordo com a reivindicação 94, caracterizado pelo fato de que o contato com o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, de

acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 51 ou 66, ou a composição farmacêutica, de acordo com qualquer uma das reivindicações 67 a 75, e o contato com o anticorpo anti-PD-L1 ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo ocorrem simultaneamente.

96. Método, de acordo com a reivindicação 94, caracterizado pelo fato de que o contato com o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 51 ou 66, ou a composição farmacêutica, de acordo com qualquer uma das reivindicações 67 a 75, e o contato com o anticorpo anti-PD-L1 ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo ocorrem sequencialmente.

97. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 80 a 96, caracterizado pelo fato de que o contato é in vitro.

98. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 80 a 96, caracterizado pelo fato de que o contato é num indivíduo.

99. Método para tratar um câncer que expressa B7-H4 em um indivíduo, caracterizado pelo fato de que o método compreende administrar ao indivíduo uma quantidade eficaz do anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 51 ou 66, ou a composição farmacêutica, de acordo com qualquer uma das reivindicações 67 a 79.

100. Método, de acordo com a reivindicação 99, caracterizado pelo fato de que o câncer é selecionado do grupo que consiste em câncer de mama, carcinoma ductal, carcinoma de endométrio, câncer de ovário, câncer de pulmão de célula não pequena, câncer pancreático, câncer de tireoide, câncer de rim e câncer de bexiga.

101. Método, de acordo com a reivindicação 100, caracterizado pelo fato de que o câncer de mama é câncer de mama triplo negativo ou em que o câncer de pulmão de célula não pequena é carcinoma de célula escamosa.

102. Método, de acordo com a reivindicação 100, caracterizado pelo fato de que o câncer de pulmão de célula não pequena é um adenocarcinoma.

103. Método, de acordo com a reivindicação 99, caracterizado pelo fato de que o câncer é selecionado do grupo que consiste em câncer de cabeça e pescoço, câncer de pulmão de célula pequena, câncer gástrico, e melanoma.

104. Método, de acordo com a reivindicação 100, caracterizado pelo fato de

que o câncer é câncer de ovário que é um adenocarcinoma seroso.

105. Método, de acordo com a reivindicação 101, caracterizado pelo fato de que o câncer é câncer de mama que é um adenocarcinoma ductal.

106. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 99 a 105, caracterizado pelo fato de que o câncer é um respondente inadequado de inibidor PD-1.

107. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 99 a 106, caracterizado pelo fato de que o câncer é um respondente inadequado de inibidor PD-L1.

108. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 99 a 107, caracterizado pelo fato de que o câncer expressa um baixo nível de PD-L1.

109. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 99 a 108, caracterizado pelo fato de que o indivíduo é ser humano.

110. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 99 a 109, caracterizado pelo fato de que compreende adicionalmente administrar ao indivíduo um anticorpo anti-PD-1 ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo.

111. Método, de acordo com a reivindicação 110, caracterizado pelo fato de que a administração do anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 51 ou 66, ou a composição farmacêutica, de acordo com qualquer uma das reivindicações 67 a 78, e a administração do anticorpo anti-PD-1 ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo ocorrem simultaneamente.

112. Método, de acordo com a reivindicação 110, caracterizado pelo fato de que a administração do anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 51 ou 66, ou a composição farmacêutica, de acordo com qualquer uma das reivindicações 67 a 78, e a administração do anticorpo anti-PD-1 ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo ocorrem sequencialmente.

113. Método, de acordo com a reivindicação 112, caracterizado pelo fato de que a administração do anticorpo anti-PD-1 ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo ocorre após a administração do anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 51 ou 66,

ou a composição farmacêutica, de acordo com qualquer uma das reivindicações 67 a 78.

114. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 91 a 93, 97, 98 e 110 a 113, caracterizado pelo fato de que o anticorpo anti-PD-1 ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo é nivolumab ou pembrolizumab.

115. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 91 a 93, 97, 98 e 110 a 113, caracterizado pelo fato de que o anticorpo anti-PD-1 ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo é AMP-514, camrelizumab, tislelizumab, ou spartalizumab.

116. Método para detectar B7-H4 em uma amostra caracterizado pelo fato de que compreende fazer contato da dita amostra com o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 51 ou 66.

117. Método, de acordo com a reivindicação 116, caracterizado pelo fato de que a amostra é obtida a partir de um câncer num indivíduo humano.

118. Kit caracterizado pelo fato de que compreende o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 51 ou 66, ou a composição farmacêutica, de acordo com qualquer uma das reivindicações 67 a 79, e a) um reagente de detecção, b) um antígeno de B7-H4, c) um aviso que reflete a aprovação para uso ou venda para administração humana, ou d) uma combinação dos mesmos.

119. Anticorpo isolado ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 51 ou 66, caracterizado pelo fato de que o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo inibe a atividade de bloqueio de ponto de verificação de célula T de B7-H4.

120. Anticorpo isolado ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, de acordo com a reivindicação 119, caracterizado pelo fato de que a atividade de bloqueio de ponto de verificação de célula T é medida por um aumento em produção de IL-2 em relação às células de controle.

121. Composição farmacêutica caracterizada pelo fato de que compreende (i) anticorpos ou fragmentos de ligação ao antígeno, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 51 ou 66, e (ii) um excipiente farmaceuticamente aceitável,

em que os anticorpos ou fragmentos de ligação ao antígeno inibem a atividade de bloqueio de ponto de verificação de célula T de B7-H4.

122. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 121, caracterizado pelo fato de que a atividade de bloqueio de ponto de verificação de célula T é medida por um aumento em produção de IL-2 em relação às células de controle.

**FIG. 1A**



Câncer de Ovário



Câncer de Mama Triplo Negativo



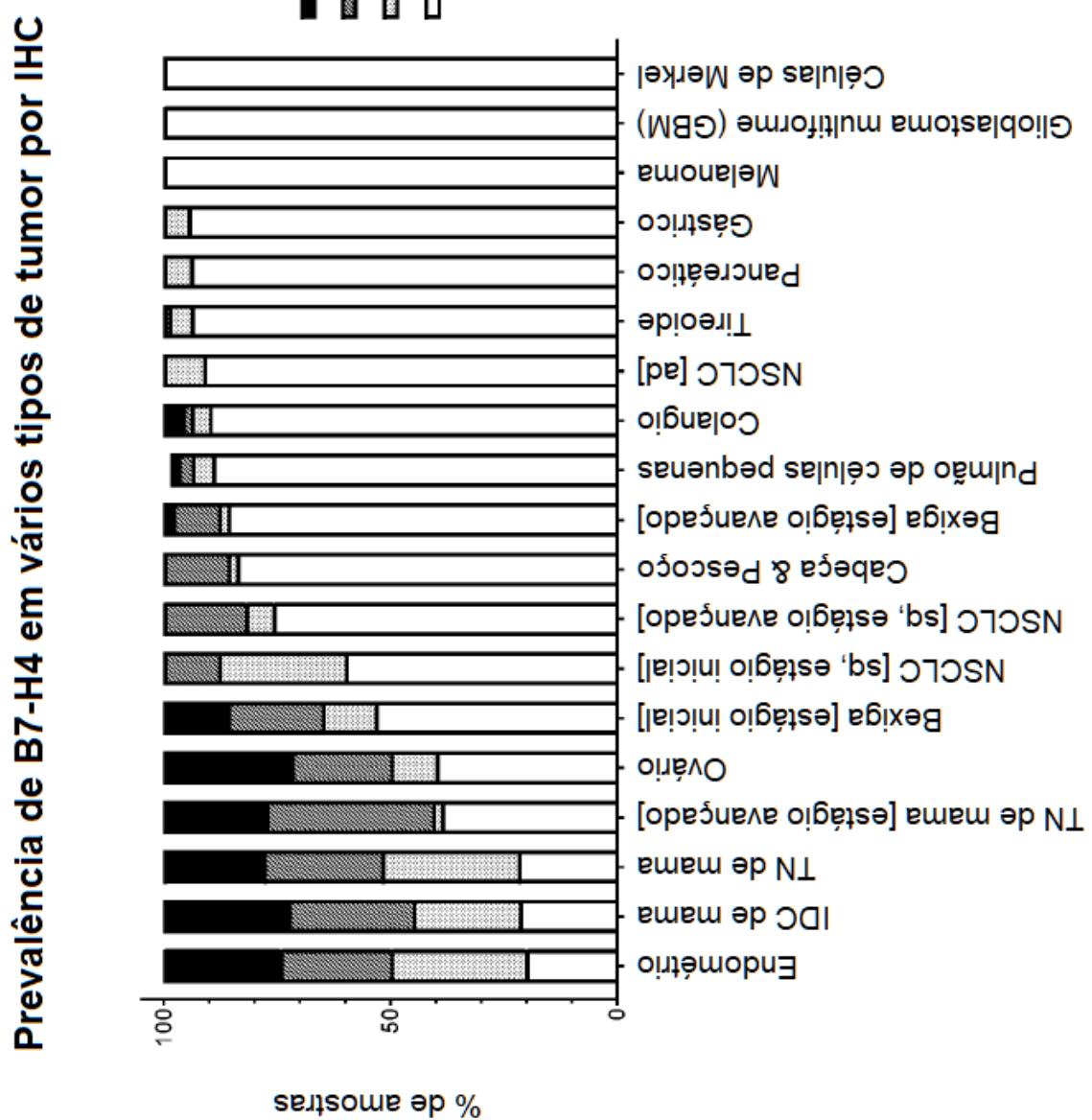
Câncer de Endométrio

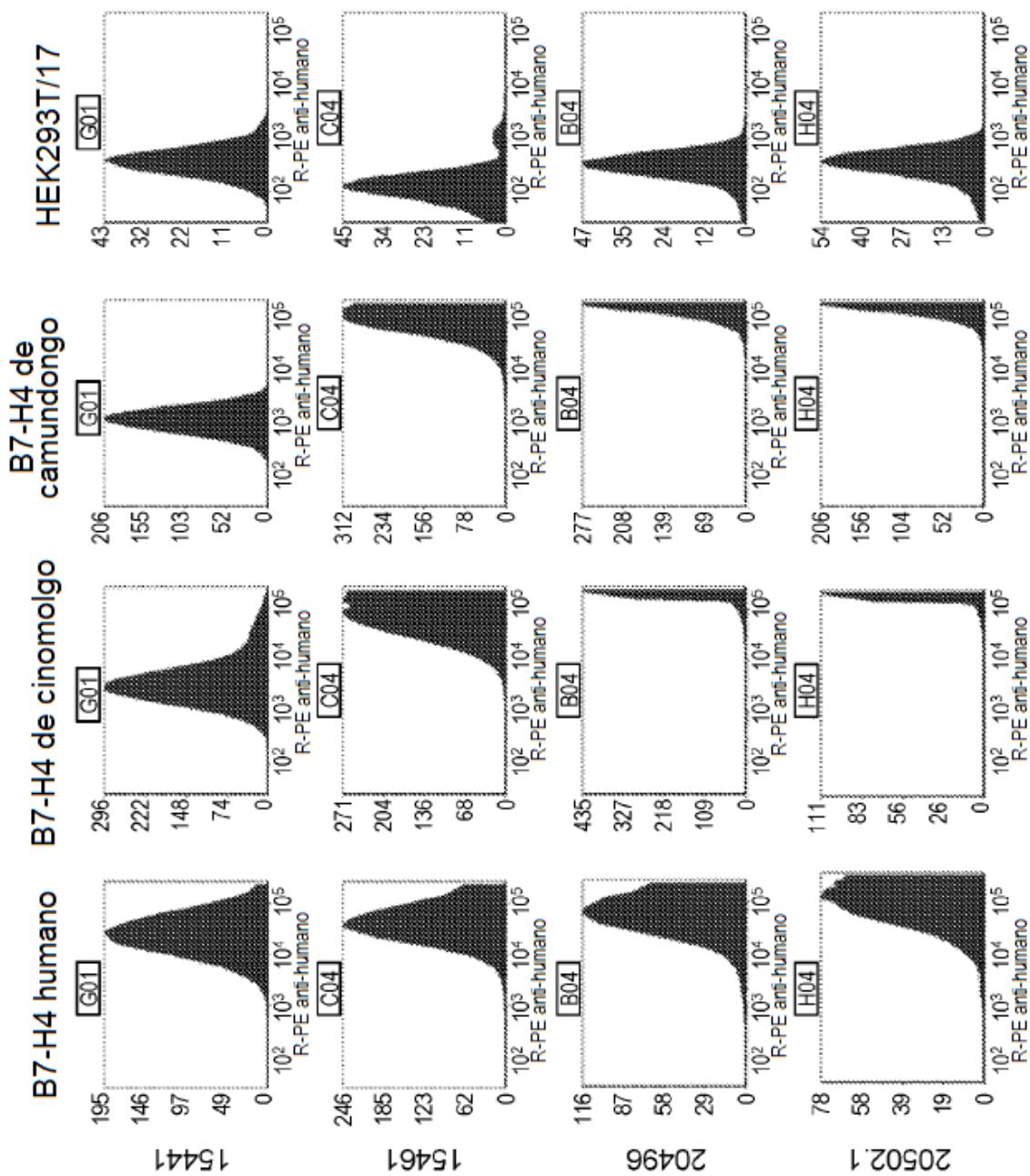


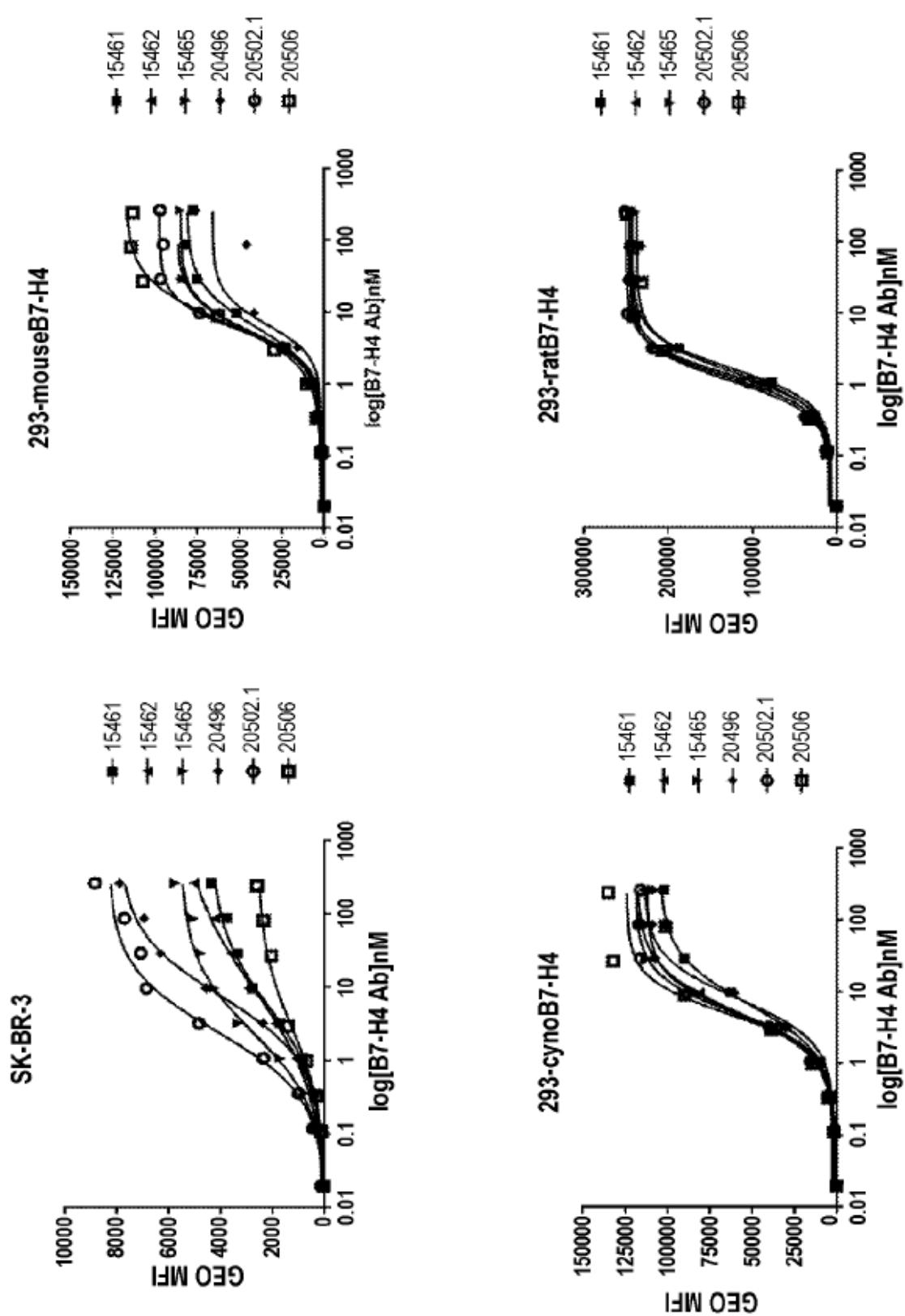
Carcinoma Ductal Invasivo

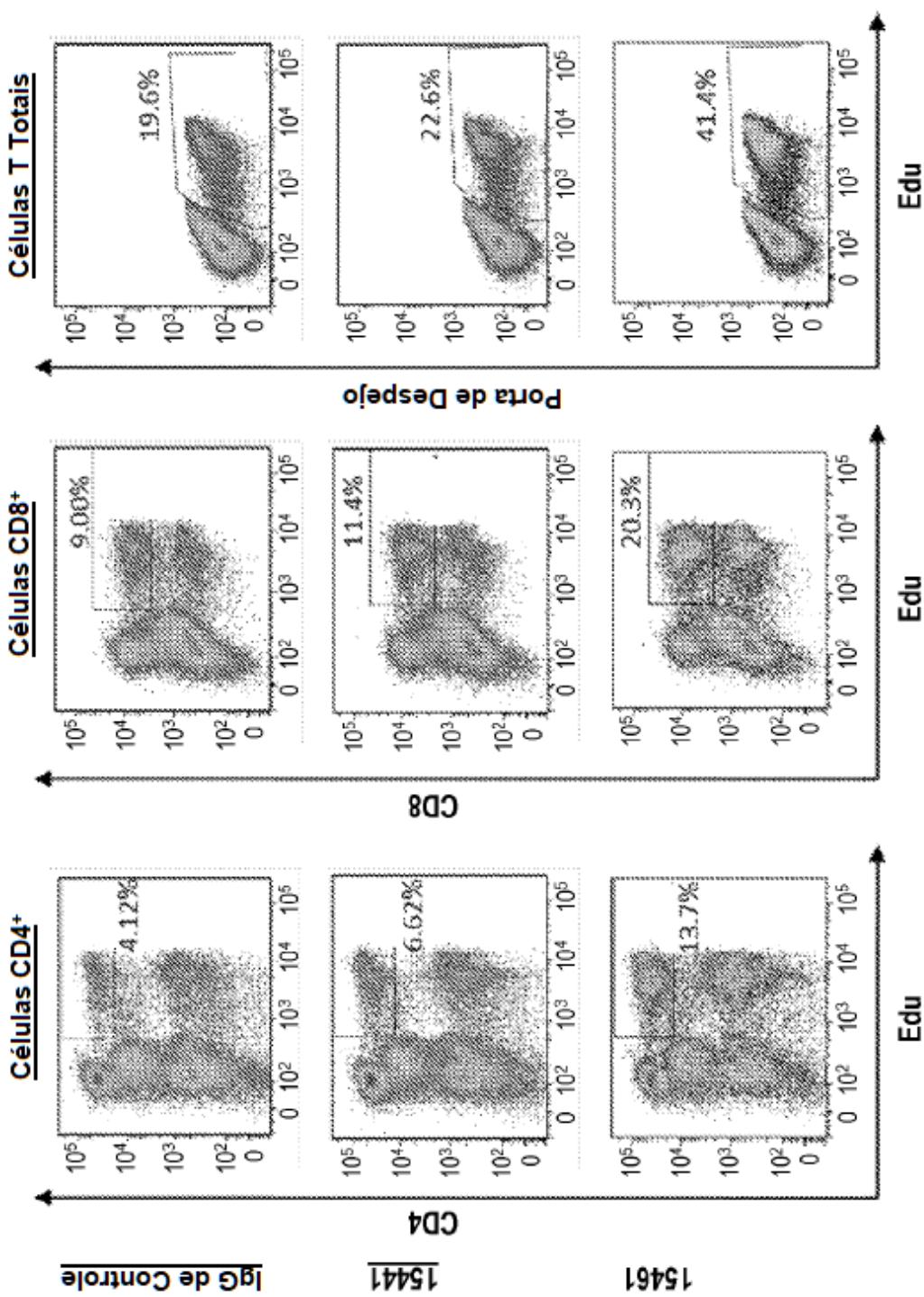


Câncer de Pulmão de Células Não Pequenas

**FIG. 1B**

**FIG. 2A**

**FIG. 2B**



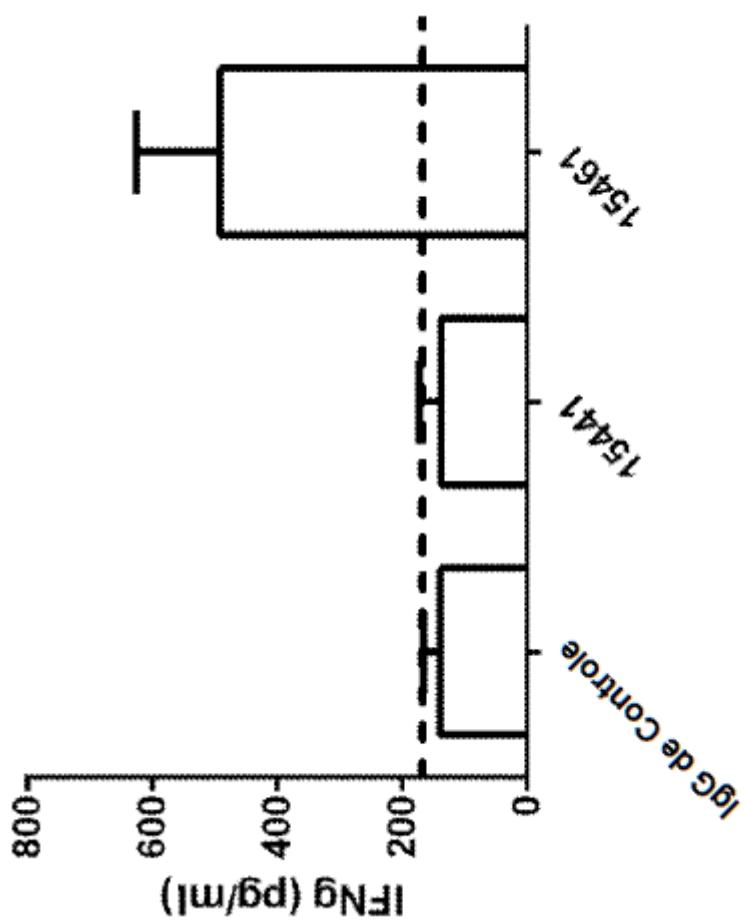


FIG. 3B

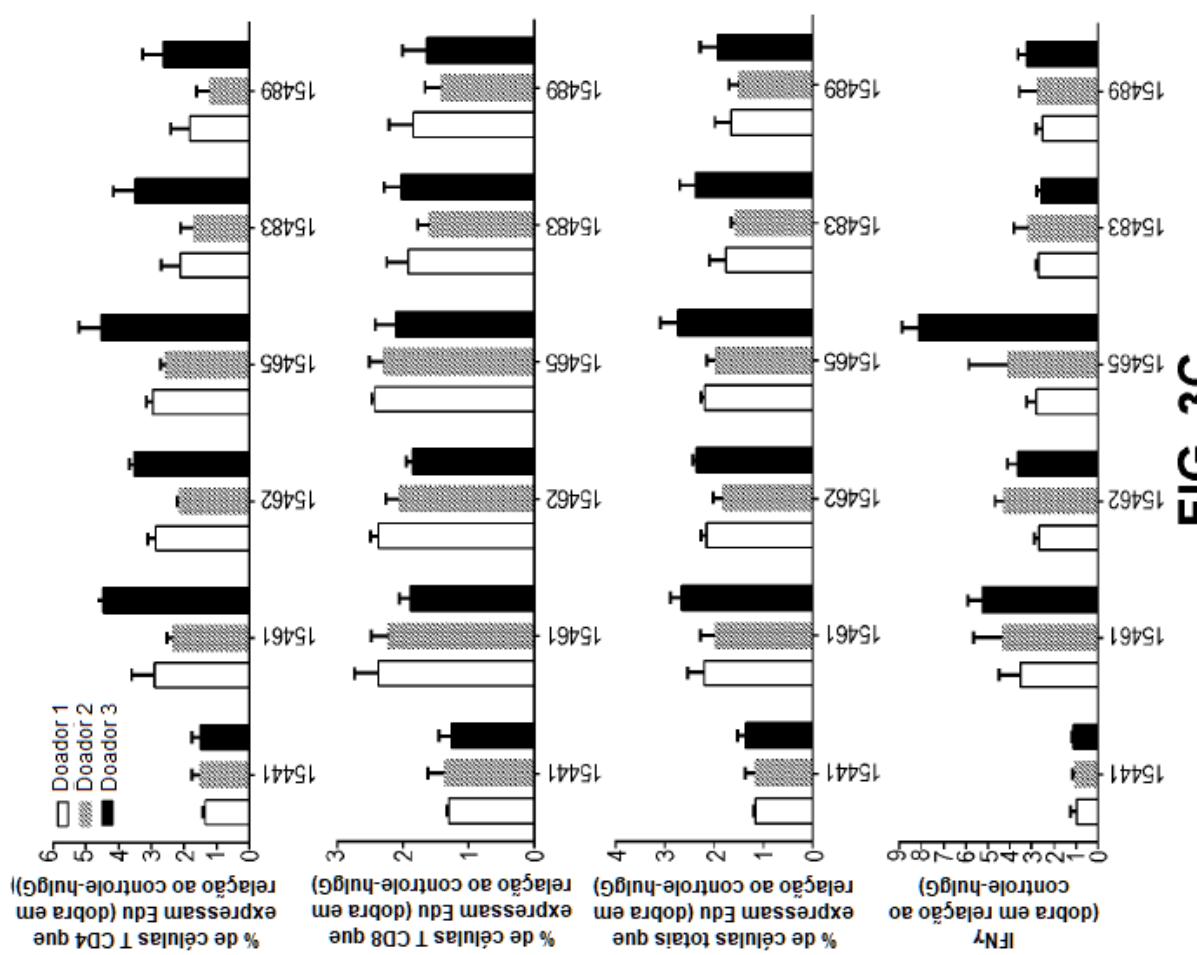


FIG. 3C

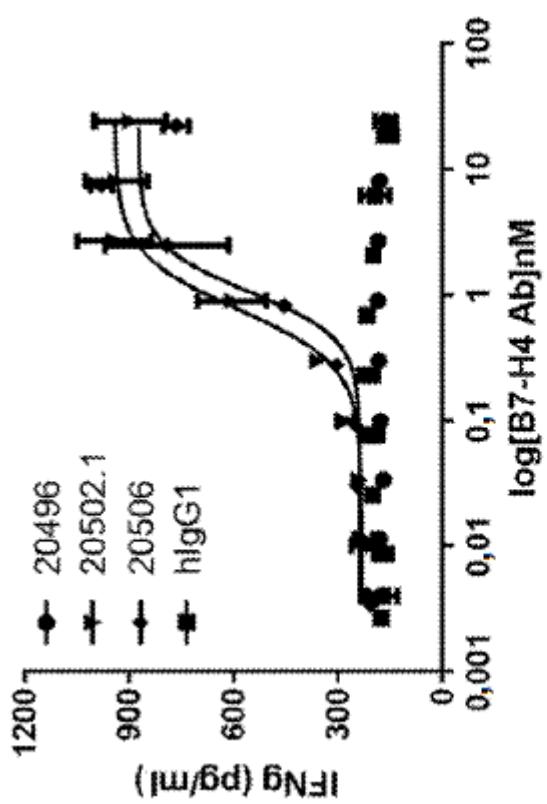
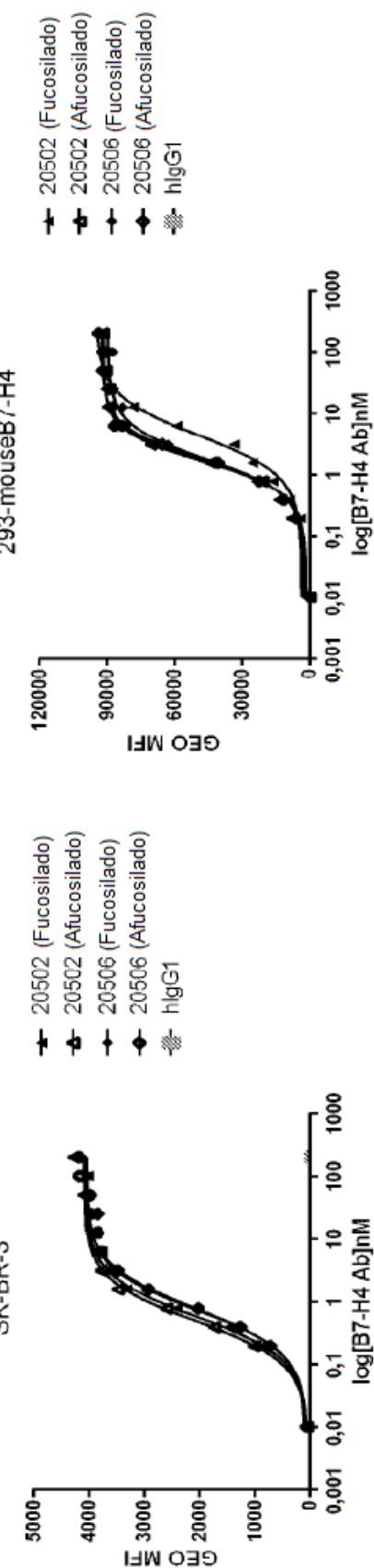
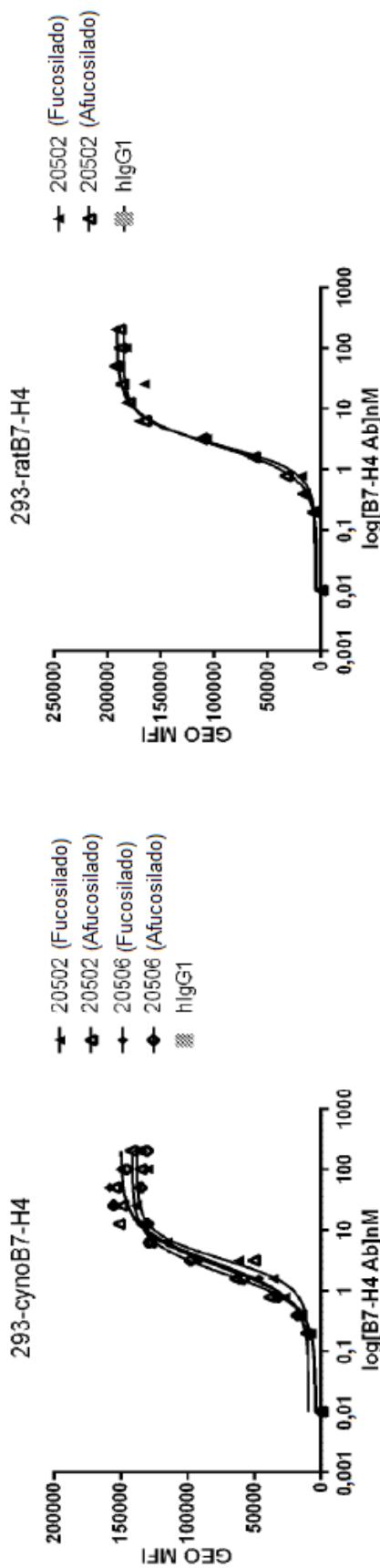


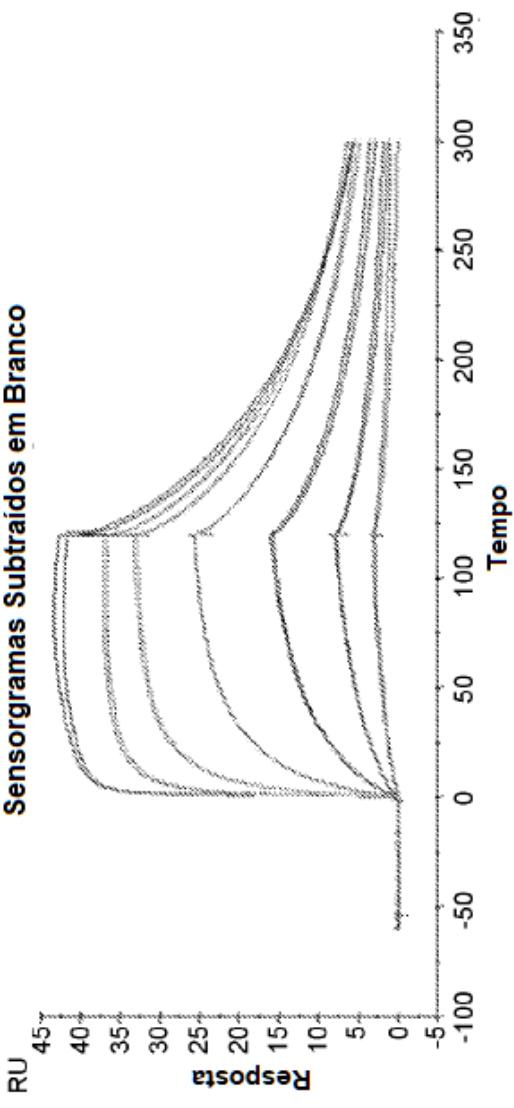
FIG. 3D



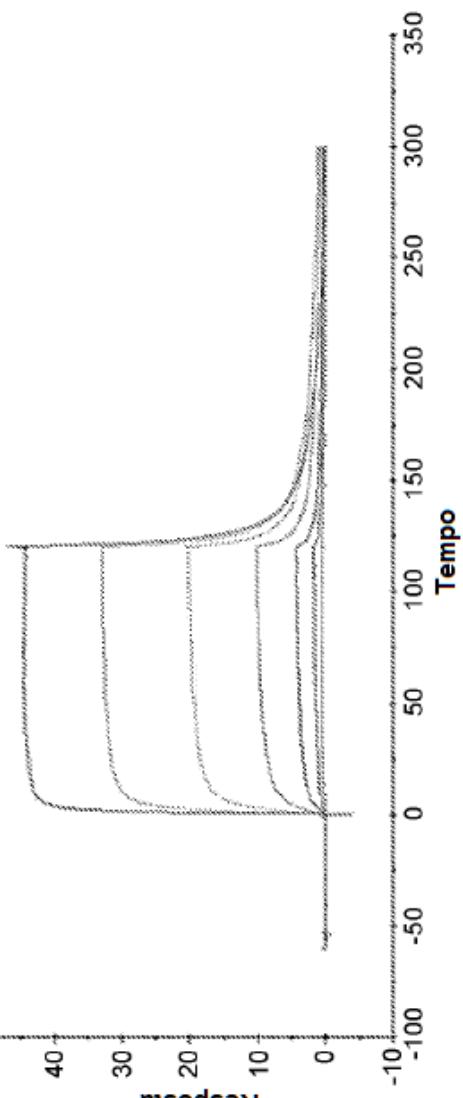
**FIG. 4C**



**FIG. 5A**  
**Sensorgrama de ligação Fc<sub>Y</sub>RIIIa (v158) a Ab-A**  
 Sensorgramas Subtraídos em Branco



**FIG. 5B**  
**Sensorgrama de ligação Fc<sub>Y</sub>RIIIa (v158) a Ab-F**  
 Sensorgramas Subtraídos em Branco



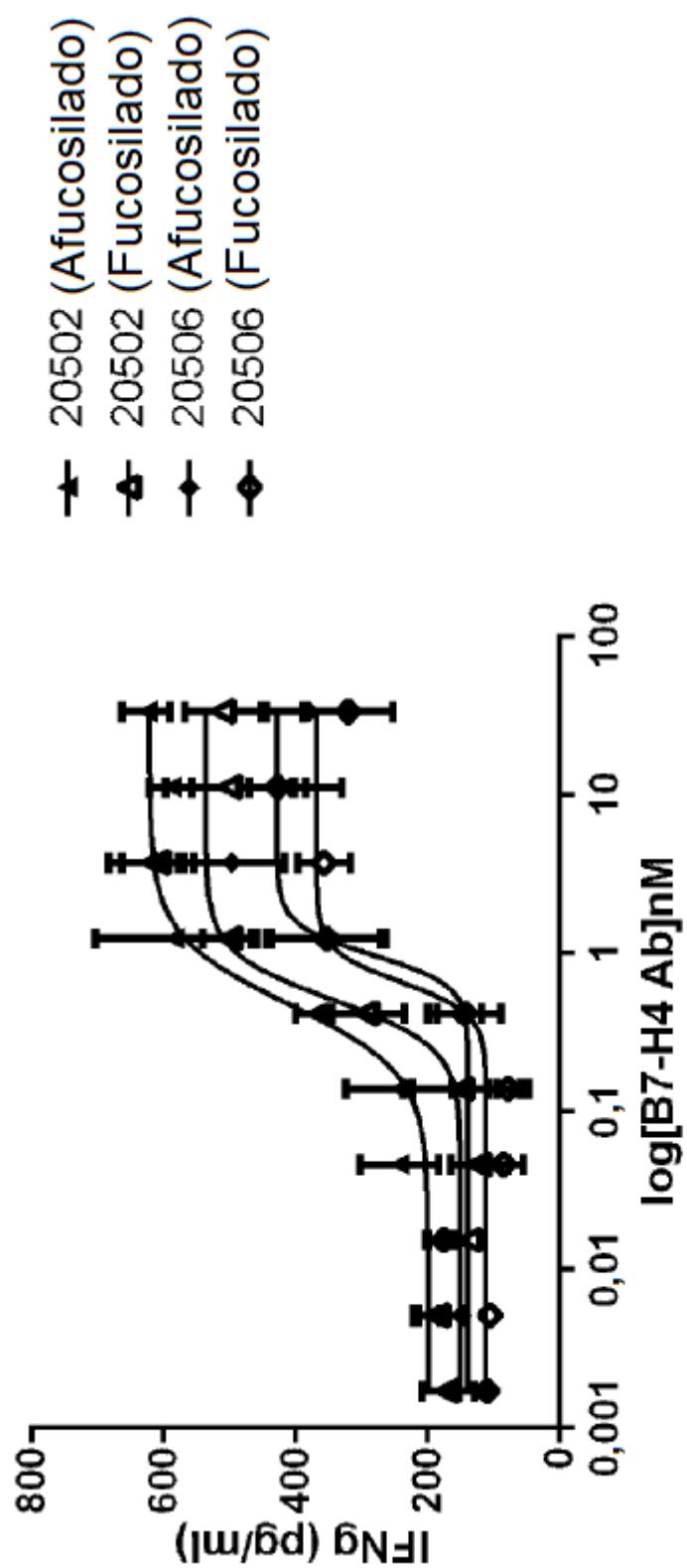


FIG. 6A

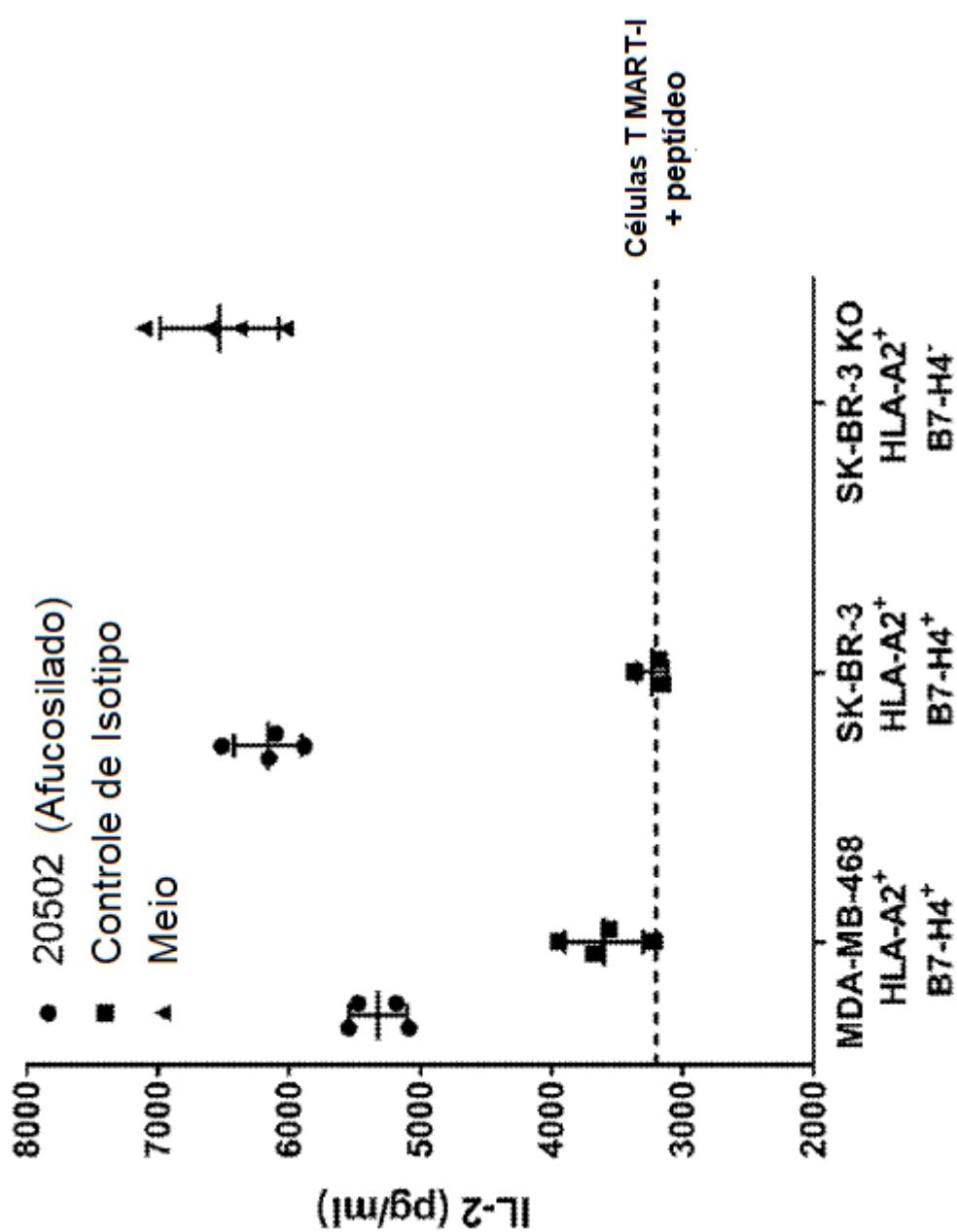
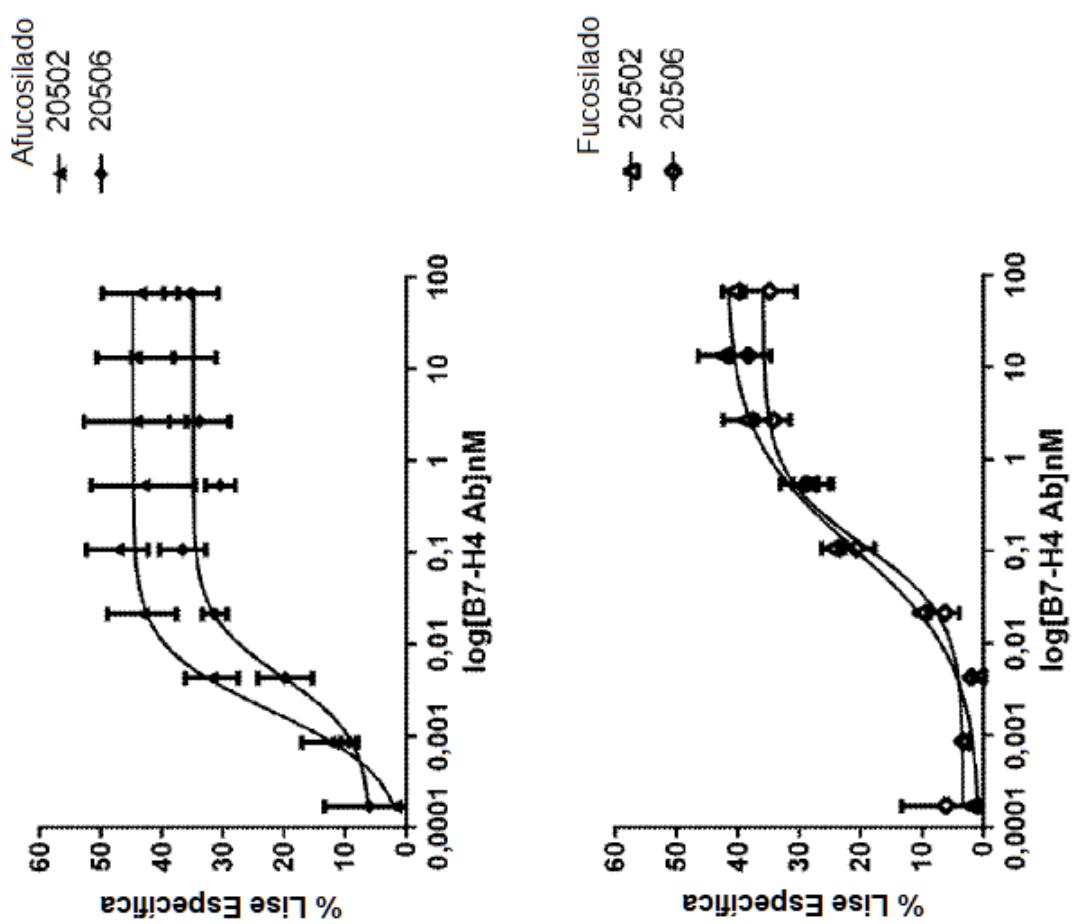
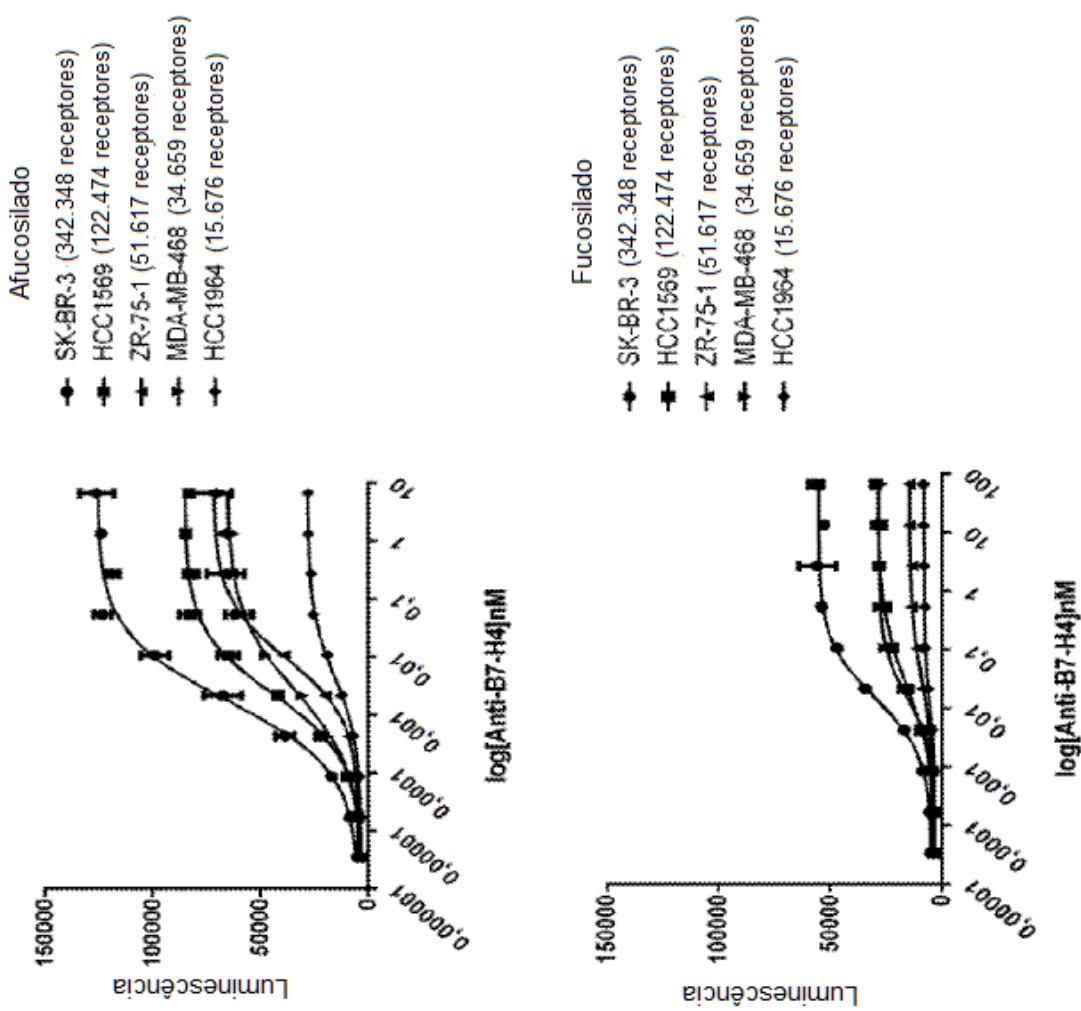
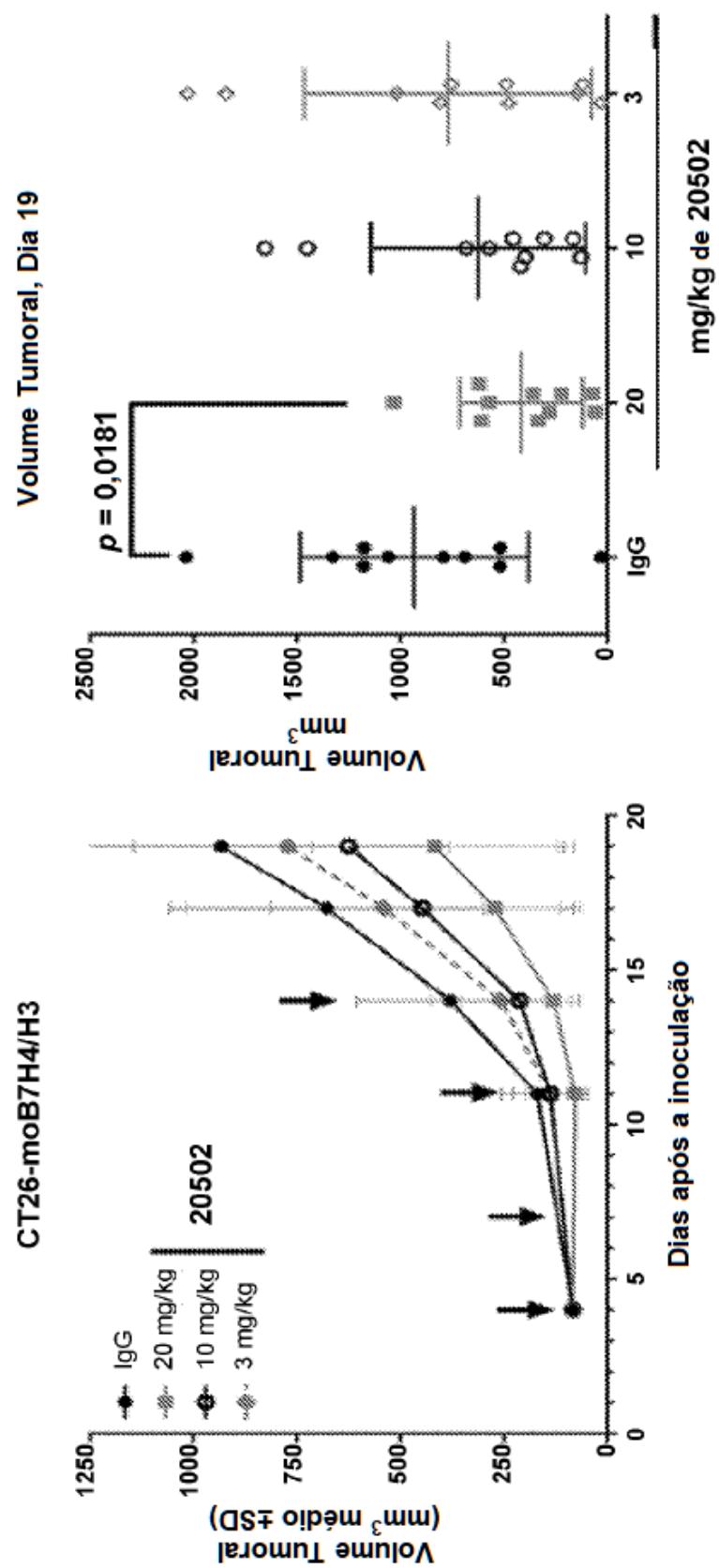
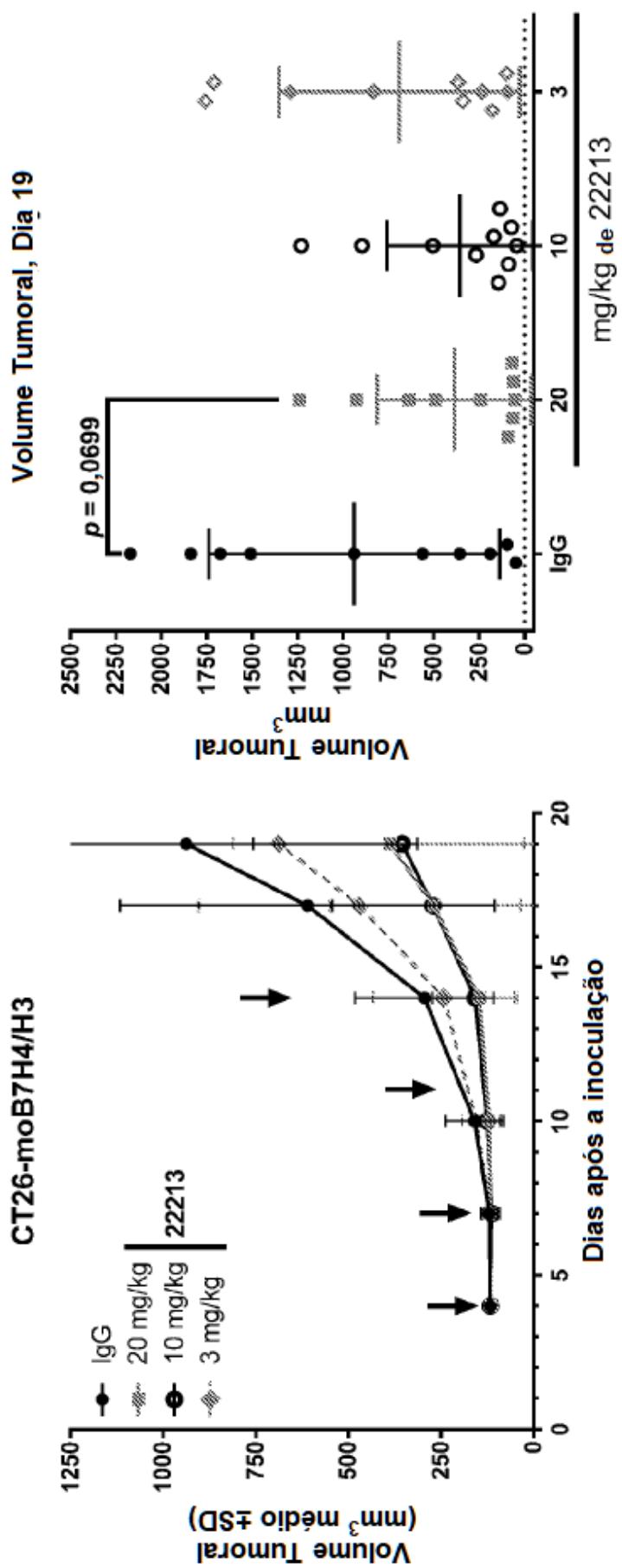


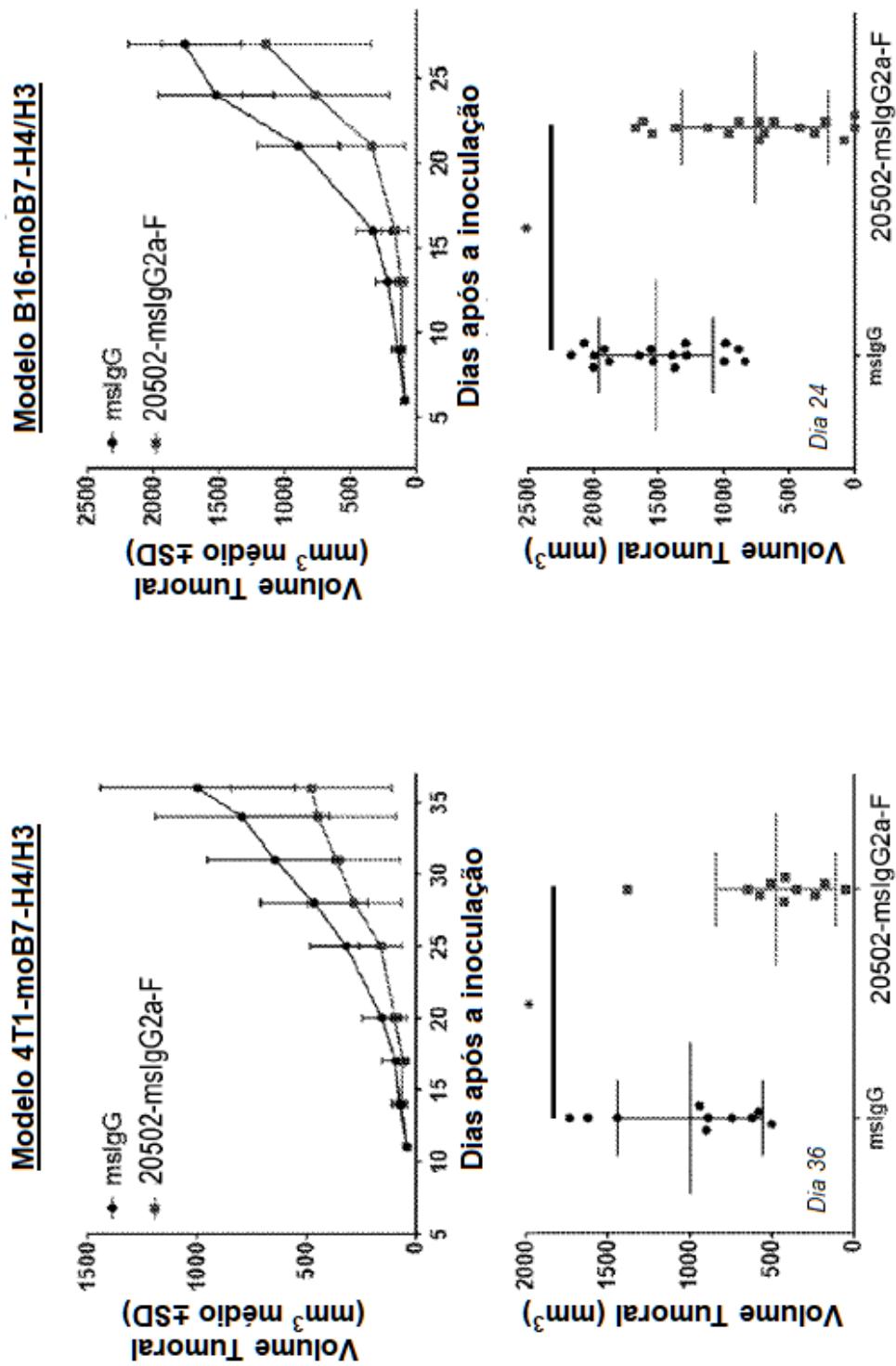
FIG. 6B

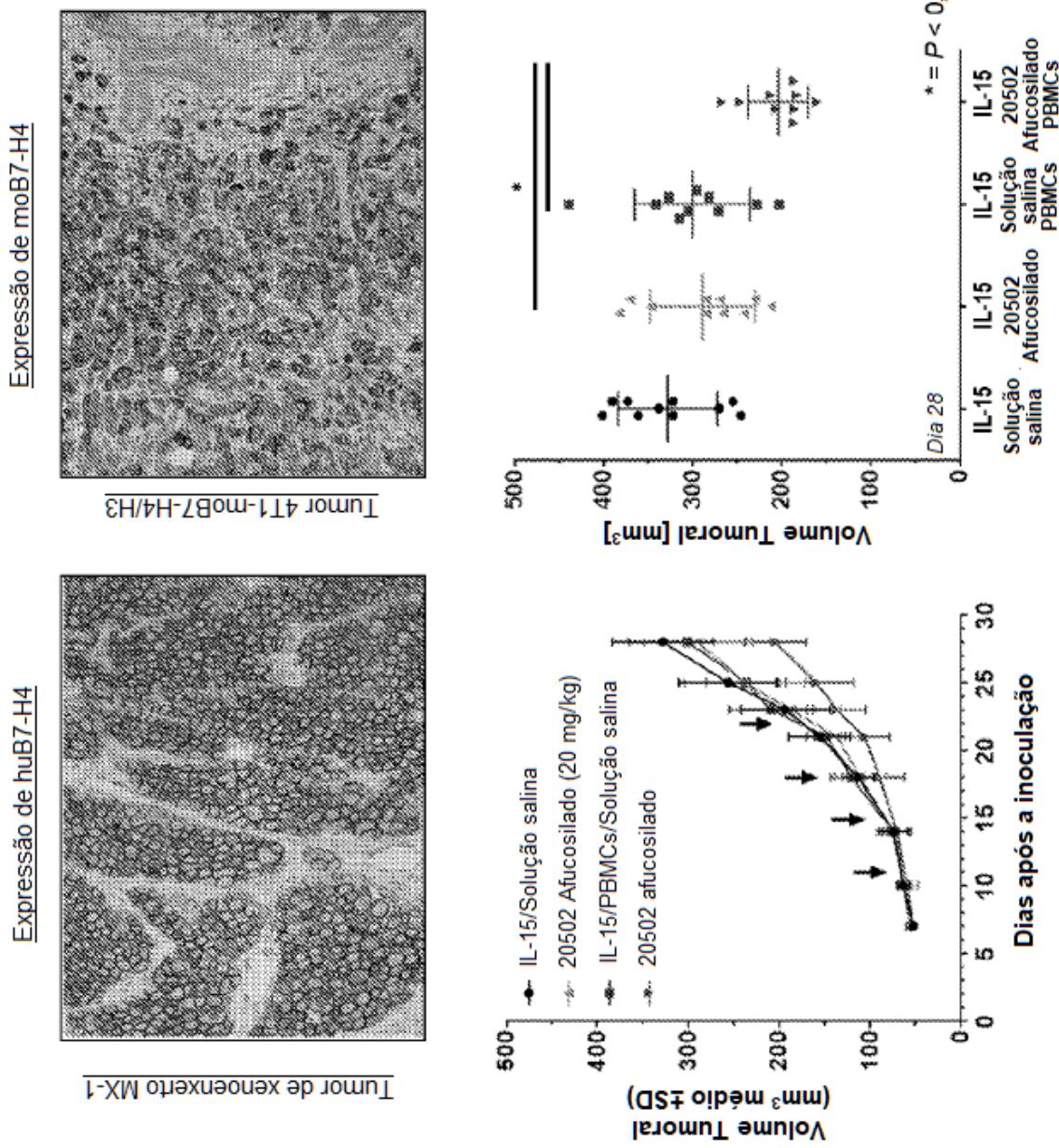
**FIG. 7**

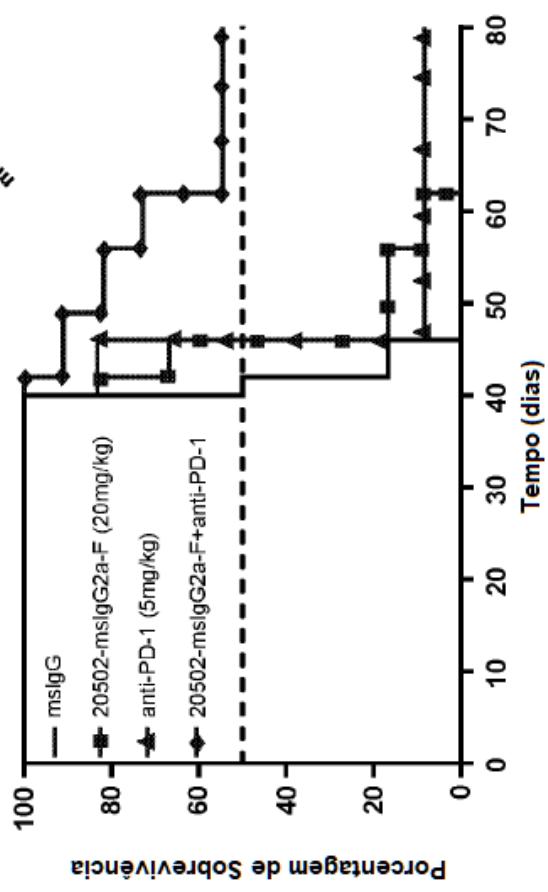
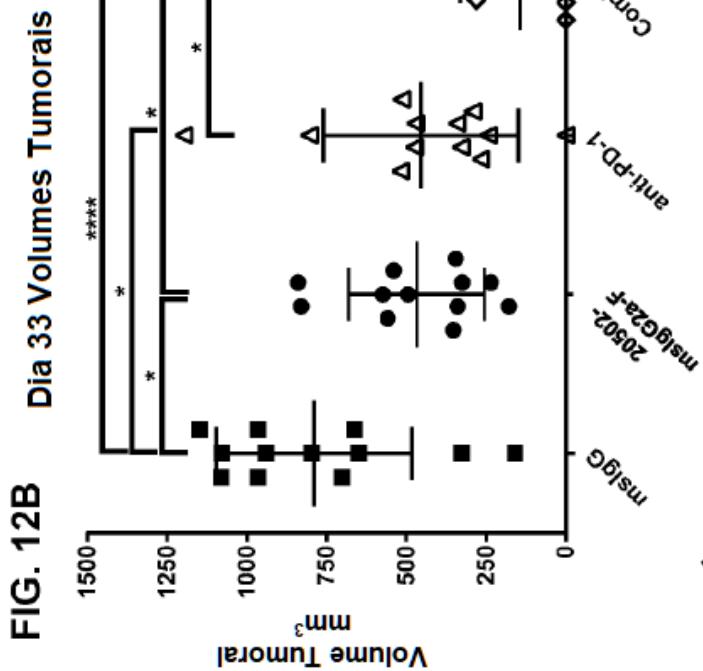
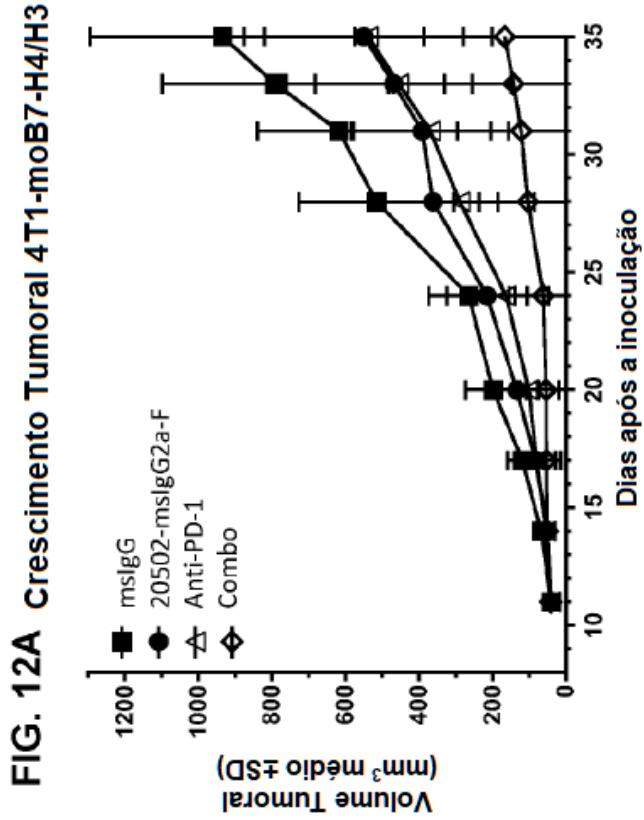
**FIG. 8**

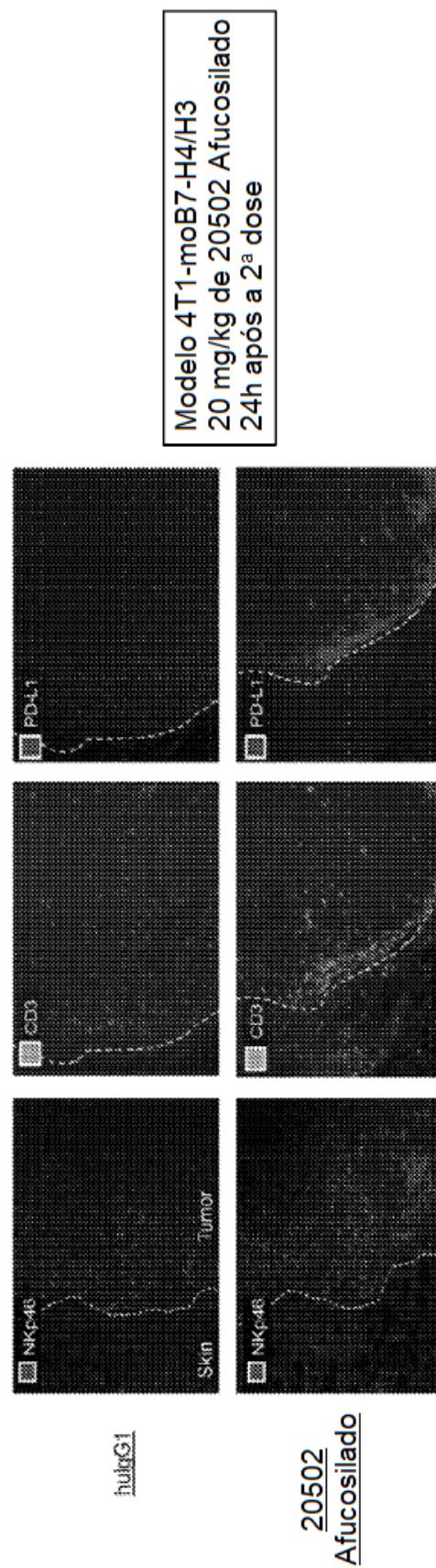
**FIG. 9A**

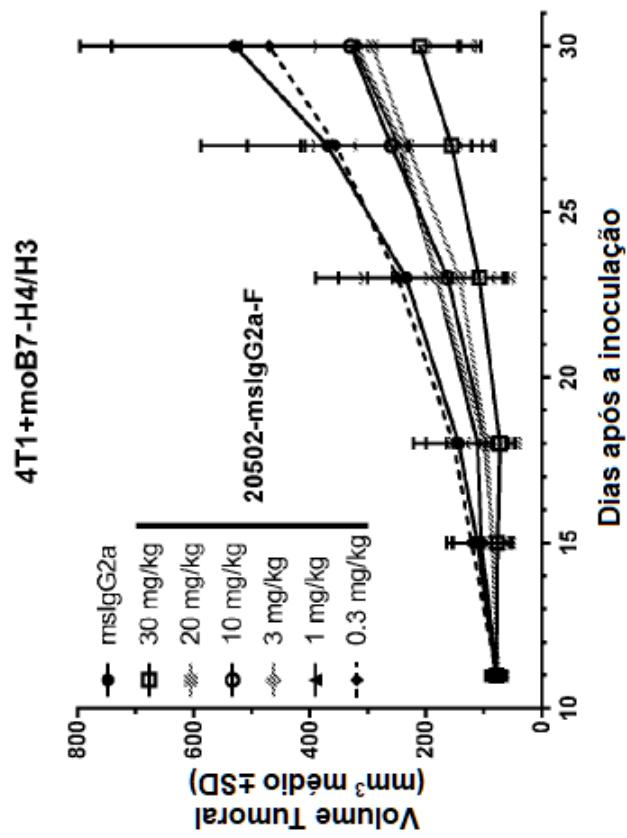
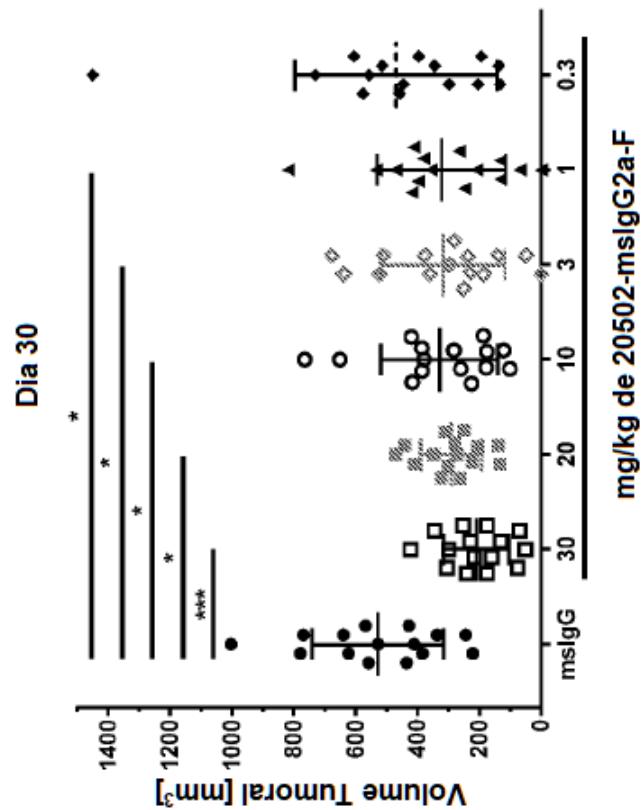
**FIG. 9B**

**FIG. 10**





**FIG. 13**

**FIG. 14A****FIG. 14B**

Dia 30

\*

\*

\*

\*\*\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

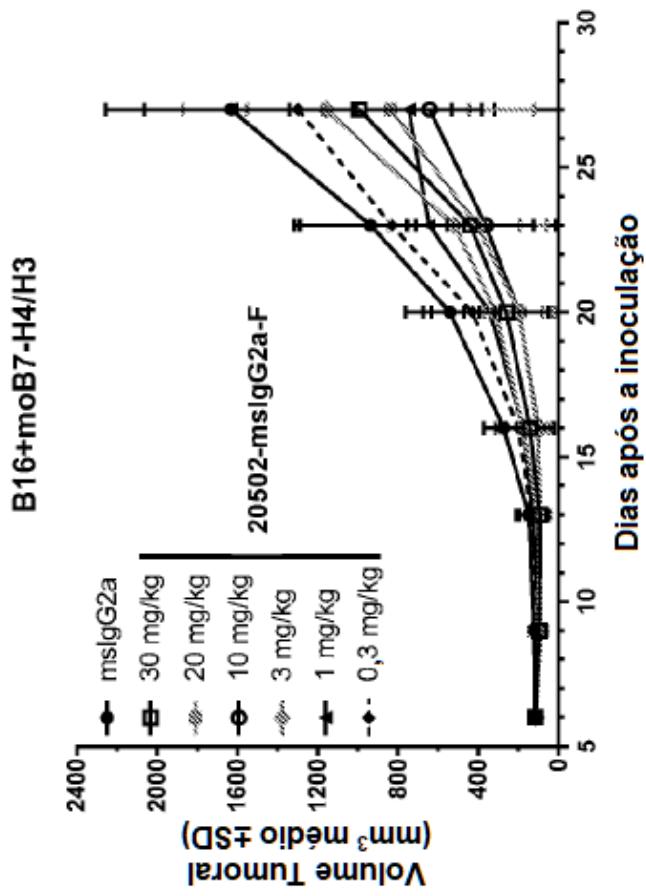
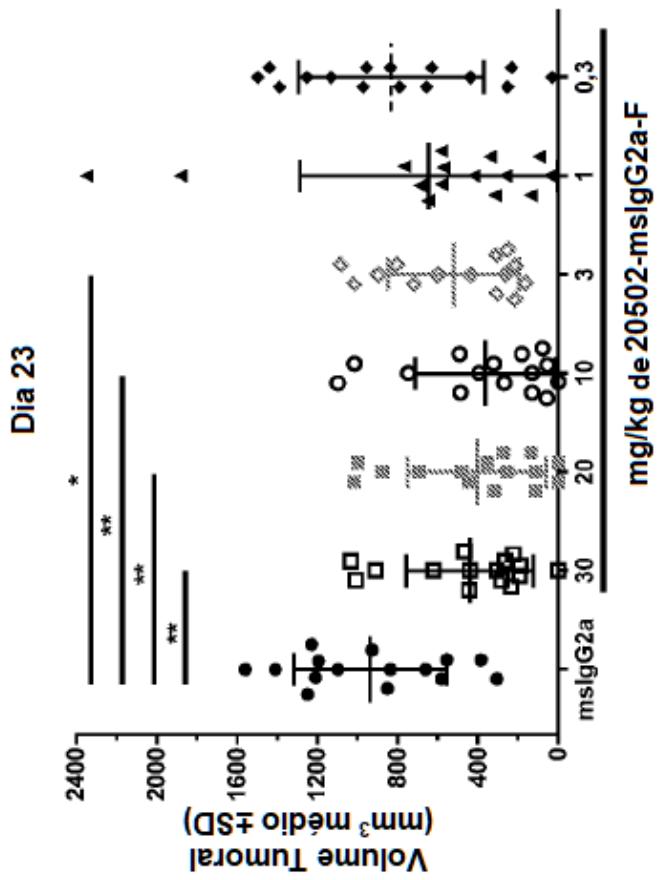
\*

\*

\*

\*

\*

**FIG. 15A****FIG. 15B**

## RESUMO

### **“ANTICORPOS B7-H4 E MÉTODOS DE USO DOS MESMOS”**

A presente divulgação fornece anticorpos e fragmentos de ligação ao antígeno dos mesmos que se ligam especificamente a B7-H4 humano (e opcionalmente B7-H4 de macaco cinomolgo, camundongo e/ou rato) e composições que compreendem tais anticorpos ou fragmentos de ligação ao antígeno dos mesmos. Num aspecto específico, os anticorpos ou fragmentos de ligação ao antígeno do mesmo que se ligam especificamente a B7-H4 humano aumentam a proliferação de célula T, aumentam a produção de interferon gama e/ou esgotam células que expressam B7-H4 por meio de atividade de ADCC. A presente divulgação também fornece métodos para tratar distúrbios, como câncer, administrando-se um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo que se liga especificamente a B7-H4 humano.

Este anexo apresenta o código de controle da listagem de sequências biológicas.

**Código de Controle**

Campo 1



Campo 2



**Outras Informações:**

- Nome do Arquivo: 202000051 3986\_009PC04\_SL\_ST25\_Portuguese.txt
- Data de Geração do Código: 30/10/2020
- Hora de Geração do Código: 13:58:26
- Código de Controle:
  - Campo 1: 62383BB68411BBFD
  - Campo 2: 06DEEA719BFAEE58