

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 980 171**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)
C07K 16/30 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 31/00 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61P 37/02 (2006.01)
C07K 14/705 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **23.01.2019 PCT/US2019/014748**
 87 Fecha y número de publicación internacional: **01.08.2019 WO19147670**
 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.01.2019 E 19743902 (9)**
 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.03.2024 EP 3743447**

54 Título: **Anticuerpos B7-H4 y métodos de uso de los mismos**

30 Prioridad:

23.01.2018 US 201862620545 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
30.09.2024

73 Titular/es:

NEXTCURE, INC. (100.0%)
9000 Virginia Manor Road, Suite 200
Beltsville, MD 20705, US

72 Inventor/es:

LANGERMANN, SOLOMON;
FLIES, DALLAS, BENJAMIN y
LIU, LINDA

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 980 171 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Anticuerpos B7-H4 y métodos de uso de los mismos

5 Referencia cruzada a solicitudes relacionadas

Esta solicitud reivindica el beneficio y la prioridad de la solicitud de patente provisional de EE. UU. n.º 62/620,545 presentada el 23 de enero de 2018.

10 Referencia a un listado de secuencias

El listado de secuencias se presentó originalmente el 23 de enero de 2019 como un archivo de texto denominado "064467.005PCT_seqlist_ST25" creado el 23 de enero de 2019 y con un tamaño de 357 MB.

15 Campo de la invención

En general, la invención se refiere a un anticuerpo anti-B7-H4.

Antecedentes

20 La familia B7 desempeña un papel importante en la regulación positiva y negativa de las respuestas inmunitarias al activar una variedad de receptores en los linfocitos (Rahbar, R. *et al.*, Cancer Immunol Res, 3(2):184-195(2015)). B7-H4 (también conocido como VTCN1 o B7x o B7S1) es un miembro de la familia B7 e inhibe la función de los linfocitos T. También está aumentado en una variedad de tumores y se ha propuesto que promueve el crecimiento tumoral. Se encuentra una alta expresión de B7-H4 en numerosos tejidos tumorales, lo que proporciona una correlación del nivel de expresión en células tumorales con características clínicas y patológicas adversas, incluyendo la agresividad del tumor.

30 La actividad biológica de B7-H4 se ha asociado con una disminución de las respuestas inflamatorias de los linfocitos T CD4⁺ y una correlación entre los macrófagos asociados a tumores que expresan B7-H4 y los linfocitos T reguladores (Treg) FoxP3⁺ dentro del microambiente tumoral. Dado que B7-H4 se expresa en células tumorales y macrófagos asociados a tumores en diversos tipos de cáncer, el bloqueo terapéutico de B7-H4 podría alterar favorablemente el microambiente tumoral permitiendo la eliminación de células tumorales específica de antígeno (Podojil, J. R. y Miller, SD, Immunol Rev, 276(1):40-51 (2017)).

35 Se identificó y clonó ADNc que codifica la proteína B7-H4 humana a partir de ADNc placentario (Sica, G. L. *et al.* (2003) "B7-H4, A Molecule Of The B7 Family, Negatively Regulates T Cell Immunity", Immunity 18:849-861; Zang, X. *et al.* (2003) "B7x: A Widely Expressed B7 Family Member That Inhibits T Cell Activation", Proc. Natl. Acad. Sci. (EE. UU.) 100:10388-10392). B7-H4 se analiza en las patentes de EE. UU. n.º 7,931,896; 7,875,702; 7,847,081; y 40 7,622,565.

Los anticuerpos anti-B7-H4 se divulgan en las patentes de EE. UU. n.º 9,574,000; 7,888,477; 7,737,255; 7,619,068; y 6,962,980.

45 La proteína B7-H4 humana posee 282 residuos de aminoácidos, que se han categorizado como que incluyen un dominio extracelular aminoterminal, un dominio transmembrana hidrófobo grande y un dominio intracelular muy corto (que consiste solo en 2 residuos de aminoácidos). Al igual que otros miembros de la familia B7, B7-H4 posee un par de regiones similares a Ig en su dominio extracelular. La proteína B7-H4 tiene una estructura general de una proteína transmembrana de tipo I. La proteína tiene una homología mínima (aproximadamente el 25 %) con otros miembros de la familia B7 (Zang, X. *et al.* (2003) "B7x: A Widely Expressed B7 Family Member That Inhibits T Cell Activation", Proc. Natl. Acad. Sci. (EE. UU.) 100:10388-10392).

55 B7-H4 también se expresa en macrófagos asociados a tumores (MAT). Los MAT inhiben las respuestas inmunitarias antitumorales mediante la liberación de mediadores humorales y también protegen a los tumores del reconocimiento inmunitario mediante la obstaculización de las respuestas inmunitarias mediadas por células a través de la expresión en la superficie celular de moléculas inhibitoras, tales como B7-H4. Los MAT proceden de macrófagos residentes o de monocitos reclutados por el microambiente tumoral y polarizados en el sitio del tumor. La infiltración tumoral con MAT se ha asociado con una mala supervivencia del paciente y atacar los MAT representa una estrategia prometedora contra el cáncer. Ya se han desarrollado varios enfoques, incluido el agotamiento con liposomas de clodronato; 60 inhibición del reclutamiento de tumores mediante la focalización en CFSR-1 y CCL2; y "reeducación" a través de la activación mediante AcM anti-CD40, o proteína plasmática HRG, o receptor de manosa (Dangai, D. *et al.*, Cancer Res, 73(15): 4820-4829 (2013)).

65 Dado que B7-H4 se expresa en células tumorales y los MAT en varios tipos de cáncer, dirigir terapias contra B7-H4 podría tener enormes resultados sinérgicos al alterar favorablemente el microambiente del tumor y eliminar las células cancerosas. Por lo tanto, existe una necesidad de nuevos inmunomoduladores de B7-H4. Los anticuerpos contra B7-

H4 se han descrito en los documentos WO2016070001, WO2009073533 y Qian (2011); Eur. J. Med. Res. 16(7):295.

Por tanto, las composiciones que inhiben o aumentan la transducción de señales inhibitoras mediadas por B7-H4 para mejorar o promover de ese modo una respuesta inmunitaria mediante la inhibición de la transducción de señales supresoras de B7-H4 podrían ser útiles para el tratamiento del cáncer.

Sumario de la invención

La presente invención proporciona un anticuerpo anti-B7-H4 que comprende:

- (a) una cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEQ ID NO: 63; y
- (b) una cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEQ ID NO: 81.

La presente invención proporciona además una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo anti-B7-H4.

La presente invención también proporciona una secuencia de ácido nucleico o secuencias de ácido nucleico que codifican un anticuerpo de la presente invención.

La presente invención proporciona además un vector que comprende una secuencia de ácido nucleico de la presente invención.

La presente invención también proporciona una célula hospedadora que comprende una secuencia de ácido nucleico o un vector de acuerdo con la presente invención.

Descripción detallada de la invención

La divulgación técnica que se expone a continuación puede, en algunos aspectos, ir más allá del alcance de las reivindicaciones. Los elementos de la divulgación que no entran en el alcance de las reivindicaciones se proporcionan a título informativo. En particular, además del anticuerpo de la invención, como se define en las reivindicaciones, la divulgación proporciona, pero no reivindica, anticuerpos adicionales contra B7-H4.

La presente invención no abarca métodos de tratamiento practicados en el cuerpo humano o animal. Por tanto, la referencia en el presente documento a métodos de tratamiento practicados en el cuerpo humano o animal debe interpretarse como los productos comentados para su uso en dichos métodos.

I. Definiciones

Como se utiliza en el presente documento, se dice que una molécula es capaz de "unirse inmunoespecíficamente" a una segunda molécula si dicha unión muestra la especificidad y afinidad de un anticuerpo por su antígeno afín. Se dice que los anticuerpos son capaces de unirse inmunoespecíficamente a una región o conformación diana ("epitopo") de un antígeno si dicha unión implica el sitio de reconocimiento de antígeno de la molécula de inmunoglobulina. Un anticuerpo que se une inmunoespecíficamente a un antígeno particular puede unirse a otros antígenos con menor afinidad si el otro antígeno tiene alguna secuencia o similitud conformacional que es reconocida por el sitio de reconocimiento de antígeno según lo determinado por, por ejemplo, inmunoensayos, ensayos BIACORE® u otros ensayos conocidos en la materia, pero no se uniría a un antígeno totalmente ajeno. Sin embargo, en algunos casos, los anticuerpos (y sus fragmentos de unión a antígenos) no presentan reacciones cruzadas con otros antígenos. Los anticuerpos también pueden unirse a otras moléculas de una manera que no es inmunoespecífica, tal como, por ejemplo, a los receptores FcR, en virtud de dominios de unión en otras regiones/dominios de la molécula que no implican el sitio de reconocimiento del antígeno, tal como la región Fc.

Como se utiliza en el presente documento, se dice que una molécula "se une fisioespecíficamente" a una segunda molécula si dicha unión muestra la especificidad y afinidad de un receptor por su ligando de unión afín. Una molécula puede ser capaz de unirse fisioespecíficamente a más de una molécula.

Como se utiliza en el presente documento, el término "anticuerpo" pretende indicar una molécula de inmunoglobulina que posee un sitio de reconocimiento de antígeno de "región variable" e incluye fragmentos de anticuerpos de unión a antígeno. El término "región variable" pretende distinguir dicho dominio de la inmunoglobulina de dominios que son ampliamente compartidos por anticuerpos (tales como un dominio Fc de un anticuerpo). La región variable incluye una "región hipervariable" cuyos residuos son responsables de la unión al antígeno. La región hipervariable incluye residuos de aminoácidos de una "región determinante de la complementariedad" o "CDR" (del inglés *Complementarity Determining Region*) (es decir, normalmente en aproximadamente los residuos 24 a 34 (L1), 50 a 56 (L2) y 89 a 97 (L3) en el dominio variable de cadena ligera y en aproximadamente los residuos 27 a 35 (H1), 50 a 65 (H2) y 95 a 102 (H3) en el dominio variable de cadena pesada; Kabat *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5.^a Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)) y/o aquellos residuos de un "bucle hipervariable" (es decir, los residuos 26 a 32 (L1), 50 a 52 (L2) y 91 a 96 (L3) en el dominio variable de cadena ligera y 26 a 32 (H1), 53 a 55 (H2) y 96 a 101 (H3) en el dominio variable de cadena pesada; Chothia y Lesk, 1987, J. Mol.

Biol. 196:901-917). Los residuos de la "región marco conservada" o "FR" son los residuos de dominio variable distintos de los residuos de la región hipervariable como se define en el presente documento. El término anticuerpo incluye anticuerpos monoclonales, anticuerpos multiespecíficos, anticuerpos humanos, anticuerpos humanizados, anticuerpos sintéticos, anticuerpos quiméricos, anticuerpos camelizados (véase, por ejemplo, Muyldermans *et al.*, 2001, Trends Biochem. Sci. 26:230; Nuttall *et al.*, 2000, Cur. Pharm. Biotech. 1:253; Reichmann y Muyldermans, 1999, J. Immunol. Meth. 231:25; las publicaciones internacionales n.º WO 94/04678 y WO 94/25591; las patentes de EE. UU. n.º 6,005,079), Fvs monocatenarios (scFv) (véase, por ejemplo, Pluckthun en The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenberg and Moore eds. Springer-Verlag, Nueva York, págs. 269-315 (1994)), anticuerpos monocatenarios, Fv unidos por enlaces disulfuro (sdFv), intracuerpos, diacuerpos, triacuerpos, tetracuerpos, Bis-scFv, minicuerpos, Fab2, Fab3 y anticuerpos anti-idiotípicos (anti-Id) (incluidos, por ejemplo, anticuerpos anti-Id y anti-anti-Id contra anticuerpos). En particular, dichos anticuerpos incluyen moléculas de inmunoglobulina de cualquier tipo (por ejemplo, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA e IgY), clase (por ejemplo, IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁ e IgA₂) o subclase.

Como se utiliza en el presente documento, la expresión "fragmento de unión a antígeno" de un anticuerpo se refiere a una o más partes de un anticuerpo que contienen las regiones determinantes de la complementariedad ("CDR") del anticuerpo y opcionalmente los residuos estructurales que incluyen el sitio de reconocimiento de antígeno de la "región variable" del anticuerpo, y presentan la capacidad de unirse inmunoespecíficamente al antígeno. Dichos fragmentos incluyen Fab', F(ab')₂, Fv, de cadena sencilla (ScFv) y mutantes de los mismos, variantes de origen natural y proteínas de fusión que incluyen el sitio de reconocimiento de antígeno de la "región variable" del anticuerpo y una proteína heteróloga (por ejemplo, una toxina, un sitio de reconocimiento de antígeno para un antígeno diferente, una enzima, un receptor o ligando de receptor, *etc.*).

Como se utiliza en el presente documento, el término "fragmento" se refiere a un péptido o polipéptido que incluye una secuencia de aminoácidos de al menos 5 residuos de aminoácidos contiguos, al menos 10 residuos de aminoácidos contiguos, al menos 15 residuos de aminoácidos contiguos, al menos 20 residuos de aminoácidos contiguos, al menos 25 residuos de aminoácidos contiguos, al menos 40 residuos de aminoácidos contiguos, al menos 50 residuos de aminoácidos contiguos, al menos 60 residuos de aminoácidos contiguos, al menos 70 residuos de aminoácidos contiguos, al menos 80 residuos de aminoácidos contiguos, al menos 90 residuos de aminoácidos contiguos, al menos 100 residuos de aminoácidos contiguos, al menos 125 residuos de aminoácidos contiguos, al menos 150 residuos de aminoácidos contiguos, al menos 175 residuos de aminoácidos contiguos, al menos 200 residuos de aminoácidos contiguos o al menos 250 residuos de aminoácidos contiguos.

Como se utiliza en el presente documento, el término "modular" se refiere a la capacidad de alterar un efecto, resultado o actividad (por ejemplo, transducción de señales). Dicha modulación puede ser agonista o antagonista. La modulación antagonista puede ser parcial (es decir, atenuar, pero no abolir) o puede abolir completamente dicha actividad (por ejemplo, neutralizar). La modulación puede incluir la internalización de un receptor después de la unión de un anticuerpo o una reducción en la expresión de un receptor en la célula diana. La modulación agonística puede mejorar o aumentar o potenciar de otro modo una actividad (por ejemplo, transducción de señales). Dicha modulación puede alterar la naturaleza de la interacción entre un ligando y su receptor afin para alterar la naturaleza de la transducción de señales provocada. Por ejemplo, las moléculas pueden, mediante la unión al ligando o al receptor, alterar la capacidad de dichas moléculas para unirse a otros ligandos o receptores y, por lo tanto, alterar su actividad general. Dicha modulación también puede proporcionar al menos un cambio del 10 % en la actividad medible del sistema inmunitario, al menos un cambio del 50 % en dicha actividad, o al menos un cambio de 2 veces, 5 veces, 10 veces o al menos 100 veces en dicha actividad.

El término "sustancialmente", como se utiliza en el contexto del efecto de unión o presentado, pretende indicar que el efecto observado es fisiológica o terapéuticamente importante. Por lo tanto, por ejemplo, una molécula es capaz de bloquear sustancialmente la actividad de un ligando o receptor si el grado de bloqueo es fisiológica o terapéuticamente importante (por ejemplo, si dicho grado es superior al 60 % completo, superior al 70 % completo, superior al 75 % completo, superior al 80 % completo, superior al 85 % completo, superior al 90 % completo, superior al 95 % completo o superior al 97 % completo). De forma similar, se dice que una molécula tiene sustancialmente la misma inmunoespecificidad y/o característica que otra molécula, si dichas inmunoespecificidades y características son más del 60 % idénticas, más del 70 % idénticas, más del 75 % idénticas, más del 80 % idénticas, más del 85 % idénticas, más del 90 % idénticas, más del 95 % idénticas o más del 97 % idénticas).

Como se utiliza en el presente documento, las señales "coestimuladoras" abarcan señales coestimuladoras positivas (por ejemplo, señales que dan como resultado la mejora de una actividad) y señales coestimuladoras negativas (por ejemplo, señales que dan como resultado la inhibición de una actividad).

El término "derivado" se refiere a un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une inmunoespecíficamente a la misma diana de un anticuerpo original o de referencia, pero que difiere en la secuencia de aminoácidos del anticuerpo original o de referencia o fragmento de unión a antígeno del mismo al incluir una, dos, tres, cuatro, cinco o más sustituciones, adiciones, eliminaciones o modificaciones de aminoácidos respecto al anticuerpo original o de referencia o fragmento de unión a antígeno del mismo. Dichos derivados pueden tener sustancialmente la misma inmunoespecificidad y/o características, o la misma inmunoespecificidad y características que el anticuerpo original o de referencia o fragmento de unión a antígeno del mismo. Las sustituciones o adiciones

de aminoácidos de dichos derivados pueden incluir residuos de aminoácidos de origen natural (*es decir*, codificados por ADN) o de origen no natural. El término "derivado" abarca, por ejemplo, variantes quiméricas o humanizadas, así como variantes que tienen regiones CH1, bisagra, CH2, CH3 o CH4 alteradas, para formar, por ejemplo, anticuerpos, *etc.*, que tienen regiones Fc variantes que presentan características efectoras o de unión mejoradas o deterioradas.

5 Como se utiliza en el presente documento, un "anticuerpo quimérico" es una molécula en la que diferentes partes del anticuerpo proceden de diferentes moléculas de inmunoglobulina, tal como pueden ser anticuerpos que tengan una región variable procedente de un anticuerpo no humano y una región constante de inmunoglobulina humana.

10 Como se utiliza en el presente documento, el término "anticuerpo humanizado" se refiere a una inmunoglobulina que incluye una región marco conservada humana y una o más CDR de una inmunoglobulina no humana (habitualmente una de ratón o rata). La inmunoglobulina no humana que proporciona las CDR se denomina "donante" y la inmunoglobulina humana que proporciona la región marco se denomina "aceptadora". No es necesario que estén presentes las regiones constantes, pero en caso de haberlas, pueden ser sustancialmente idénticas a las regiones constantes de la inmunoglobulina humana, es decir, al menos aproximadamente de un 85 a un 99 %, o aproximadamente un 95 % o más idénticas. Por tanto, todas las partes de una inmunoglobulina humanizada, excepto posiblemente las CDR, son sustancialmente idénticas a las partes correspondientes de secuencias de inmunoglobulinas humanas naturales. Un anticuerpo humanizado es un anticuerpo que incluye una inmunoglobulina de cadena ligera humanizada y cadena pesada humanizada. Por ejemplo, un anticuerpo humanizado no abarcaría un anticuerpo quimérico clásico, porque, por ejemplo, toda la región variable de un anticuerpo quimérico no es humana.

La expresión "concentración endógena" se refiere al nivel al que una célula expresa de forma nativa una molécula (*es decir*, en ausencia de vectores de expresión o promotores recombinantes) (célula que puede ser una célula normal, una célula cancerosa o una célula infectada).

25 Como se utiliza en el presente documento, los términos "tratar", "que trata", "tratamiento" y "uso terapéutico" se refieren a la eliminación, reducción o mejora de uno o más síntomas de una enfermedad o trastorno. Como se utiliza en el presente documento, una "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a esa cantidad de un agente terapéutico suficiente para mediar una eliminación, reducción o mejora clínicamente importante de dichos síntomas. Un efecto es clínicamente importante si su magnitud es suficiente para influir en la salud o el pronóstico de un sujeto receptor. Una cantidad terapéuticamente eficaz puede referirse a la cantidad de agente terapéutico suficiente para retardar o reducir al mínimo el inicio de la enfermedad, por ejemplo, retardar o reducir al mínimo la propagación del cáncer. Una cantidad terapéuticamente eficaz también puede referirse a la cantidad de agente terapéutico que proporciona un beneficio terapéutico en el tratamiento o control de una enfermedad.

35 Como se utiliza en el presente documento, el término "agente profiláctico" se refiere a un agente que se puede utilizar en la prevención de un trastorno o enfermedad antes de la detección de cualquier síntoma de dicho trastorno o enfermedad. Una cantidad "profilácticamente eficaz" es la cantidad de agente profiláctico suficiente para mediar dicha protección. Una cantidad profilácticamente eficaz también puede referirse a la cantidad del agente profiláctico que proporcione un beneficio profiláctico para la prevención de una enfermedad.

45 Como se utiliza en el presente documento, el término "cáncer" se refiere a una neoplasia o a un tumor resultante del crecimiento no controlado y anómalo de las células. Como se utiliza en el presente documento, el cáncer incluye explícitamente leucemias y linfomas. El término "cáncer" se refiere a una enfermedad que implica células que tienen el potencial de metastatizarse en sitios distales y presentan rasgos fenotípicos que difieren de los de las células no cancerosas, por ejemplo, formación de colonias en un sustrato tridimensional, tal como agar blando, o la formación de redes tubulares o matrices en forma de red en una membrana basal tridimensional o preparación de matriz extracelular. Las células no cancerosas no forman colonias en agar blando ni forman estructuras distintas en forma de esferas en preparaciones de membrana basal tridimensional o de matriz extracelular.

50 Como se utiliza en el presente documento, una "célula inmunitaria" se refiere a cualquier célula de origen hematopoyético, incluidos, pero sin limitación, linfocitos T, linfocitos B, monocitos, células dendríticas y macrófagos.

55 Como se utiliza en el presente documento, "moléculas inflamatorias" se refieren a moléculas que dan como resultado respuestas inflamatorias que incluyen, pero sin limitación, citocinas y metaloproteasas, tales como, pero sin limitación, IL-1 β , TNF- α , TGF- β , IFN- γ , IL-18, IL-17, IL-6, IL-23, IL-22, IL-21 y MMP.

Como se utiliza en el presente documento, "valencia" se refiere al número de sitios de unión disponibles por molécula.

60 Como se utiliza en el presente documento, los términos respuesta "inmunológica" o "inmunitaria" es el desarrollo de una respuesta humoral (mediada por anticuerpos) y/o celular (mediada por linfocitos T específicos de antígeno o sus productos de secreción) beneficiosa dirigida contra un péptido en un paciente receptor. Dicha respuesta puede ser una respuesta activa inducida por la administración de inmunógeno o una respuesta pasiva inducida por la administración de anticuerpos o linfocitos T cebados. Se provoca una respuesta inmunitaria celular mediante la presentación de epítomos polipeptídicos en asociación con moléculas MHC de clase I o clase II para activar los linfocitos T colaboradores CD4⁺ específicos de antígeno y/o linfocitos T citotóxicos CD8⁺. La respuesta también puede

implicar la activación de monocitos, macrófagos, células NK, basófilos, células dendríticas, astrocitos, células de la microglía, eosinófilos, activación o reclutamiento de neutrófilos u otros componentes de la inmunidad innata. La presencia de una respuesta inmunitaria mediada por células se puede determinar mediante ensayos de proliferación (linfocitos T CD4⁺) o ensayos de LTC (linfocitos T citotóxicos). Las contribuciones relativas de las respuestas humorales y celulares al efecto protector o terapéutico de un inmunógeno se pueden distinguir mediante el aislamiento por separado de anticuerpos y linfocitos T de un animal singénico inmunizado y la medición del efecto protector o terapéutico en un segundo sujeto.

Un "agente inmunogénico" o "inmunógeno" es capaz de inducir una respuesta inmunitaria contra sí mismo tras su administración a un mamífero, opcionalmente junto con un adyuvante.

Como se utiliza en el presente documento, los términos "individuo", "hospedador", "sujeto", y "paciente" se utilizan indistintamente en el presente documento, y se refieren a un mamífero, que incluye, pero sin limitación, seres humanos, roedores, tales como ratones y ratas, y otros animales de laboratorio.

Como se utiliza en el presente documento, el término "polipéptido" se refiere a una cadena de aminoácidos de cualquier longitud, independientemente de la modificación (por ejemplo, fosforilación o glucosilación). El término polipéptido incluye proteínas y fragmentos de las mismas. Los polipéptidos pueden ser "exógenos", lo que significa que son "heterólogos", es decir, extraño a la célula hospedadora que se utiliza, tal como el polipéptido humano producido por una célula bacteriana. Los polipéptidos se divulgan en el presente documento como secuencias de residuos de aminoácidos. Esas secuencias se escriben de izquierda a derecha en la dirección del extremo N al C. De acuerdo con la nomenclatura convencional, las secuencias de residuos de aminoácidos se denominan mediante un código de tres letras o de una sola letra, como se indica a continuación: alanina (Ala, A), arginina (Arg, R), asparagina (Asn, N), ácido aspártico (Asp, D), cisteína (Cys, C), glutamina (Gln, Q), ácido glutámico (Glu, E), glicina (Gly, G), histidina (His, H), isoleucina (Ile, I), leucina (Leu, L), lisina (Lys, K), metionina (Met, M), fenilalanina (Phe, F), prolina (Pro, P), serina (Ser, S), treonina (Thr, T), triptófano (Trp, W), tirosina (Tyr, Y) y valina (Val, V).

Como se utiliza en el presente documento, el término "variante" se refiere a un polipéptido o polinucleótido que difiere de un polipéptido o polinucleótido de referencia, pero conserva propiedades esenciales. Una variante clásica de un polipéptido difiere de otro polipéptido de referencia en la secuencia de aminoácidos. En general, las diferencias son limitadas de modo que las secuencias del polipéptido de referencia y la variante son muy similares en general y, en muchas regiones, idénticas. Una variante y un polipéptido de referencia pueden diferir en la secuencia de aminoácidos por una o más modificaciones (por ejemplo, sustituciones, adiciones y/o eliminaciones). Un residuo de aminoácido sustituido o insertado puede o no estar codificado por el código genético. Una variante de un polipéptido puede ser de origen natural, tal como una variante alélica, o puede ser una variante que no se sabe que se produzca de forma natural.

Se pueden hacer modificaciones y cambios en la estructura de los polipéptidos de la divulgación y aún obtener una molécula que tenga características similares al polipéptido (por ejemplo, una sustitución de aminoácidos conservadora). Por ejemplo, determinados aminoácidos pueden estar sustituidos por otros aminoácidos en una secuencia sin pérdida apreciable de actividad. Debido a que es la capacidad interactiva y la naturaleza de un polipéptido lo que define la actividad funcional biológica de ese polipéptido, se pueden realizar determinadas sustituciones de la secuencia de aminoácidos en una secuencia de polipéptidos y, sin embargo, obtener un polipéptido con propiedades similares.

Al realizar dichos cambios, puede tenerse en consideración el índice hidropático de los aminoácidos. En general, se entiende en la materia la importancia del índice hidropático de los aminoácidos a la hora de conferir una función biológica interactiva a un polipéptido. Se sabe que ciertos aminoácidos pueden sustituirse por otros aminoácidos que tienen un índice o puntuación hidropática similar y aún dan como resultado un polipéptido con una actividad biológica similar. A cada aminoácido se le ha asignado un índice hidropático basándose en sus características de hidrofobia y carga. Estos índices son: isoleucina (+4,5); valina (+4,2); leucina (+3,8); fenilalanina (+2,8); cisteína/cistina (+2,5); metionina (+1,9); alanina (+1,8); glicina (-0,4); treonina (-0,7); serina (-0,8); triptófano (-0,9); tirosina (-1,3); prolina (-1,6); histidina (-3,2); glutamato (-3,5); glutamina (-3,5); aspartato (-3,5); asparagina (-3,5); lisina (-3,9); y arginina (-4,5).

Se cree que el carácter hidropático relativo del aminoácido determina la estructura secundaria del polipéptido resultante, lo que, a su vez, define la interacción del polipéptido con otras moléculas, tales como enzimas, sustratos, receptores, anticuerpos, antígenos y cofactores. En la materia se sabe que un aminoácido puede estar sustituido con otro aminoácido que tiene un índice hidropático similar y todavía obtener un polipéptido funcionalmente equivalente. En dichos cambios, se prefiere la sustitución de aminoácidos cuyos índices hidropáticos se encuentran en ± 2 , en particular se prefieren los que se encuentran en ± 1 e incluso de manera más particular se prefieren los que se encuentran en $\pm 0,5$.

La sustitución de aminoácidos similares también se puede hacer basándose en la hidrofilia, en particular, cuando el polipéptido o péptido equivalente funcional biológico creado de este modo está destinado para su uso en aplicaciones inmunológicas. Se han asignado a los residuos de aminoácido los siguientes valores de hidrofilia: arginina (+3,0); lisina

(+3,0); aspartato (+3,0 ± 1); glutamato (+3,0 ± 1); serina (+0,3); asparagina (+0,2); glutamina (+0,2); glicina (0); prolina (-0,5 ± 1); treonina (-0,4); alanina (-0,5); histidina (-0,5); cisteína (-1,0); metionina (-1,3); valina (-1,5); leucina (-1,8); isoleucina (-1,8); tirosina (-2,3); fenilalanina (-2,5); triptófano (-3,4). Se entiende que un aminoácido se puede sustituir por otro que tenga un valor de hidrofilia similar y obtener aún un polipéptido biológicamente equivalente y, en particular, inmunológicamente equivalente. En dichos cambios, se prefiere la sustitución de aminoácidos cuyos valores de hidrofilia se encuentren en ± 2, en particular se prefieren los que se encuentran en ± 1 e incluso de manera más particular se prefieren los que se encuentran en ± 0,5.

Como se ha expuesto anteriormente, las sustituciones de aminoácidos se basan, en general, en la similitud relativa de los sustituyentes de cadena lateral de los aminoácidos, por ejemplo, su hidrofobia, hidrofilia, carga, tamaño y similares. Sustituciones ilustrativas que toman en consideración varias de las características anteriores son bien conocidas por los expertos en la materia e incluyen (residuo original: sustitución ilustrativa): (Ala: Gly, Ser), (Arg: Lys), (Asn: Gln, His), (Asp: Glu, Cys, Ser), (Gln: Asn), (Glu: Asp), (Gly: Ala), (His: Asn, Gln), (Ile: Leu, Val), (Leu: Ile, Val), (Lys: Arg), (Met: Leu, Tyr), (Ser: Thr), (Thr: Ser), (Trp: Tyr), (Tyr: Trp, Phe) y (Val: Ile, Leu). La expresión "porcentaje (%) de identidad de secuencia" se define como el porcentaje de nucleótidos o aminoácidos en una secuencia candidata que son idénticos a los nucleótidos o aminoácidos en una secuencia de ácido nucleico de referencia, después de alinear las secuencias e introducir huecos, si fuera necesario, para lograr el máximo porcentaje de identidad de secuencia. La alineación con el fin de determinar el porcentaje de identidad de secuencia puede lograrse de varias maneras que se encuentran dentro de las capacidades de la materia, por ejemplo, usando programas informáticos disponibles al público, tales como BLAST, BLAST-2, ALIGN, ALIGN-2 o Megalign (DNASTAR). Los parámetros adecuados para medir la alineación, incluyendo cualquier algoritmo necesario para conseguir la alineación máxima sobre toda la longitud de las secuencias que se comparan, se pueden determinar mediante métodos conocidos.

A efectos del presente documento, el % de identidad de secuencia de una determinada secuencia de nucleótidos o aminoácidos C a, con, o contra, una determinada secuencia de ácido nucleico D (que, de manera alternativa, se puede expresar como una determinada secuencia C que tiene o comprende un cierto % de identidad de secuencia a, con o en contra de una determinada secuencia D) se calcula de la siguiente manera:

$$100 \text{ veces la fracción } W/Z,$$

donde W es el número de nucleótidos o aminoácidos puntuados como coincidencias idénticas por el programa de alineación de secuencias en el alineamiento de C y D de ese programa, y donde Z es el número total de nucleótidos o aminoácidos en D. Se apreciará que cuando la longitud de la secuencia C no es igual a la longitud de la secuencia D, el % de identidad de secuencia de C a D no será igual al % de identidad de secuencia de D a C.

Como se utiliza en el presente documento, la expresión "vehículo farmacéuticamente aceptable" abarca cualquiera de los vehículos farmacéuticos convencionales, tales como solución salina tamponada con fosfato, agua y emulsiones, tales como una emulsión de aceite/agua o de agua/aceite, y diversos tipos de agentes humectantes.

II. Composiciones

Los niveles elevados de expresión de B7-H4 encontrados en numerosos tejidos tumorales, por ejemplo, cánceres de ovario humano, apuntan a un papel clave para B7-H4 en la mediación de la supresión inmunitaria. Asimismo, se ha descubierto que los macrófagos asociados a tumores (MAT) que expresan B7-H4 suprimen la inmunidad de los linfocitos T específicos del antígeno asociado a tumores (Kryczek, I. *et al.* (2006) "B7-H4 Expression Identifies A Novel Suppressive Macrophage Population In Human Ovarian Carcinoma", J. Exp. Med. 203(4):871-881). La intensidad de la expresión de B7-H4 en MAT se correlaciona significativamente con el número de linfocitos Treg en el tumor. Además, B7-H4 expresado en MAT, se asocia con malos resultados para los pacientes (Kryczek, I. *et al.* (2006) "B7-H4 Expression Identifies A Novel Suppressive Macrophage Population In Human Ovarian Carcinoma", J. Exp. Med. 203(4):871-881). Además, B7-H4 se puede expresar en células mielógenas supresoras (CMS), donde puede ejercer un efecto inmunosupresor en infecciones víricas (Garg, A. *et al.* (2017) "Human Immunodeficiency Virus Type-1 Myeloid Derived Suppressor Cells Inhibit Cytomegalovirus Inflammation through Interleukin-27 and B7-H4" Sci. Rep. Mar 24;7:44485). Mientras que en un estudio de cáncer de útero, la expresión de B7-H4 en el microambiente tumoral se asoció con una mayor infiltración de CMS (Vanderstraeten, A. *et al.* (2014) "Mapping the immunosuppressive environment in uterine tumors: implications for immunotherapy", Cancer Immunol. Immunother. Jun;63(6):545-57). Por tanto, B7-H4 puede expresarse en células tumorales, MAT y/o CMS donde puede ejercer señalización inmunosupresora en el cáncer.

Los neutrófilos son un componente importante de la defensa innata del hospedador contra las infecciones y también contribuyen a la patogenia autoinmunitaria y la inflamación crónica. Durante la infección, los neutrófilos migran rápidamente a los sitios de inflamación, se activan e inician una cascada de mecanismos de defensa que incluyen la fagocitosis, destrucción y degradación de microorganismos mediante proteínas antimicrobianas y proteolíticas, junto con la generación de especies reactivas del oxígeno. Los neutrófilos también participan en la descomposición de los tejidos, la remodelación, la cicatrización de heridas y la modulación de otros componentes inmunitarios inflamatorios y adaptativos. Debido a su vida útil corta, los neutrófilos deben reabastecerse continuamente durante la infección y la inflamación mediante la expansión de las células progenitoras mieloides en la médula ósea. *In vitro*, B7-H4 inhibe el

crecimiento de progenitores de neutrófilos procedentes de la médula ósea, lo que sugiere una función inhibidora de B7-H4 en la expansión de neutrófilos (Zhu, G. *et al.*, Blood, 113:1759-1767 (2009)). Por lo tanto, son deseables composiciones que modulen la transducción de señales B7-H4.

5 **III. Secuencias de B7-H4**

Los polipéptidos B7-H4 pueden incluir una secuencia de aminoácidos de B7-H4 de longitud completa, o un fragmento o variante de la misma, o una proteína de fusión de la misma.

10 Proteínas B7-H4 humanas o polipéptidos de las mismas. Las secuencias de B7-H4 humana son conocidas en la materia. Por ejemplo, una secuencia consenso para B7-H4 es

```

1  MASLGQILFW SIISIIIIILA GAIALIIGFG ISGRHSITVT TVASAGNIGE DGILSCTFEP
61 DIKLSDIVIQ WLKEGVLGLV HEFKEGKDEL SEQDEMFRGR TAVFADQVIV GNASLRLKNV
121 QLTDAGTYKC YIITSKGKGN ANLEYKTGAF SMPEVNVVDYN ASSETLRCEA PRWFPQPTVV
181 WASQVDQGAN FSEVSNTSFE LNSENVTMKW VSVLYNVTIN NTYSCMIEND IAKATGDIKV
241 TESEIKRRSH LQLLNSKASL CVSSFFAISW ALLPLSPYLM LK
    
```

15 (SEQ ID NO: 1, Q7Z7D3 (VTCN1_HUMANA)), donde los aminoácidos 1-27 son una secuencia señal (subrayada de acuerdo con la publicación de patente de EE. UU. n.º 2016/0039905). Sica *et al.* indicó que los aminoácidos 1-20 comprenden la secuencia señal. El número de registro de UniProtKB Q7Z7D3 indica que el dominio extracelular incluye los aminoácidos 25-259.

20 Las secuencias para B7-H4 de ratón se conocen en la materia. Por ejemplo, una secuencia consenso para B7-H4 de ratón es

```

MASLGQIIFWSIINI III LAGAIALIIIGFGISGKHFTVTTFTSAGNIGEDGTLSCTFEP
DIKLNIGIVIQWLKEGIKGLVHEFKEGKDDLSQQHEMFRGRTAVFADQVVGNASLRLKNV
QLTDAGTYTCYIRTSKGKGNANLEYKTGAFSMPEINVDYNASSELRCEAPRWFPQPTVA
WASQVDQGANFSEVSNTS FELNSENVTMKVVSVLYNVTINNTYSCMIENDIAKATGDIKV
TDSEVKRRSQLQLLNSGSPCVFSSAFVAGWALLSLSCCLMLR
    
```

25 (SEQ ID NO: 2, Q7TSP5 (VTCN1 RATÓN).)

IV. Secuencias del anticuerpo anti-B7-H4

En el presente documento se divulgan varios anticuerpos contra B-H4 y sus ácidos nucleicos codificantes.

30

a. Secuencias de B1A1

Se divulga un anticuerpo monoclonal murino que se produce mediante el clon de hibridoma B1A1 que contiene dos cadenas ligeras y dos cadenas pesadas y se une específicamente a B7-H4.

35

i. Cadena ligera

Sus regiones variables de cadena ligera tienen la siguiente secuencia de aminoácidos:

DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSITCKASQDVRTAVAWYQOKPGQSPKLLIYSTSYRYTGV

40

PDRFTGSGSGTEFTFTISSVQAEDLAVYYC**QOYYVTPLT**FGAGTKLELK (SEQ ID NO:3)

que se une específicamente a B7-H4.

Las CDR de la SEQ ID NO: 3 están en negrita y subrayadas y son:

45

CDR1 **KASQDVRTAVA** (SEQ ID NO: 4);
 CDR2 **STSYRYT** (SEQ ID NO: 5); y
 CDR3 **QOYYVTPLT** (SEQ ID NO: 6).

50 También se divulga un ácido nucleico que codifica la cadena ligera (SEQ ID NO: 3).

Un ácido nucleico ilustrativo que codifica la cadena ligera (SEQ ID NO: 3) es

GACATTGTGATGACCCAGTCTCACAAATTCATGTCCACATCAGTAGGAGACAGGGTC
AGTATCACCTGCAAGGCCAGTCAGGATGTGAGAAGCTGCTGTAGCCTGGTATCAACA
GAAACCAGGACAATCTCCTAAACTACTGATTTACTCGACATCCTACCGGTACACTGG
AGTCCCTGATCGCTTCACTGGCAGTGGATCTGGGACGGAATTCACCTTCACCATCAG
CAGTGTGCAGGCTGAAGACCTGGCAGTTTATTACTGTCAGCAATATTATGTTACTCC
GCTCACGTTGCGGTGCTGGGACCAAGCTGGAGCTGAAA (SEQ ID NO:7).

ii. Cadena pesada

5 Sus regiones variables de cadena pesada tienen la siguiente secuencia de aminoácidos:

EVQLQQSGTVLARPGASVKMSCKASGYTFTS**SYWMH**WIKORPGQGLEWIG**AIYPGNSD**
TKYNQKFKDKAKLTAVTSASTAYMELSSLTNESAVYYCTSTVRNVMDYWGQGTSV
TVSS (SEQ ID NO:8)

10 y se une específicamente a B7-H4.

Las CDR de la SEQ ID NO: 8 están en negrita y subrayadas y son:

15 CDR1 **SYWMH** (SEQ ID NO: 9);
CDR2 **AIYPGNSDKYNQKFKDK** (SEQ ID NO: 10); y
CDR3 **TVRNVMDY** (SEQ ID NO: 11).

También se divulga un ácido nucleico que codifica una cadena pesada (SEQ ID NO: 8).

20 También se divulga un ácido nucleico ilustrativo que codifica la cadena pesada (SEQ ID NO: 8) que es

GAGGTTTCAGCTCCAGCAGTCTGGGACTGTGCTGGCAAGGCCTGGGGCTTCAGTGAA
GATGTCCTGCAAGGCTTCTGGCTACACCTTTACCAGCTACTGGATGCACTGGATAAA
ACAGAGGCCTGGACAGGGTCTGGAATGGATTGGCGCTATTTATCCTGGAAATAGTG
ATACTAAATACAACCAGAAGTTCAAGGACAAGGCCAAACTGACTGCAGTCACATCT
GCCAGCACTGCCTACATGGAGCTCAGCAGCCTGACAAATGAGGACTCTGCGGTCTA
TTACTGTACATCTACGGTACGGAATGTTATGGACTACTGGGGTCAAGGAACCTCAGT
CACCGTCTCCTCA (SEQ ID NO:12).

25 También es posible obtener anticuerpos anti-B7-H4 que tengan las LCDR y/o HCDR de B1A1 resaltadas anteriormente.

b. Secuencias de B1H1

30 También se divulga un anticuerpo monoclonal murino producido por el clon de hibridoma B1H1 y que contiene dos cadenas ligeras y dos cadenas pesadas.

i. Cadena ligera

Sus regiones variables de cadena ligera tienen la siguiente secuencia de aminoácidos:

35 EIQMTQSPSSMSASLGDRITTC**QATQDIVKSLN**WYQQKPKPPSFLIYY**TAQLAEGVPS**
RFSGSGSGSDYSLTISNLESEDFADYYCLOFYEFPPTFGGGKLEIK (SEQ ID NO:13).

Las CDR de la SEQ ID NO: 13 están en negrita y subrayadas y son:

40 CDR1 **QATQDIVKSLN** (SEQ ID NO: 14);

CDR2 **YTAQLAE** (SEQ ID NO: 15); y
 CDR3 **LQFYFPPT** (SEQ ID NO: 16).

También se divulga un ácido nucleico que codifica la cadena ligera (SEQ ID NO: 13).

5 También se divulga un ácido nucleico ilustrativo que codifica la cadena ligera (SEQ ID NO: 13) que es

GAAATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCTATGTCTGCATCTCTGGGAGACAGAATA
 ACCATCACTTGCCAGGCAACTCAAGACATTGTTAAGAGITTTAAACTGGTATCAACAA
 AAACCAGGGAAACCCCTTCATTCCTGATCTATTATACAGCTCAACTGGCAGAAGGG
 GTCCCATCAAGGTTTCAGTGGCAGTGGGICTGGGTCAGACTAATCTCTGACAATCAGC
 AACCTGGAGTCTGAAGATTTTGCAGACTATTACTGTCTACAGTTTTATGAGTTTCCTC
 CGACGTTCCGGTGGAGGCACCAAGCTGGAAATCAA (SEQ ID NO:17).

10 La región constante de cadena ligera puede tener la siguiente secuencia de aminoácidos:
 RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ
 DSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 18) y se une específicamente
 a B7-H4.

15 **ii. Cadena ligera humanizada**

Las regiones variables de cadena ligera pueden humanizarse, por ejemplo, de la siguiente manera:

VL1 humanizada de B1H1:

20 **DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQATQDIVKSLNWFYQQKPGKPPKFLIYYTAQLAEGVPS**
RFSGSGSGTDYTLTISSLQSEDFATYYCLQFYFPPTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:19)

VL2 humanizada de B1H1:

25 **DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQATQDIVKSLNWFYQQKPGKPPKFLIYYTAQLAEGVPS**
RFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCLQFYFPPTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:20)

VL3 humanizada de B1H1:

30 **DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQATQDIVKSLNWFYQQKPGKAPKFLIYYTAQLAEGVPS**
RFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCLQFYFPPTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:21)

VL4 humanizada de B1H1:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQATQDIVKSLNWFYQQKPGKPPKFLIYYTAQLAEGVPS
RFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCLQFYFPPTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:22)

VL5 humanizada de B1H1:

35 **DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQATQDIVKSLNWFYQQKPGKPPKFAIYYTAQLAEGVPS**
RFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCLQFYFPPTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:23)

Las cadenas ligeras pueden estar humanizadas, por ejemplo, de la siguiente manera:

40 Variante 1 de cadena ligera de B1H1 de longitud completa:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTTTCQATQDIVKSLNWDYQQKPGKPPKFLIYYTAQLAEGVPS
RFSGSGSGTDYTLTISSSLQSEDFATYYCLQFYEFPPPTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSD
EQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTL
SKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:24)

Variante 2 de cadena ligera de B1H1 de longitud completa:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTTTCQATQDIVKSLNWDYQQKPGKPPKFLIYYTAQLAEGVPS
RFSGSGSGTDYTLTISSSLQPEDFATYYCLQFYEFPPPTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSD
EQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTL
SKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:25)

5

Variante 3 de cadena ligera de B1H1 de longitud completa:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTTTCQATQDIVKSLNWDYQQKPGKAPKFLIYYTAQLAEGVPS
RFSGSGSGTDYTLTISSSLQPEDFATYYCLQFYEFPPPTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSD
EQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTL
SKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:26)

10

Variante 4 de cadena ligera de B1H1 de longitud completa:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTTTCQATQDIVKSLNWDYQQKPGKPPKFLIYYTAQLAEGVPS
RFSGSGSGTDFTLTISSSLQPEDFATYYCLQFYEFPPPTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSD
EQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTL
SKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:27)

15

Variante 5 de cadena ligera de B1H1 de longitud completa:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTTTCQATQDIVKSLNWDYQQKPGKPPKFLIYYTAQLAEGVPS
RFSGSGSGTDFTLTISSSLQPEDFATYYCLQFYEFPPPTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSD
EQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTL
SKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:28)

iii. Cadena pesada

20

Las regiones variables de cadena pesada tienen la siguiente secuencia de aminoácidos:

EVQLQQSGTFLARPGASVKMSCKVSGYPFTSYWMHWKQRPGGLEWIGAIYPGKS
DTEYNPNFKGKAKLTAVTSATTAYMELSSLTNEEDSAVYYCTSTWTHYFDYWGQGTTL
TVSS (SEQ ID NO:29)

25

y se une específicamente a B7-H4.

Las CDR de la SEQ ID NO: 29 están en negrita y subrayadas y son:

30

CDR1 **SYWMH** (SEQ ID NO: 9);
CDR2 **AIYPGKSDTEYNPNFKG** (SEQ ID NO: 30); y
CDR3 **TVRNVMDY** (SEQ ID NO: 11).

También se divulga un ácido nucleico que codifica una cadena pesada (SEQ ID NO: 29).

También se divulga un ácido nucleico ilustrativo que codifica la cadena pesada (SEQ ID NO: 29) que es

GAGGTTTCAGCTCCAGCAGTCTGGGACTGTTCTGGCAAGGCCTGGGGCTTCAGTGAAG
 ATGTCCTGCAAGGTTTCTGGCTACCCCTTTACCAGCTACTGGATGCACTGGGTAAAA
 CAGAGGCCTGGACAGGGTCTGGAATGGATTGGCGCTATTTATCCTGGAAAAAGTGA
 CACTGAATACAACCCGAACCTCAAGGGCAAGGCCAACTGACTGCAGTCACATCTG
 CCACCACTGCCTACATGGAGCTCAGCAGCCTGACAAATGAGGACTCTGCGGTCTATT
 ACTGTACAAGTACCTGGACCCACTACTTTGACTACTGGGGCCAAGGCACCACTCTCA
 CAGTCTCCTCA (SEQ ID NO:31).

5 El dominio constante de cadena pesada puede tener la siguiente secuencia de aminoácidos:

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS
 GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG
PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY
 NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR
 DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK
 SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:32)

10 y se une específicamente a B7-H4.

Los aminoácidos subrayados y en negrita representan aminoácidos que difieren de la secuencia mutante.

15 El dominio constante de cadena pesada puede mutarse para que tenga la siguiente secuencia de aminoácidos:

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS
 GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG
PDVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ
 YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPLPPEKTISKAKGQPREPQVYTLPP
 SRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTV
 DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:33)

20 Los aminoácidos subrayados y en negrita representan aminoácidos que difieren de la secuencia de tipo silvestre.

iv. Cadena pesada humanizada

Los dominios variables de cadena pesada pueden humanizarse, por ejemplo, de la siguiente manera:

25 VH1 humanizada de B1H1:

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKVSGYPFTSYWMHWVRQAPGQGLEWIGAIYPGKSD
 TEYAPKFQGRVTLTADTSTSTAYMELSSLRSEDTA VYYCTSTWTHYFDYWGQGTTVTV
 SS (SEQ ID NO:34)

30 VH2 humanizada de B1H1:

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKVSGYPFTSYWMHWVRQAPGQGLEWMGAIYPGKS
DTEYAQKFQGRVTLTADTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTSTWTHYFDYWGQGTTVT
VSS (SEQ ID NO:35)

VH3 humanizada de B1H1:

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKVSGYPFTSYWMHWVRQAPGQGLEWMGAIYPGKS
DTEYAQKFQGRVTLTADTSTSTAYMELSSLRSEDTATYYCTSTWTHYFDYWGQGTTVT
VSS (SEQ ID NO:36)

5

VH4 humanizada de B1H1:

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKVSGYPFTSYWMHWVRQAPGQGLEWMGAIYPGKS
DTEYAQKFQGRVTLTADTSTSTAYMELSSLRSEDTATYYCTSTWTHYFDYWGQGTTVT
VSS (SEQ ID NO:37)

10

Las cadenas pesadas pueden humanizarse, por ejemplo, de la siguiente manera:

Variante 1 de cadena pesada de B1H1:

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKVSGYPFTSYWMHWVRQAPGQGLEWIGAIYPGKSD
TEYAPKFQGRVTLTADTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTSTWTHYFDYWGQGTTVTV
SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSKVHTFPAVLQ
SSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEL
GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE
QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP
SRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTV
DKSRWQQGNVFNCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:38)

15

Variante 2 de cadena pesada de B1H1:

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKVSGYPFTSYWMHWVRQAPGQGLEWMGAIYPGKS
DTEYAQKFQGRVTLTADTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTSTWTHYFDYWGQGTTVT
VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSKVHTFPAVL
QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEL
LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE
EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP
PSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTV
DKSRWQQGNVFNCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:39)

20

Variante 3 de cadena pesada de B1H1:

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKVSGYPFTSYWMHWVRQAPGQGLEWMGAIYPGKS
 DTEYAQKFQGRVTLTADTSTSTAYMELSSLRSEDATYYCTSTWTHYFDYWGGTTVT
 VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL
 QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEL
 LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE
 EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLP
 PSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTV
 DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:40)

Variante 4 de cadena pesada de B1H1:

5

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKVSGYPFTSYMHWRQAPGQGLEWMGAIYPGKS
 DTEYAQKFQGRVTLTADTSTSTAYMELSSLRSEDATYYCTSTWTHYFDYWGGTTVT
 VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL
 QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEL
 LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE
 EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLP
 PSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTV
 DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:41)

Como alternativa, la cadena pesada humanizada puede estar mutada y tener una de las siguientes secuencias de aminoácidos:

10

Variante 1 mutante de B1H1 de cadena pesada:

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKVSGYPFTSYWMHWVRQAPGQGLEWIGAIYPGKSD
 TEYAPKFQGRVTLTADTSTSTAYMELSSLRSEDATVYYCTSTWTHYFDYWGGTTVT
 SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ
 SSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPPELL
 GGPDVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE
 EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPLPEEKTISKAKGQPREPQVYTL
 PPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLT
 VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:42);

15

Variante 2 mutante de B1H1 de cadena pesada:

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKVSGYPFTSYWMHWVRQAPGQGLEWMGAIYPGKS
DTEYAQKFQGRVTLTADTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTSTWTHYFDYWGQGTTVT
VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL
QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEL
LGGPDVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR
EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPLPEEKTISKAKGQPREPQVY
LPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKL
TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:43);

Variante 3 mutante de B1H1 de cadena pesada:

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKVSGYPFTSYWMHWVRQAPGQGLEWMGAIYPGKS
DTEYAQKFQGRVTLTADTSTSTAYMELSSLRSEDTATYYCTSTWTHYFDYWGQGTTVT
VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL
QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEL
LGGPDVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR
EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPLPEEKTISKAKGQPREPQVY
LPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKL
TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:44);

5

y

Variante 4 mutante de B1H1 de cadena pesada:

10

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKVSGYPFTSYWMHWVRQAPGQGLEWMGAIYPGKS
DTEYAQKFQGRVTLTADTSTSTAYMELSSLRSEDTATYYCTSTWTHYFDYWGQGTTVT
VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL
QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEL
LGGPDVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR
EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPLPEEKTISKAKGQPREPQVY
LPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKL
TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:45).

Las combinaciones preferidas de cadenas pesadas y ligeras son:

- 15 (a) un anticuerpo monoclonal que tiene un dominio variable de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de las SEQ ID NO: 19, 20, 21, 22 o 23, y un dominio variable de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de las SEQ ID NO: 34, 35, 36 o 37.
- 20 (b) un anticuerpo anti-B7H4 o un fragmento de unión a antígeno del mismo que tiene una cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos de acuerdo con una cualquiera de las SEQ ID NO: 24, 25, 26, 27 o 28, y una cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos de acuerdo con una cualquiera de las SEQ ID NO: 38, 39, 40 o 41.
- 25 (c) un anticuerpo anti-B7H4 o un fragmento de unión a antígeno del mismo que tiene una cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos de acuerdo con una cualquiera de las SEQ ID NO: 24, 25, 26, 27 o 28, y una cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos de acuerdo con una cualquiera de las SEQ ID NO: 42, 43, 44 o 45.
- (d) un anticuerpo anti-B7H4 o un fragmento de unión a antígeno del mismo que tiene dos cadenas ligeras y dos

cadenas pesadas, en donde las dos cadenas ligeras incluyen un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 24, 25, 26, 27 o 28, y las dos cadenas pesadas incluyen un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 38, 39, 40 o 41, y en donde el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo se une a B7-H4.

- 5 (e) un anticuerpo que tiene dos cadenas ligeras y dos cadenas pesadas, en donde las dos cadenas ligeras incluyen un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 24, 25, 26, 27 o 28, y las dos cadenas pesadas incluyen un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 42, 43, 44 o 45, y en donde el anticuerpo se une a B7-H4.
- 10 También es posible obtener anticuerpos anti-B7-H4 que tengan las LCDR y/o HCDR de B1H1 resaltadas anteriormente.

c. Secuencias de B1H3

- 15 También se divulga un anticuerpo monoclonal murino que se produce mediante el clon de hibridoma B1H3 y contiene dos cadenas ligeras y dos cadenas pesadas, y se une específicamente a B7-H4.

i. Cadena ligera

- 20 Sus regiones variables de cadena ligera tienen la siguiente secuencia de aminoácidos:

EIQMTQSPSSMSASLGDTITITCQATQDIVKSLNWYQKPKPPSFLI**YYTTQLAEGVPS**
RFSGSGSGSDYSLTISNLDSEDFADYYCLQFYEFPPPTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO:46)

Las CDR de la SEQ ID NO: 46 están en negrita y subrayadas y son:

- 25 CDR1 **QATQDIVKSLN** (SEQ ID NO: 14);
 CDR2 **YYTTQLAE** (SEQ ID NO: 47); y
 CDR3 **LQFYEF**PPPT (SEQ ID NO: 16).

- 30 También se divulga un ácido nucleico que codifica la cadena ligera (SEQ ID NO: 46).

También se divulga un ácido nucleico ilustrativo que codifica la cadena ligera (SEQ ID NO: 46) que es

GAAATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCTATGTCTGCATCTCTGGGAGACACAATA
ACCATCACTTGCCAGGCAACTCAAGACATTGTTAAGAGTTTAAACTGGTATCAACAA
AAACCAGGGAAACCCCTTCATTCCTGATCTATTATACAACTCAACTGGCAGAAGGG
GTCCCATCAAGTTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGTCAGACTATTCTCTGACAATCAGC
AACCTGGACTCTGAAGATTTTGCAGACTATTACTGTCTACAGTTTTATGAGTTTCCTC
CGACGTTTCGGTGGAGGCACCAAGCTGGAAATCAAA (SEQ ID NO:48).

ii. Cadena pesada

- 40 Sus regiones variables de cadena pesada tienen la siguiente secuencia de aminoácidos:

EVQLQQSGTFLARPGASVKMSCKASGYTFSSYWMHWVKQRPGQGLEWIGAIYPGKS
DISYNOKFOGKAKLTAVTSASTAFMELTSLTINEDSAVYYCTSIWTHYFDYWGQGTTL
TVSS (SEQ ID NO:49).

Las CDR de la SEQ ID NO: 49 están en negrita y subrayadas y son:

- 45 CDR1 **SYWMH** (SEQ ID NO: 9);
 CDR2 **AIYPGKSDTEYNPNFKG** (SEQ ID NO: 50); y
 CDR3 **TVRNVMDY** (SEQ ID NO: 11).

- 50 También se divulga un ácido nucleico que codifica una cadena pesada (SEQ ID NO: 49).

También se divulga un ácido nucleico ilustrativo que codifica la cadena pesada (SEQ ID NO: 49) que es

GAGGTTTCAGCTCCAGCAGTCTGGGACTGTTCTGGCAAGGCCTGGGGCTTCAGTGAAG
 ATGTCCTGCAAGGCTTCTGGCTACACCTTTCCAGCTACTGGATGCACTGGGTAAAA
 CAGAGGCCTGGACAGGGTCTGGAATGGATTGGCGCTATTTATCCTGGAAAAAGTGA
 TACTAGCTACAACCAGAAGTTCCAGGGCAAGGCCAAACTGACTGCAGTCACATCTG
 CCAGCACTGCCTTCATGGAGCTCACCAGCCTGACAAATGAGGACTCTGCGGTCTATT
 ACTGTACAAGTACCTGGACCCACTACTTTGACTACTGGGGCCAAGGCACCACTCTCA
 CAGTCTCCTCA (SEQ ID NO:51).

5 También es posible obtener anticuerpos anti-B7-H4 que tengan las LCDR y/o HCDR de B1H3 resaltadas anteriormente.

Un anticuerpo preferido tiene una cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 46 y una cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 49.

10 **d. Secuencias de B1H10**

También se divulga un anticuerpo monoclonal murino anti-B7H4 que se produce mediante el clon de hibridoma B1H10 y contiene dos cadenas ligeras y dos cadenas pesadas.

15 **i. Cadena ligera**

Sus regiones variables de cadena ligera tienen la siguiente secuencia de aminoácidos:

20 DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISC**RASQDISNYLN**WYQQKPDGTIKLLIYYT**SRLHSGVPS**
 RFSGSGSGSDYSLTISNLEQEDIATYFC**QQGNTLPWT**FGGGTKLEFK (SEQ ID NO:52).

Las CDR de la SEQ ID NO: 52 están en negrita y subrayadas y son:

25 CDR1 **RASQDISNYLN** (SEQ ID NO: 53);
 CDR2 **YTSRLHS** (SEQ ID NO: 54); y
 CDR3 **QQGNTLPWT** (SEQ ID NO: 55).

También se divulga un ácido nucleico que codifica la cadena ligera (SEQ ID NO: 52).

30 También se divulga un ácido nucleico que codifica la cadena ligera (SEQ ID NO: 52) que es

GATATCCAGATGACACAACTACATCCTCCCTGTCTGCCTCTCTGGGAGACAGAGTC
 ACCATCAGTTGCAGGGCAAGTCAGGACATTAGCAATTATTTAAACTGGTATCAGCAG
 AAACCAGATGGAAGTATTAAACTCCTGATCTATTACACATCAAGATTACATTCAGGA
 GTCCCATCAAGGTTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGATCAGATTATTCTCTCACCATTAGC
 AACCTGGAGCAAGAAGATATTGCCACTTACTTTTGCCAACAGGGTAATACGCTTCCG
 TGGACGTTTCGGTGGAGGCACCAAGCTGGAATTCAA (SEQ ID NO:56).

La cadena ligera puede comprender un dominio constante que tiene la siguiente secuencia de aminoácidos:

35 DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDISNYLNWYQQKPGKTIKLLIYYT**SRLHSGVPSR**
 FSGSGSGTDYTLTISSLPEDFATYFC**QQGNTLPWT**FGGQTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSD
 EQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYSLSTLTL
 SKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:57)

ii. Cadena ligera humanizada de B1H10

El dominio variable de cadena ligera puede humanizarse, por ejemplo, de la siguiente manera:

5 VL1 humanizada de B1H10:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQDISNYLNWYQQKPGKTIKLLIYYTSRLHSGVPSR
FSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYFCQQGNTLPWTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO:58)

10 VL2 humanizada de B1H10:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQDISNYLNWYQQKPGKAPKLLIYYTSRLHSGVPS
RFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYFCQQGNTLPWTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO:59)

VL3 humanizada de B1H10:

15 DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQDISNYLNWYQQKPGKAPKLLIYYTSRLHSGVPS
RFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYFCQQGQTLPWTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO:60)

VL4 humanizada de B1H10:

20 DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQDISNYLNWYQQKPGKAPKLLIYYTSRLHSGVPS
RFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYFCQQGSTLPWTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO:61)

La cadena ligera puede humanizarse, por ejemplo, de la siguiente manera:

Variante 1 de la cadena ligera humanizada de B1H10:

25 DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQDISNYLNWYQQKPGKAPKLLIYYTSRLHSGVPS
RFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYFCQQGNTLPWTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPS
DEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSTYLSSTL
TLISKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:62)

Variante 2 de la cadena ligera humanizada de B1H10:

30 DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQDISNYLNWYQQKPGKAPKLLIYYTSRLHSGVPS
RFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYFCQQGQTLPWTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPS
DEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSTYLSSTL
TLISKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:63).

Variante 3 de la cadena ligera humanizada de B1H10:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQDISNYLNWYQQKPGKAPKLLIYYTSRLHSGVPS
RFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYFCQQGSTLPWTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSD
EQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSTYLSSTLTL
SKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:64)

35 iii. Cadena pesada

Las regiones variables de cadena pesada tienen la siguiente secuencia de aminoácidos:

EVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYTFTDDYYMNWVRQSHGKSLEWIGRVNPSNGG
TNYNQKFKGKATLTVDKSLSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARRRHNYADFWGQGTTLTV
SS (SEQ ID NO:65).

Las CDR de la SEQ ID NO: 65 están en negrita y subrayadas y son:

- 5 CDR1 **DYYMN** (SEQ ID NO: 66);
CDR2 **RVNPSNGGTNYNQKFKG** (SEQ ID NO: 67); y
CDR3 **RHNYADF** (SEQ ID NO: 68).

También se divulga un ácido nucleico que codifica una cadena pesada (SEQ ID NO: 65).

- 10 También se divulga un ácido nucleico ilustrativo que codifica la cadena pesada (SEQ ID NO: 65) que es

GAGGTCCAGCTGCAACAGTCTGGACCTGAGCTGGTGAAGCCTGGGGCTTCAGTGAA
GATGTCCTGTAAGGCTTCTGGATACACATTCCTGACTACTACATGAACTGGGTGAG
GCAGAGTCATGGAAAGAGCCTTGAGTGGATTGGACGTGTTAATCCTAGCAATGGTG
GTACTAACTACAACCAGAAATTCAAGGGCAAGGCCACATTGACAGTAGACAAATCC
CTCAGCACAGCCTACATGCAGCTCAGCAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCGGTCTAT
TACTGTGCAAGACGACATAACTACGCAGACTTCTGGGGCCAAGGCACCACTCTCAC
AGTCTCCTCA (SEQ ID NO:69).

15 **iv. Cadena pesada humanizada de B1H10**

Las regiones variables de cadena pesada pueden humanizarse, por ejemplo, de la siguiente manera:

VH1 humanizada de B1H10:

- 20 EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTDYYMNWVRQAPGQGLEWIGRVNPSNGG
TNYAQKFQGRVTLTVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARRHNYADFVGQGTTLTV
SS (SEQ ID NO:70)

VH2 humanizada de B1H10:

- 25 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTDYYMNWVRQAPGQGLEWMGRVNPAN
GGTNYAQKFQGRVTLTVDTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARRHNYADFVGQGTTV
TVSS (SEQ ID NO:71)

VH3 humanizada de B1H10:

- 30 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTDYYMNWVRQAPGQGLEWMGRVNPSSG
GTNYAQKFQGRVTLTVDTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARRHNYADFVGQGTTVT
VSS (SEQ ID NO:72)

VH4 humanizada de B1H10:

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTDYYMNWVRQAPGQGLEWMGRVNPSSG
GTNYAQKFQGRVTLTVDTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARRHNYADFVGQGTTVT
VSS (SEQ ID NO:73)

VH5 humanizada de B1H10:

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYIMNWVRQAPGQGLEWMGRVNPSSG
GTNYAQKFQGRVTLTVDTSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARRHNYADFWGQGTTVT
VSS (SEQ ID NO:74)

5 Las cadenas pesadas pueden humanizarse, por ejemplo, de la siguiente manera:

Variante 1 de cadena pesada humanizada de B1H10:

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYIMNWVRQAPGQGLEWIGRVNPSNGG
TNYAQKFQGRVTLTVDKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARRHNYADFWGQGTTVTV
SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ
SSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEL
GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE
QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP
SRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTV
DKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:75)

10

Variante 2 de cadena pesada humanizada de B1H10:

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYIMNWVRQAPGQGLEWMGRVNPAN
GGTNYAQKFQGRVTLTVDTSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARRHNYADFWGQGTTV
TVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAV
LQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPE
LLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR
EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYT
LPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKL
TVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:76)

15 Variante 3 de cadena pesada humanizada de B1H10:

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYIMNWVRQAPGQGLEWMGRVNPSSG
GTNYAQKFQGRVTLTVDTSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARRHNYADFWGQGTTVT
VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL
QSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEL
LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE
EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL
PPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLT
VDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:77)

20

Variante 4 de cadena pesada humanizada de B1H10:

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYIMNWVRQAPGQGLEWMGRVNPSSG
GTNYAQKFQGRVTLTVDTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARRHNYADFWGQGTTVT
VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL
QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEL
LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE
EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL
PPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLT
VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:78)

5

Variante 5 de cadena pesada humanizada de B1H10:

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYIMNWVRQAPGQGLEWMGRVNPSSG
GTNYAQKFQGRVTLTVDTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARRHNYADFWGQGTTVT
VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL
QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEL
LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE
EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL
PPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLT
VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:79)

Como alternativa, la cadena pesada humanizada puede estar mutada y tener una de las siguientes secuencias de aminoácidos:

10

Variante 1 de cadena pesada humanizada mutante de B1H10:

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYIMNWVRQAPGQGLEWIGRVNPSSGG
TNYAQKFQGRVTLTVDKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARRHNYADFWGQGTTVT
SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ
SSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELL
GGPDVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE
EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPLPEEKTISKAKGQPREPQVYTL
PPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLT
VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:80)

15

Variante 2 de cadena pesada humanizada mutante de B1H10:

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYIMNWVRQAPGQGLEWMGRVNPAN
GGTNYAQKFQGRVTLTVDTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARRHNYADFWGQGTTV
TVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAV
LQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPE

LLGGPDVFLFPPKPKDTLMISRTPVETCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP
REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPLPEEKTISKAKGQPREPQVY
TLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSK
LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:81).

Variante 3 de cadena pesada humanizada mutante de B1H10:

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYMNWVRQAPGQGLEWMGRVNPSSG
GTNYAQKFQGRVTLTVDTSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARRHNYADFWGQGTTVT
VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL
QSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEL
LLGGPDVFLFPPKPKDTLMISRTPVETCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR
EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPLPEEKTISKAKGQPREPQVYT
LPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKL
TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:82)

5

Variante 4 de cadena pesada humanizada mutante de B1H10:

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYMNWVRQAPGQGLEWMGRVNPSSG
GTNYAQKFQGRVTLTVDTSKSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARRHNYADFWGQGTTVT
VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL
QSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEL
LLGGPDVFLFPPKPKDTLMISRTPVETCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR
EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPLPEEKTISKAKGQPREPQVYT
LPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKL
TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:83)

10

Variante 5 de cadena pesada humanizada mutante de B1H10:

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYMNWVRQAPGQGLEWMGRVNPSSG
GTNYAQKFQGRVTLTVDTSKSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARRHNYADFWGQGTTVT
VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL
QSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEL
LLGGPDVFLFPPKPKDTLMISRTPVETCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR
EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPLPEEKTISKAKGQPREPQVYT
LPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKL
TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:84)

15 Se prefiere:

- (a) un anticuerpo anti-B7H4 que tiene una cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 52 y una cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 65.
- (b) un anticuerpo anti-B7H4 que tiene un dominio variable de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos

de SEQ ID NO: 58, 59, 60 o 61, y un dominio variable de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de las SEQ ID NO: 70, 71, 72, 73 o 74.

(c) un anticuerpo anti-B7H4 que tiene una cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos de acuerdo con una cualquiera de las SEQ ID NO: 62, 63 o 64, y una cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos de acuerdo con una cualquiera de las SEQ ID NO: 75, 76, 77, 78 o 79.

(d) un anticuerpo anti-B7H4 que tiene una cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos de acuerdo con una cualquiera de las SEQ ID NO: 62, 63 o 64, y una cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos de acuerdo con una cualquiera de las SEQ ID NO: 80, 81, 82, 83 u 84.

(e) un anticuerpo anti-B7H4 que tiene dos cadenas ligeras y dos cadenas pesadas, en donde las dos cadenas ligeras incluyen un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 62, 63 o 64, y las dos cadenas pesadas incluyen un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 75, 76, 77, 78 o 79.

(f) un anticuerpo anti-B7H4 que tiene dos cadenas ligeras y dos cadenas pesadas, en donde las dos cadenas ligeras incluyen un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 62, 63 o 64, y las dos cadenas pesadas incluyen un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 80, 81, 82, 83 u 84.

También es posible obtener anticuerpos anti-B7-H4 que tengan las LCDR y/o HCDR de B1H10 resaltadas anteriormente.

La presente invención proporciona un anticuerpo anti-B7-H4 que comprende:

(a) una cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEQ ID NO: 63; y

(b) una cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEQ ID NO: 81.

e. Secuencias de B2E6

También se divulga un anticuerpo monoclonal murino anti-B7H4 producido por el clon de hibridoma B2E6 y que contiene dos cadenas ligeras y dos cadenas pesadas.

i. Cadena ligera

Sus regiones variables de cadena ligera tienen la secuencia de aminoácidos:

**ETVMTQSHKIMSTSVGDRVTITCKASQDVRTAVAWYQQKPGQSPKLLISSASYQYTG
PDRFTGSGSGTDFFTISSLQAEDLAVYYCHQYYNTPLTFGAGTKLELR (SEQ ID
NO: 85).**

Las CDR de la SEQ ID NO: 85 están en negrita y subrayadas y son:

CDR1 **KASQDVRTAVA** (SEQ ID NO: 4);

CDR2 **SASYQYT** (SEQ ID NO: 86); y

CDR3 **HQYYNTPLT** (SEQ ID NO: 87).

También se divulga un ácido nucleico que codifica la cadena ligera (SEQ ID NO: 85).

También se divulga un ácido nucleico que codifica la cadena ligera (SEQ ID NO: 85) que es

**GAAACTGTGATGACCCAGTCTCACAAAATCATGTCCACTTCAGTAGGAGACAGGGT
CACCATCACCTGCAAGGCCAGTCAGGATGTGAGAAGCTGCTGTGGCCTGGTATCAAC
AGAAACCAGGACAATCTCCTAAATTACTAATTTCTCGGCATCCTACCAATACACTG
GAGTCCCTGATCGCTTCACTGGCAGTGGATCTGGGACGGATTTCACTTTCACCATCA
GCAGTTTGCAGGCTGAAGACCTGGCAGTTTATTACTGTCATCAGTATTATAATACTC
CGCTCACGTTCCGGTGCTGGGACCAAGCTGGAGCTGAGA (SEQ ID NO: 88).**

ii. Cadena pesada

Sus regiones variables de cadena pesada tienen la siguiente secuencia de aminoácidos:

EVQLQQSGTFLARPGASVKMSCKASGYTFTS**SYWMH**WVKQRPGQGLEWIG**AIYPGKS**
DTIYNQKFEGKAKLTAVTSDSTAYMDLSSLTNEDSAVYYCTSS**SVRNAMDY**WGQGT
 VTVSS (SEQ ID NO:89).

Las CDR de la SEQ ID NO: 89 están en negrita y subrayadas y son:

- 5 CDR1 **SYWMH** (SEQ ID NO: 9);
 CDR2 **AIYPGKSDTTYNQKFEG** (SEQ ID NO: 90); y
 CDR3 **SVRNAMDY** (SEQ ID NO: 91).

También se divulga un ácido nucleico que codifica una cadena pesada (SEQ ID NO: 89).

- 10 También se divulga un ácido nucleico ilustrativo que codifica la cadena pesada (SEQ ID NO: 89) que es

GAGGTTTCAGCTCCAGCAGTCTGGGACTGTGCTGGCAAGGCCTGGGGCTTCAGTGAA
 GATGTCCTGCAAGGCTTCTGGCTACACCTTCACCAGCTACTGGATGCACTGGGTAAA
 ACAGAGGCCTGGACAGGGTCTGGAATGGATTGGCGCTATTTATCCTGGAAAAAGTG
 ATACTACCTACAACCAGAAGTTCGAGGGCAAGGCCAAACTGACTGCAGTCACATCT
 GACAGCACAGCCTACATGGATCTCAGTAGCCTGACAAATGAGGACTCTGCGGTCTAT
 TACTGTACATCTTCGGTTCGGAATGCTATGGACTACTGGGGTCAAGGAACCTCAGTC
 15 ACCGTCTCCTCA (SEQ ID NO:92).

También es posible obtener anticuerpos anti-B7-H4 que tengan las LCDR y/o HCDR de B2E6 resaltadas anteriormente.

- 20 Preferentemente, el anticuerpo monoclonal tiene una cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 85 y una cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 89.

f. Secuencias de B4B3

- 25 También se divulga un anticuerpo monoclonal murino anti-B7H4 producido por el clon de hibridoma B4B3 y que contiene dos cadenas ligeras y dos cadenas pesadas.

i. Cadena ligera

- 30 Sus regiones variables de cadena ligera tienen la siguiente secuencia de aminoácidos:

DVLMITQTPLSLPVSLGGQASIS**CRSSQIHVH**SNGNTYLEWYLQKPGQSPKLLIY**KVSNR**
ESGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYC**FOGSHVPWT**FGGGTKLEIK (SEQ ID
 NO:93)

Las CDR de la SEQ ID NO: 93 están en negrita y subrayadas y son:

- 35 CDR1 **RSSQIHVH**SNGNTYLE (SEQ ID NO: 94);
 CDR2 **KVSNRFS** (SEQ ID NO: 95); y
 CDR3 **FOGSHVPWT** (SEQ ID NO: 96).

- 40 También se divulga un ácido nucleico que codifica la cadena ligera (SEQ ID NO: 93).

También se divulga un ácido nucleico ilustrativo que codifica la cadena ligera (SEQ ID NO: 93) que es

GATGTTTTGATGACCCAAACTCCACTCTCCCTGCCTGTCAGTCTTGGAGGTCAAGCCT
CCATCTCTTGCAGATCTAGTCAGATCATTGTACATAGTAATGGAAACACCTATTTAG
AATGGTACCTGCAGAAACCAGGCCAGTCTCCAAAGCTCCTGATCTACAAAGTTTCCA
ACCGATTTTCTGGGGTCCCAGACAGGTTTCAAGTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTCA
CACTCAAGATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATCTGGGAGTTTATTACTGCTTTCAAG
GTTACATGTTCCGTGGACGTTCCGGTGGAGGCACCAAGCTGGAAATCAA (SEQ ID
NO:97).

ii. Cadena pesada

5 Sus regiones variables de cadena pesada tienen la siguiente secuencia de aminoácidos:

QVQLQOPGAELVKPGASVKLSCKASGYTFISYWMHWKQRPGGLEWIGIEIDPSDSY
TYYNQKFKGKATLTVDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARRRKTWDWYFDVWGAG
TTVTVSS (SEQ ID NO:98).

Las CDR de la SEQ ID NO: 98 están en negrita y subrayadas y son:

10

CDR1 **SYWMH** (SEQ ID NO: 9);
CDR2 **EIDPSDSYTYYNQKFKG** (SEQ ID NO: 99); y
CDR3 **RKTWDWYFDV** (SEQ ID NO: 100).

15 También se divulga un ácido nucleico que codifica una cadena pesada (SEQ ID NO: 98).

También se divulga un ácido nucleico ilustrativo que codifica la cadena pesada (SEQ ID NO: 98) que es

CAGGTCCAGCTGCAGCAGCCTGGGGCTGAAGTGGTGAAGCCTGGGGCTTCAGTGAA
GCTGTCCTGCAAGGCTTCTGGATACACCTTCATTAGCTACTGGATGCACTGGGTGAA
GCAGAGGCCTGGACAAGGCCTTGAGTGGATCGGAGAGATTGATCCTTCTGATAGTT
ATACTTACTACAATCAAAGTTCAAGGGCAAGGCCACATTGACTGTAGACAAATCCT
CCAGCACAGCCTACATGCAACTCAGCAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCGGTCTATT
ACTGTGCAAGAAGGAAAACCTGGGACTGGTACTTCGATGTCTGGGGCGCAGGGACC
ACGGTCACCGTCTCCTCA (SEQ ID NO:101).

20

También es posible obtener anticuerpos anti-B7-H4 que tengan las LCDR y/o HCDR de B4B3 resaltadas anteriormente.

25 Preferentemente, el anticuerpo monoclonal tiene una cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 93 y una cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 98.

g. Secuencias de B4E11

30 También se divulga un anticuerpo monoclonal murino anti-B7H4 que se produce mediante el clon de hibridoma B4E11 y que contiene dos cadenas ligeras y dos cadenas pesadas.

i. Cadena ligera

Su región variable de cadena ligera tiene la siguiente secuencia de aminoácidos:

35

DIVMTQSHKFMSTSVGDRVTITCKASQDVSTAVAWYQQKPGQSPKLLISSASYRYTGV
PDRFTGSGSGTDFFTISSVQAEDLAVYYCQQHYSTPTFGGGTKLEIR (SEQ ID NO:102).

Las CDR de la SEQ ID NO: 102 están en negrita y subrayadas y son:

- 5 CDR1 **KASQDVSTAVA** (SEQ ID NO: 103);
 CDR2 **SASYRYT** (SEQ ID NO: 104); y
 CDR3 **QQHYSTPT** (SEQ ID NO: 105).

También se divulga un ácido nucleico que codifica la cadena ligera (SEQ ID NO: 102).

10 También se divulga un ácido nucleico que codifica la cadena ligera (SEQ ID NO: 102) que es

GACATTGTGATGACCCAGTCTCACAAATTCATGTCCACATCAGTAGGAGACAGGGTTC
 ACTATCACCTGCAAGGCCAGTCAGGATGTGAGTACTGCTGTAGCCTGGTATCAACAG
 AAACCAGGACAGTCTCCTAAACTACTGATTCCTCGGCATCCTACCGGTACACTGGA
 GTCCCTGATCGCTTCACTGGCAGTGGATCTGGGACGGATTTCACCTTACCATCAGC
 AGTGTGCAGGCTGAAGACCTGGCAGTTTATTACTGTCAGCAACATTATAGTACTCCG
 ACGTTCGGTGGAGGCCACCAAGCTGGAAATCAGA (SEQ ID NO:106).

ii. Cadena pesada

15 Sus regiones variables de cadena pesada tienen la siguiente secuencia de aminoácidos:

EVQLQQSGTFLARPGASVKMSCKASGYTFTSYWMIHWVKERPGQGLEWIGAIYPGDSD
TRYNQKFKGRAKLTAVTSANTAYMELSSLTNDDSAVFYCTCTTAGVLDYWGQGTSV
 TVSS (SEQ ID NO:107).

Las CDR de la SEQ ID NO: 107 están en negrita y subrayadas y son:

- 20 CDR1 **SYWMH** (SEQ ID NO: 9);
 CDR2 **AIYPGDSDTRYNQKFKG** (SEQ ID NO: 108); y
 CDR3 **TTAGVLDY** (SEQ ID NO: 109).

25 También se divulga un ácido nucleico que codifica una cadena pesada (SEQ ID NO: 107).

También se divulga un ácido nucleico que codifica la cadena pesada (SEQ ID NO: 107) que es

GAGGTTTCAGCTCCAGCAGTCTGGGACTGTGCTGGCAAGGCCTGGGGCTTCAGTGAA
 GATGTCCTGCAAGGCTTCTGGCTACACCTTACCAGCTACTGGATGCACTGGGTAAA
 AGAGAGGCCTGGACAGGGTCTGGAATGGATTGGCGCTATTTATCCTGGAGATAGTG
 ATACTAGGTATAATCAGAAGTTCAAGGGCAGGGCCAAACTGACTGCAGTCACATCT
 GCCAACACTGCCTACATGGAGCTCAGCAGCCTGACAAATGATGACTCTGCGGTCTTC
 TACTGTACATGTACTACGGCTGGTGTTTTGGACTACTGGGGTCAAGGAACCTCAGTC
 ACCGTCTCCTCA (SEQ ID NO:110).

30 También es posible obtener anticuerpos anti-B7-H4 que tengan las LCDR y/o HCDR de B4E11 resaltadas anteriormente.

35 Preferentemente, el anticuerpo monoclonal tiene una cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 102 y una cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 107.

h. Secuencias de B6C8

40 También se divulga un anticuerpo monoclonal murino anti-B7H4 producido por el clon de hibridoma B6C8 y que contiene dos cadenas ligeras y dos cadenas pesadas.

i. Cadena ligera

Sus regiones variables de cadena ligera tienen la siguiente secuencia de aminoácidos:

DVVMTQTPLSLPVS LGDQASISCT**TSSQSIVHGNNGNTYLE**WYLQKPGQSPKLLIY**KVSNR**
ESGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYC**FQGS**HVPYTFGGGTKLEIK
(SEQ ID NO: 111).

5

Las CDR de la SEQ ID NO: 111 están en negrita y subrayadas y son:

10 CDR1 **TSSQSIVHGNNGNTYLE** (SEQ ID NO: 112);
CDR2 **KVSNRFS** (SEQ ID NO: 95); y
CDR3 **FQGS**HVPYT (SEQ ID NO: 113).

También se divulga un ácido nucleico que codifica la cadena ligera (SEQ ID NO: 111).

15 También se divulga un ácido nucleico ilustrativo que codifica la cadena ligera (SEQ ID NO: 111) que es

GATGTTGTGATGACCCAAACTCCACTCTCCCTGCCTGTCAGTCTTGGAGATCAGGCC
TCCATCTCTTGCACATCTAGTCAGAGCATTGTACATGGTAATGGAAACACCTATTTA
GAATGGTACCTGCAGAAGCCAGGCCAGTCTCAAAGCTCCTGATCTACAAAGTTTCC
AACCGATTTTCTGGGGTCCCAGACAGGTTTCAGTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTCC
ACACTCAAGATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATCTGGGAGTTTATTACTGCTTTCAA
GGTTCACATGTTCCGTACACGTTCCGAGGGGGGACCAAGCTGGAAATAAAA
(SEQ ID NO: 114).

ii. Cadena pesada

20

Su región variable de cadena pesada tiene la siguiente secuencia de aminoácidos:

QVQLQQPGAELVKPGASVKLSCKASGYSFT**SYWMN**WVKQRPGRGLEWIGR**RIHPSDSE**
THYNQKFKSKATLTVDKSSSTAYIQLSSLTSEDSAVYFCAR**YGLFYGNDGYAMDHWG**
QGTSVTVSS (SEQ ID NO: 115).

25 Las CDR de la SEQ ID NO: 115 están en negrita y subrayadas y son:

30 CDR1 **SYWMN** (SEQ ID NO: 116);
CDR2 **RIHPSDSETHYNQKFKS** (SEQ ID NO: 117); y
CDR3 **YGLFYGNDGYAMDH** (SEQ ID NO: 118).

También se divulga un ácido nucleico que codifica una cadena pesada (SEQ ID NO: 115).

También se divulga un ácido nucleico ilustrativo que codifica la cadena pesada (SEQ ID NO: 115) que es

CAGGTCCAACCTGCAGCAGCCTGGGGCTGAACTGGTGAAGCCTGGGGCTTCAGTGAA
 GCTGTCTCTGCAAGGCTTCTGGCTACTCTTTCACCAGCTACTGGATGAACTGGGTGAA
 GCAGAGGCCTGGACGAGGCCTCGAGTGGATTGGAAGGATTCATCCTTCTGATAGTG
 AAACCTACTACAATCAAAAGTTCAAGAGCAAGGCCACACTGACTGTAGACAAATCC
 TCCAGCACAGCCTACATCCAACCTCAGCAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCGGTCTAT
 TTTTGTGCAAGATACGGGCTCTTCTATGGTAACGACGGATATGCTATGGACCACTGG
 GTCAAGGAACCTCAG (SEQ ID NO: 119).

También es posible obtener anticuerpos anti-B7-H4 que tengan las LCDR y/o HCDR de B6C8 resaltadas anteriormente.

5 Preferentemente, el anticuerpo monoclonal tiene una cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 113 y una cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 117.

10 **i. Secuencias de B9H1**

También se divulga un anticuerpo monoclonal murino anti-B7H4 producido por el clon de hibridoma B9H1 y que contiene dos cadenas ligeras y dos cadenas pesadas.

15 **i. Cadena ligera**

Su región variable de cadena ligera tiene la siguiente secuencia de aminoácidos:

DIQMTQTSSLSASLGDRVTISC **RASQDISFYLN**WYQQKPDGTVKLLIYYT**SRLHSGVPS**
 RFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFC**QQGNTLPWT**FGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 120)

20 Las CDR de la SEQ ID NO: 120 están en negrita y subrayadas y son:

CDR1 **RASQDISFYLN** (SEQ ID NO: 121);
 CDR2 **YTSRLHS** (SEQ ID NO: 54); y
 CDR3 **QQGNTLPWT** (SEQ ID NO: 55).

25 También se divulga un ácido nucleico que codifica la cadena ligera (SEQ ID NO: 120).

También se divulga un ácido nucleico ilustrativo que codifica la cadena ligera (SEQ ID NO: 120) que es

GATATCCAGATGACACAGACTACATCCTCCCTGTCTGCCTCTCTGGGAGACAGAGTC
 ACCATCAGTTGCAGGGCAAGTCAGGACATTAGCTTTTATTTAAACTGGTATCAGCAG
 AAACCAGATGGAACCTGTTAAACTCCTGATCTACTACACATCAAGATTACACTCAGGA
 GTCCCATCAAGGTTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGAACAGATTATCTCTCACCATTAGC
 AACCTGGAGCAAGAAGATATTGCCACTTACTTTTGCCAACAGGGTAATACACTTCCG
 TGGACGTTTCGGTGGAGGCACCAAGCTGGAAATCAAA (SEQ ID NO: 122).

30 **ii. Cadena pesada**

35 Su región variable de cadena pesada tiene la siguiente secuencia de aminoácidos:

EVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYTFT**DYYMNWVKQSHGKSLEWIGRVNPSNG**
GTSYNQKFKGKATLTVDKSLSAAYMQLNSLTSEDSAVYYCARR**RHNYPDYWGQGTTL**
 TVSS (SEQ ID NO: 123).

Las CDR de la SEQ ID NO: 123 están en negrita y subrayadas y son:

- 5 CDR1 **DYYMN** (SEQ ID NO: 66);
 CDR2 **RVNPSNGGTSYNQKFKG** (SEQ ID NO: 124); y
 CDR3 **RHNYPDY** (SEQ ID NO: 125).

También se divulga un ácido nucleico que codifica una cadena pesada (SEQ ID NO: 125).

10 También se divulga un ácido nucleico ilustrativo que codifica la cadena pesada (SEQ ID NO: 125) que es

GAGGTCCAGCTGCAACAGTCTGGACCTGAACTGGTGAAGCCTGGGGCTTCAGTGAA
 GATGTCCTGTAAGGCTTCTGGATAACATTCACTGACTACTACATGAACTGGGTGAA
 GCAGAGTCATGGAAAGAGCCTTGAGTGGATTGGACGTGTTAATCCTAGCAATGGTG
 GTACTAGCTACAACCAGAAGTTCAAGGGCAAGGCCACATTGACAGTAGACAAATCC
 CTCAGCGCAGCCTATATGCAGCTCAACAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCGGTCTAT
 TACTGTGCAAGAAGGCATAACTACCCTGACTACTGGGGCCAAGGCACCACTCTCAC
 AGTCTCCTCA (SEQ ID NO:126).

15 También es posible obtener anticuerpos anti-B7-H4 que tengan las LCDR y/o HCDR de B9H1 resaltadas anteriormente.

Preferentemente, el anticuerpo monoclonal tiene una cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 120 y una cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 123.

20 **j. Secuencias de B10D7**

También se divulga un anticuerpo monoclonal murino anti-B7H4 producido por el clon de hibridoma B10D7 y que contiene dos cadenas ligeras y dos cadenas pesadas.

25 **i. Cadena ligera**

Sus regiones variables de cadena ligera tienen la siguiente secuencia de aminoácidos:

EIQMTQSPSSMSASLGDRITITC**QATQDIVKSLN****WYQKPGKPPSFLIYYTAQLAEGVPS**
RFSGSGSGSDYSLTISNLESEDFADYYC**LQFYEPPT****FGGGTKLEIK (SEQ ID NO:13)**

30 Las CDR de la SEQ ID NO: 13 están en negrita y subrayadas y son:

- 35 CDR1 **QATQDIVKSLN** (SEQ ID NO: 14);
 CDR2 **YTAQLAE** (SEQ ID NO: 15); y
 CDR3 **LQFYEPPT** (SEQ ID NO: 16).

También se divulga un ácido nucleico que codifica la cadena ligera (SEQ ID NO: 13).

También se divulga un ácido nucleico ilustrativo que codifica la cadena ligera (SEQ ID NO: 13) que es

40 GAAATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCTATGTCTGCATCTCTGGGAGACAGAATA
 ACCATCACTTGCCAGGCAACTCAAGACATTGTTAAGAGTTTAACTGGTATCAACAA
 AAACCAGGGAAACCCCTTCATTCCTGATCTATTATACAGCTCAACTGGCAGAAGGG
 GTCCCGTCAAGGTTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGTCAGACTATTCTCTGACAATCAGC
 AACCTGGAGTCTGAAGATTTTGCAGACTATTACTGTCTACAGTTTTATGAGTTTCCTC
 CGACGTTCCGGTGGAGGCACCAAGCTGGAAATCAA (SEQ ID NO:127).

ii. Cadena pesada

Sus regiones variables de cadena pesada tienen la siguiente secuencia de aminoácidos:

EVQLQQSGTIVLARPGASVKMSCASGYPFTSYWMHWVKQRPGQGLEWIGAIYPGNSD
TRYNPNFKGKANLITAVTSATTAYMELSSLTNEESAVYYCTSTWTHYFDYWGQGTLT
VSS (SEQ ID NO:128).

Las CDR de la SEQ ID NO: 128 están en negrita y subrayadas y son:

CDR1 **SYWMH** (SEQ ID NO: 9);
 CDR2 **AIYPGNSDTRYNPNFKG** (SEQ ID NO: 129); y
 CDR3 **TWTHYFDY** (SEQ ID NO: 130).

También se divulga un ácido nucleico que codifica una cadena pesada (SEQ ID NO: 128).

También se divulga un ácido nucleico ilustrativo que codifica la cadena pesada (SEQ ID NO: 130) que es

GAGGTT CAGCTCCAGCAGTCTGGGACTGTGCTGGCAAGGCCTGGGGCTTCAGTGAA
 GATGTCCTGCAAGGCTTCTGGCTACCCCTTTACCAGCTACTGGATGCACTGGGTA
 GCAGAGGCCTGGACAGGGTCTGGAATGGATTGGCGCTATTTATCCTGGAAATAGTG
 AACTAGGTACAACCCGAATTTCAAGGGCAAGGCCAACCTGACTGCAGTCACATCT
 GCCACCACTGCCTACATGGAGCTCAGCAGCCTGACAAATGAGGAATCTGCGGTCTA
 TTACTGTACAAGTACCTGGACCCACTACTTTGACTACTGGGGCCAAGGCACCACTCT
 CACAGTCTCCTCA (SEQ ID NO:131).

También es posible obtener anticuerpos anti-B7-H4 que tengan las LCDR y/o HCDR de B10D7 resaltadas anteriormente.

Preferentemente, el anticuerpo monoclonal tiene una cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13 y una cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 128.

V. Anticuerpos activos

Los dominios variables difieren en secuencia entre anticuerpos y se utilizan en la unión y especificidad de cada anticuerpo particular por su antígeno particular. Sin embargo, la variabilidad no suele distribuirse uniformemente por los dominios variables de los anticuerpos. Normalmente, se concentra en tres segmentos llamados regiones determinantes de la complementariedad (CDR) o regiones hipervariables, tanto en los dominios variables de cadena ligera como de cadena pesada. Las partes más altamente conservadas de los dominios variables se denominan regiones marco (FR, del inglés *framework regions*). Cada uno de los dominios variables de las cadenas pesadas y ligeras naturales comprenden cuatro regiones FR, que adoptan en gran parte una configuración de lámina β, conectadas mediante tres CDR, que forman bucles que conectan y, en algunos casos, forman parte de, la estructura de lámina β. Las CDR en cada cadena se mantienen juntas muy cerca de las regiones FR y, con las CDR de la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio de unión a antígeno de los anticuerpos.

También se divulgan fragmentos de anticuerpos que tienen bioactividad. Los fragmentos, ya sean unidos a otras secuencias o no, incluyen inserciones, eliminaciones, sustituciones u otras modificaciones seleccionadas de regiones particulares o residuos de aminoácidos específicos, siempre que la actividad del fragmento no se altere o deteriore significativamente en comparación con el anticuerpo o fragmento de anticuerpo no modificado.

También se pueden adaptar técnicas para la producción de anticuerpos monocatenarios específicos de B7-H4. Los expertos en la materia conocen bien los métodos para la producción de anticuerpos monocatenarios. Se puede crear un anticuerpo monocatenario mediante la fusión de los dominios variables de las cadenas pesada y ligera utilizando un enlazador peptídico corto, reconstituyendo así un sitio de unión a antígeno en una sola molécula. Se han desarrollado fragmentos variables de anticuerpos monocatenarios (scFv) en los que el extremo C de un dominio variable está unido al extremo N del otro dominio variable mediante un péptido o enlazador de 15 a 25 aminoácidos sin alterar significativamente la unión al antígeno o la especificidad de la unión. El enlazador se elige para permitir que la cadena pesada y la cadena ligera se unan en su orientación conformacional adecuada.

Se pueden genomanipular fragmentos variables monocatenarios divalentes (di-scFv) uniendo dos scFv. Esto se puede hacer produciendo una sola cadena peptídica con dos regiones VH y dos VL, lo que produce scFv en tándem. Los scFv también se pueden genomanipular con péptidos enlazadores que son demasiado cortos para que las dos regiones variables se plieguen juntas (aproximadamente cinco aminoácidos), lo que obliga a los scFv a dimerizarse. Este tipo se conoce como diacuerpos. Se ha demostrado que los diacuerpos tienen constantes de disociación hasta 40 veces más bajas que los scFv correspondientes, lo que significa que tienen una afinidad mucho mayor por su diana. Los enlazadores aún más cortos (uno o dos aminoácidos) conducen a la formación de trímeros (triacuerpos o tricuerpos). También se han producido tetracuerpos. Presentan una afinidad aún mayor por sus dianas que los diacuerpos.

El anticuerpo monoclonal puede obtenerse a partir de una población de anticuerpos sustancialmente homogénea, es decir, los anticuerpos individuales dentro de la población son idénticos excepto por posibles mutaciones de origen natural que pueden estar presentes en un pequeño subconjunto de moléculas de anticuerpo. Los anticuerpos monoclonales incluyen anticuerpos "quiméricos" en los que una parte de la cadena pesada y/o ligera es idéntica u homóloga a las secuencias correspondientes en los anticuerpos procedentes de una especie particular o pertenecientes a una clase o subclase de anticuerpo en particular, mientras que el resto de la(s) cadena(s) es idéntico u homólogo a secuencias correspondientes en anticuerpos procedentes de otra especie o que pertenecen a otra clase o subclase de anticuerpo, así como fragmentos de dichos anticuerpos, siempre que presenten la actividad antagonista deseada.

Los anticuerpos deben unirse específicamente a B7-H4 humana.

También se divulgan anticuerpos producidos por un hibridoma del grupo que consiste en B1A1, B1H1, B1H3, B1H10, B2E6, B4B2, B4E11, B6C8, B9H1 y B10D7.

Por un lado, los anticuerpos contra B7-H4 pueden ser capaces de inducir citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (CCDA), citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) o apoptosis celular a través de otros mecanismos, de células que expresan B7-H4.

Por otro lado, además, puede ser posible identificar anticuerpos inmunomoduladores, que pueden ser agonistas o antagonistas de la señalización B7-H4. La actividad (es decir, agonista o antagonista) de un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que es específico para B7-H4, se puede determinar mediante ensayos funcionales que se conocen en la materia e incluyen los ensayos que se comentan a continuación. Normalmente, los ensayos incluyen determinar si el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo aumenta (es decir, agonista) o disminuye (es decir, antagonista) la señalización a través de B7-H4. Debido a que la transducción de señales B7-H4 da como resultado una respuesta inmunitaria supresora, B7-H4 agonizante provoca una respuesta inmunitaria suprimida o reducida. La señalización B7-H4 antagonizante inhibe la respuesta inmunosupresora, lo que da lugar a un aumento general de la respuesta inmunitaria. Normalmente, el anticuerpo debería unirse inmunoespecíficamente a B7-H4 y, en particular, al dominio extracelular de B7-H4. Dicho anticuerpo puede unirse a B7-H4:

- (I) dispuesto en la superficie de una célula (especialmente una célula viva);
- (II) dispuesto en la superficie de una célula (especialmente una célula viva) en una concentración endógena;
- (III) dispuesto en la superficie de una célula viva y modula la unión entre B7-H4 y un ligando del mismo;
- (IV) dispuesto en la superficie de una célula viva y reduce o inhibe la supresión inmunitaria por B7-H4;
- (V) dispuesto en la superficie de una célula viva e induce o mejora la supresión inmunitaria por B7-H4;
- (VI) dispuesto en la superficie de una célula viva, en donde la célula es una célula tumoral;
- (VII) combinaciones de I a IV y VI;
- (VIII) combinaciones de I a III y V a IV; y
- (IX) dispuesto en la superficie de células cancerosas procedentes de mieloides o linfoides (AML o ALL) vivas, y mejora la apoptosis y la diferenciación, lo que da lugar a una reducción de la autorrenovación de las células madre cancerosas.

Para preparar un anticuerpo que se une específicamente a B7-H4, se pueden utilizar proteínas purificadas, polipéptidos, fragmentos, fusiones o epítopos de B7-H4 o polipéptidos expresados a partir de secuencias de ácido nucleico de los mismos. Los anticuerpos se pueden preparar mediante cualquier método adecuado conocido en la materia, tal como los que se comentan con más detalle a continuación.

i. Anticuerpos humanos y humanizados

Muchos anticuerpos no humanos (por ejemplo, los procedentes de ratones, ratas o conejos) son naturalmente antigénicos en seres humanos y, por lo tanto, pueden dar lugar a respuestas inmunitarias indeseables cuando se administran a seres humanos. Por tanto, el uso de anticuerpos humanos o humanizados en los métodos sirve para disminuir la posibilidad de que un anticuerpo administrado a un ser humano provoque una respuesta inmunitaria indeseable.

Se pueden emplear animales transgénicos (por ejemplo, ratones) que son capaces, tras la inmunización, de producir

un repertorio completo de anticuerpos humanos en ausencia de producción de inmunoglobulina endógena. Por ejemplo, se ha descrito que la eliminación homocigota del gen de la región de unión de la cadena pesada (J(H)) del anticuerpo en ratones quiméricos y mutantes de la línea germinal da como resultado la inhibición completa de la producción de anticuerpos endógenos. La transferencia del conjunto de genes de inmunoglobulina de la línea germinal humana en dichos ratones mutantes de la línea germinal dará como resultado la producción de anticuerpos humanos tras la exposición al antígeno.

Opcionalmente, los anticuerpos se generan en otras especies y se "humanizan" para su administración en seres humanos. Las formas "humanizadas" de anticuerpos no humanos (p. ej., murinos) son inmunoglobulinas quiméricas, cadenas de inmunoglobulina o fragmentos de las mismas (tales como Fv, Fab, Fab', F(ab')₂ u otras subsecuencias de anticuerpos de unión a antígeno) que contienen una secuencia mínima procedente de una inmunoglobulina no humana. Los anticuerpos humanizados incluyen inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en las cuales los residuos de una región determinante de la complementariedad (CDR) del anticuerpo receptor se reemplazan por residuos de una CDR de una especie no humana (anticuerpo donante), tales como ratón, rata o conejo, que tienen la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, los residuos estructurales de Fv de la inmunoglobulina humana se reemplazan por los correspondientes residuos no humanos. Los anticuerpos humanizados también pueden contener residuos que no se encuentran en el anticuerpo receptor ni en la CDR o secuencias marco importadas. En general, el anticuerpo humanizado contendrá sustancialmente la totalidad de al menos uno, y normalmente dos, dominios variables, en los que todas, o sustancialmente todas, las regiones CDR corresponden a las de una inmunoglobulina no humana, y todas, o sustancialmente todas, las regiones FR son las de una secuencia consenso de inmunoglobulina humana. Opcionalmente, el anticuerpo humanizado también contendrá al menos una parte de una región constante de inmunoglobulina (Fc), normalmente la de una inmunoglobulina humana.

En la materia se conocen métodos para humanizar anticuerpos no humanos. En general, un anticuerpo humanizado tiene uno o más residuos de aminoácidos introducidos en él a partir de una fuente que no es humana. Estos residuos de aminoácidos no humanos se citan a menudo como residuos "importados", que se toman normalmente de un dominio variable "importado". Las técnicas de humanización de anticuerpos generalmente implican el uso de tecnología de ADN recombinante para manipular la secuencia de ADN que codifica una o más cadenas polipeptídicas de una molécula de anticuerpo. La humanización se puede realizar esencialmente mediante la sustitución de CDR o secuencias de CDR de roedor por las secuencias correspondientes de un anticuerpo humano. Por consiguiente, una forma humanizada de un anticuerpo no humano (o un fragmento del mismo) es un anticuerpo o fragmento quimérico, en donde sustancialmente menos de un dominio variable humano intacto se ha sustituido por la secuencia correspondiente de una especie no humana. En la práctica, los anticuerpos humanizados son normalmente anticuerpos humanos en los que algunos residuos de la CDR y posiblemente algunos residuos de la FR están sustituidos por residuos procedentes de sitios análogos en anticuerpos de roedor.

La elección de los dominios variables humanos, tanto ligeros como pesados, para su uso en la fabricación de los anticuerpos humanizados es muy importante para reducir la antigenicidad. De acuerdo con el método de "mejor ajuste", la secuencia del dominio variable de un anticuerpo de roedor se explora frente a la toda la biblioteca de secuencias conocidas de dominio variable humano. La secuencia humana que es la más cercana a la del roedor se acepta a continuación como la región estructural (FR) humana para el anticuerpo humanizado. Otro método utiliza una estructura particular procedente de la secuencia consenso de todos los anticuerpos humanos de un subgrupo particular de cadenas ligera o pesada. Se puede utilizar la misma estructura para diferentes anticuerpos humanizados.

Además, es importante que los anticuerpos se humanicen conservando una afinidad elevada por el antígeno y otras propiedades biológicas favorables. Para conseguir este objetivo, pueden prepararse anticuerpos humanizados mediante un proceso de análisis de las secuencias precursoras y diversos productos humanizados conceptuales usando modelos tridimensionales de las secuencias precursoras y humanizadas. Los modelos tridimensionales de inmunoglobulinas están comúnmente disponibles y son familiares para aquellos expertos en la materia. Se dispone de programas informáticos que ilustran y exponen posibles estructuras conformacionales tridimensionales de secuencias seleccionadas de la inmunoglobulina candidata. La inspección de estas presentaciones permite analizar el papel probable de los residuos en el funcionamiento de la secuencia de inmunoglobulina candidata, es decir, el análisis de los residuos que influyen en la capacidad de la inmunoglobulina candidata para unirse a su antígeno. De este modo, los residuos de FR pueden seleccionarse y combinarse a partir de las secuencias consenso e importadas de tal manera que se logra la característica deseada del anticuerpo, de tal manera que se consigue una afinidad aumentada por el antígeno (o antígenos) diana. En general, los residuos de la CDR están directamente y más sustancialmente implicados en la influencia sobre la unión al antígeno.

El anticuerpo puede unirse a un sustrato o marcarse con una fracción detectable o unirse y marcarse. Las fracciones detectables contempladas en las presentes composiciones incluyen marcadores fluorescentes, enzimáticos y radiactivos.

ii. *Anticuerpos monocatenarios*

Los expertos en la materia conocen bien los métodos para la producción de anticuerpos monocatenarios. Se crea un

anticuerpo monocatenario mediante la fusión de los dominios variables de las cadenas pesada y ligera utilizando un enlazador peptídico corto, reconstituyendo así un sitio de unión a antígeno en una sola molécula. Se han desarrollado fragmentos variables de anticuerpos monocatenarios (scFv) en los que el extremo C de un dominio variable está unido al extremo N del otro dominio variable mediante un péptido o enlazador de 15 a 25 aminoácidos sin alterar significativamente la unión al antígeno o la especificidad de la unión. El enlazador se elige para permitir que la cadena pesada y la cadena ligera se unan en su orientación conformacional adecuada. Estos Fv carecen de las regiones constantes (Fc) presentes en las cadenas pesada y ligera del anticuerpo nativo.

iii. *Anticuerpos monovalentes*

También son adecuados métodos *in vitro* para preparar anticuerpos monovalentes. La digestión de anticuerpos para producir fragmentos de los mismos, en particular, fragmentos Fab, se puede realizar mediante técnicas habituales conocidas en la materia. Por ejemplo, la digestión se puede realizar utilizando papaína. Normalmente, la digestión con papaína de los anticuerpos produce dos fragmentos de unión a antígeno idénticos, llamados fragmentos Fab, cada uno con un solo sitio de unión a antígeno y un fragmento Fc residual. El tratamiento con pepsina produce un fragmento, llamado fragmento F(ab')₂, que tiene dos sitios de combinación de antígenos y sigue siendo capaz de entrecruzar antígenos.

Los fragmentos Fab producidos en la digestión del anticuerpo también contienen los dominios constantes de la cadena ligera y el primer dominio constante de la cadena pesada. Los fragmentos Fab' difieren de los fragmentos Fab en la adición de unos pocos residuos en el extremo carboxílico del dominio de cadena pesada, incluidas una o más cisteínas de la región bisagra del anticuerpo. El fragmento F(ab')₂ es un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab' unidos mediante un puente disulfuro en la región bisagra. Fab'-SH es la denominación en el presente documento para Fab' en el que el uno o más residuos de cisteína de los dominios constantes portan un grupo tiol libre. Los fragmentos de anticuerpo originalmente se produjeron como pares de fragmentos Fab' que tienen cisteínas de bisagra entre ellos. También se conocen otros acoplamientos químicos de fragmentos de anticuerpo.

iv. *Anticuerpos híbridos*

El anticuerpo puede ser un anticuerpo híbrido. En los anticuerpos híbridos, un par de cadenas pesada y ligera es homólogo al que se encuentra en un anticuerpo generado contra un epítipo, mientras que el otro par de cadenas pesada y ligera es homólogo a un par encontrado en un anticuerpo generado contra otro epítipo. Esto da como resultado la propiedad de valencia multifuncional, es decir, la capacidad de unirse al menos a dos epítopos diferentes de manera simultánea. Dichos híbridos se pueden formar mediante fusión de hibridomas que producen los respectivos anticuerpos componentes, o mediante técnicas recombinantes. Por supuesto, dichos híbridos también pueden formarse con cadenas quiméricas.

v. *Conjugados o fusiones de fragmentos de anticuerpos*

La función de direccionamiento del anticuerpo se puede utilizar terapéuticamente mediante el acoplamiento del anticuerpo o un fragmento del mismo con un agente terapéutico. Dicho acoplamiento del anticuerpo o fragmento (por ejemplo, al menos una parte de una región constante de inmunoglobulina (Fc)) con el agente terapéutico se puede lograr mediante la preparación de un inmunoconjugado o mediante la elaboración de una proteína de fusión, que comprende el anticuerpo o fragmento de anticuerpo y el agente terapéutico.

Dicho acoplamiento del anticuerpo o fragmento con el agente terapéutico se puede lograr mediante la preparación de un inmunoconjugado o mediante la elaboración de una proteína de fusión, o mediante la unión del anticuerpo o fragmento a un ácido nucleico, tal como un ARNip, que comprende el anticuerpo o fragmento de anticuerpo y el agente terapéutico.

Un anticuerpo puede modificarse para alterar su semivida. En algunos casos, es deseable aumentar la semivida del anticuerpo para que esté presente en la circulación o en el sitio de tratamiento durante períodos de tiempo más prolongados. Por ejemplo, puede ser deseable mantener los valores del anticuerpo en la circulación o en el lugar a tratar durante períodos de tiempo prolongados. Los anticuerpos se pueden genomanipular con variantes de Fc que prolongan la semivida, por ejemplo, mediante tecnología de prolongación de la semivida de los anticuerpos Xtend™ (Xencor, Monrovia, CA). En otros casos, la semivida del anticuerpo anti-ADN disminuye para reducir los posibles efectos secundarios. Los conjugados divulgados se pueden utilizar para modificar una respuesta biológica dada. La fracción farmacológica no se limita a los agentes terapéuticos químicos clásicos. Por ejemplo, la fracción farmacológica puede ser una proteína o un polipéptido que posea una actividad biológica deseada. Dichas proteínas pueden incluir, por ejemplo, una toxina, tal como abrina, ricina A, exotoxina de pseudomonas o toxina diftérica.

vi. *Anticuerpos B7H4 ilustrativos*

El anticuerpo anti-B7-H4 proporcionado por la presente invención es un anticuerpo que comprende:

- (a) una cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEQ ID NO: 63; y

(b) una cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEQ ID NO: 81

Se divulgan, pero no se reivindican, otros anticuerpos, que incluyen una o más cadenas pesadas y una o más cadenas ligeras de ratón, un anticuerpo anti-B7H4 humano descrito anteriormente, o que incluye algunas o todas las CDR de cadena ligera, toda la región variable de cadena ligera, algunas o todas las CDR de cadena pesada, toda la región variable de cadena pesada, o una combinación de las mismas de cualquiera de los anticuerpos de ratón anti-B7H4 humano.

Combinaciones ilustrativas son anticuerpos anti-B7-H4 que tienen una cadena ligera con una secuencia de aminoácidos de acuerdo con una cualquiera de SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27 y SEQ ID NO: 28; y una cadena pesada con una secuencia de aminoácidos de acuerdo con una cualquiera de SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 44 y SEQ ID NO: 45

VI. Modificaciones polipeptídicas

Un anticuerpo de la invención puede modificarse mediante fracciones químicas que pueden estar presentes en polipéptidos en un entorno celular normal, por ejemplo, fosforilación, metilación, amidación, sulfatación, acilación, glucosilación, sumoilación y ubiquitilación.

Un anticuerpo de la invención también puede modificarse mediante fracciones químicas que normalmente no se añaden a los polipéptidos en un entorno celular. Por ejemplo, también pueden modificarse mediante unión covalente de cadenas poliméricas, que incluyen, pero sin limitación, cadenas de polímero de polietilenglicol (PEG) (es decir, pegilación). La conjugación de macromoléculas con PEG ha surgido recientemente como una estrategia eficaz para alterar los perfiles farmacocinéticos (PK) de una variedad de fármacos y, por tanto, para mejorar su potencial terapéutico. La conjugación con PEG aumenta la retención de fármacos en la circulación mediante la protección contra la digestión enzimática, la ralentización de la filtración por los riñones y la reducción de la generación de anticuerpos neutralizantes. Además, se pueden utilizar conjugados de PEG para permitir la multimerización de las proteínas de fusión.

Se pueden introducir modificaciones en la molécula haciendo reaccionar residuos de aminoácidos específicos del anticuerpo con un agente de modificación orgánico que sea capaz de reaccionar con cadenas laterales o residuos terminales seleccionados.

Ejemplos de derivados químicos del anticuerpo incluyen residuos lisinilo y amino terminales modificados con anhídridos de ácido succínico u otros anhídridos de ácido carboxílico. La modificación con un anhídrido carboxílico cíclico tiene el efecto de invertir la carga de los residuos de lisinilo. Otros reactivos adecuados para modificar residuos que contienen amino incluyen imidoésteres, tales como picolinimidato de metilo; fosfato de piridoxal; piridoxal; cloroborohidruro; ácido trinitrobenzenosulfónico; *O*-metilisourea; 2,4-pentanodiona; y reacción catalizada por transaminasas con glioxilato. Los grupos laterales carboxilo, aspartilo o glutamilo, pueden modificarse selectivamente mediante reacción con carbodiimidias (R-N=C=N-R'), tales como 1-ciclohexil-3-(2-morfolinil-(4-etil)carbodiimida o 1-etil-3-(4-azonia-4,4-dimetilpentil)carbodiimida. Además, los residuos de aspartilo y glutamilo se pueden convertir en residuos de asparaginilo y glutaminilo mediante reacción con amoniaco.

VII. Codificación de ácidos nucleicos, vectores y células hospedadoras

La presente invención proporciona una secuencia de ácido nucleico o secuencias de ácido nucleico que codifican un anticuerpo de la presente invención. La secuencia de ácido nucleico de la invención puede ser una secuencia de ácido nucleico aislada.

Como se utiliza en el presente documento, "ácido nucleico aislado" se refiere a un ácido nucleico que está separado de otras moléculas de ácido nucleico que están presentes en un genoma de mamífero, incluidos ácidos nucleicos que normalmente flanquean uno o ambos lados del ácido nucleico en un genoma de mamífero. El término "aislado", como se utiliza en el presente documento con respecto a los ácidos nucleicos, también incluye la combinación con cualquier secuencia de ácido nucleico de origen no natural, ya que dichas secuencias de origen no natural no se encuentran en la naturaleza y no tienen secuencias inmediatamente contiguas en un genoma de origen natural.

Un ácido nucleico aislado puede ser, por ejemplo, una molécula de ADN, siempre que esté ausente o se elimine una de las secuencias de ácido nucleico normalmente encontradas inmediatamente flanqueantes a dicha molécula de ADN en un genoma de origen natural. Por lo tanto, un ácido nucleico aislado incluye, sin limitación, una molécula de ADN que existe como una molécula separada independiente de otras secuencias (por ejemplo, un ácido nucleico sintetizado químicamente, o un ADNc o fragmento de ADN genómico producido mediante PCR o tratamiento con endonucleasas de restricción), así como ADN recombinante que se incorpora a un vector, un plásmido de replicación autónoma, un virus (por ejemplo, un retrovirus, lentivirus, adenovirus o herpes virus) o en el ADN genómico de un procarionte o eucariota. Los ácidos nucleicos que codifican un anticuerpo pueden optimizarse para su expresión en el hospedador de expresión elegido. Los codones pueden sustituirse con codones alternativos que codifican el mismo

aminoácido para tener en cuenta las diferencias en el uso de codones entre el mamífero del que procede la secuencia de ácido nucleico y el hospedador de expresión. De esta manera, los ácidos nucleicos pueden sintetizarse mediante codones de expresión preferidos del hospedador.

5 Los ácidos nucleicos, tales como los descritos anteriormente, se pueden insertar en vectores para su expresión en células. Por tanto, la presente invención proporciona un vector que comprende una secuencia de ácido nucleico o secuencias de ácido nucleico de la presente invención. Como se utiliza en el presente documento, un "vector" es un replicón, tal como un plásmido, fago, virus o cósmido, en el que se puede insertar otro segmento de ADN para lograr la replicación del segmento insertado. Los vectores pueden ser vectores de expresión. Un "vector de expresión" es un
10 vector que incluye una o más secuencias de control de la expresión, y una "secuencia de control de la expresión" es una secuencia de ADN que controla y regula la transcripción y/o traducción de otra secuencia de ADN.

Los ácidos nucleicos en vectores se pueden unir operativamente a una o más secuencias de control de la expresión. Como se utiliza en el presente documento, "unido operativamente" significa incorporado en una construcción genética de modo que las secuencias de control de la expresión controlen de manera eficaz la expresión de una secuencia codificante de interés. Ejemplos de las secuencias de control de la expresión incluyen promotores, potenciadores y regiones de terminación de la transcripción. Un promotor es una secuencia de control de la expresión compuesta por una región de una molécula de ADN, normalmente dentro de los 100 nucleótidos cadena arriba del punto en el que comienza la transcripción (generalmente cerca del sitio de inicio de la ARN polimerasa II). Para poner una secuencia codificadora bajo el control de un promotor, es necesario colocar el sitio de inicio de la traducción del marco de lectura traduccional del polipéptido entre uno y aproximadamente cincuenta nucleótidos cadena abajo del promotor. Los potenciadores proporcionan especificidad de expresión en términos de tiempo, ubicación y nivel. A diferencia de los promotores, los potenciadores pueden funcionar cuando se encuentran a varias distancias del sitio de transcripción. También se puede ubicar un potenciador cadena abajo del sitio de inicio de la transcripción. Una secuencia codificante está "unida operativamente" y "bajo el control" de secuencias de control de la expresión en una célula cuando la ARN polimerasa es capaz de transcribir la secuencia codificante en ARNm, que después se puede traducir en la proteína codificada por la secuencia codificante.

Los vectores de expresión adecuados incluyen, sin limitación, plásmidos y vectores víricos procedentes de, por ejemplo, bacteriófago, baculovirus, virus del mosaico del tabaco, virus del herpes, citomegalovirus, retrovirus, virus vaccinia, adenovirus y virus adenoasociados. Hay numerosos vectores y sistemas de expresión disponibles en el mercado de empresas tales como Novagen (Madison, WI), Clontech (Palo Alto, CA), Stratagene (La Jolla, CA) e Invitrogen Life Technologies (Carlsbad, CA).

35 Un vector de expresión puede incluir una secuencia marcadora. Las secuencias marcadoras, normalmente se expresan como una fusión con el polipéptido codificado. Dichos marcadores pueden insertarse en cualquier parte dentro del polipéptido, incluyendo en uno cualquiera de los extremos carboxilo o amino. Ejemplos de marcadores útiles incluyen, pero sin limitación, proteína verde fluorescente (GFP), glutatión S-transferasa (GST), polihistidina, c-myc, hemaglutinina, marcador Flag™ (Kodak, New Haven, CT), proteína de unión a maltosa E y proteína A.

Los vectores que contienen ácidos nucleicos a expresar pueden transferirse a células hospedadoras. Se pretende que la expresión "célula hospedadora" incluya células procariotas y eucariotas en las que se puede introducir un vector de expresión recombinante. Como se utiliza en el presente documento, "transformado" y "transfectado" abarcan la introducción de una molécula de ácido nucleico (por ejemplo, un vector) en una célula mediante una de varias técnicas. Aunque no se limita a una técnica particular, varias de estas técnicas están bien establecidas en la materia. Los ácidos nucleicos se pueden transfectar en células de mamíferos mediante técnicas que incluyen, por ejemplo, coprecipitación con fosfato de calcio, transfección mediada por DEAE-dextrano, lipofección, electroporación o microinyección. Se pueden utilizar células hospedadoras (por ejemplo, una célula procariota o una célula eucariota, tal como una célula CHO) para, por ejemplo, producir las proteínas, polipéptidos, fragmentos, variantes y fusiones de los mismos descritas en el presente documento.

Los vectores descritos se pueden utilizar para expresar un anticuerpo en células.

VIII. Composiciones

55 La presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo anti-B7-H4 de la presente invención. Una composición farmacéutica divulgada en el presente documento se administra a un sujeto en una cantidad terapéuticamente eficaz. Como se usa en el presente documento, la expresión "cantidad eficaz" o "cantidad terapéuticamente eficaz" significa una dosis suficiente para tratar, inhibir o aliviar uno o más síntomas del trastorno que se está tratando o para proporcionar de otro modo un efecto farmacológico y/o fisiológico deseado. La dosificación precisa variará de acuerdo con una diversidad de factores, tales como variables dependientes del sujeto (por ejemplo, edad, salud del sistema inmunitario, etc.), la enfermedad y el tratamiento afectado.

65 Se puede administrar un anticuerpo localmente, por ejemplo, mediante inyección directamente en un sitio a tratar. Normalmente, la inyección provoca un aumento de la concentración localizada del anticuerpo que es mayor que la que se puede conseguir mediante administración sistémica. El anticuerpo se puede combinar con una matriz como se

describió anteriormente para ayudar a crear una mayor concentración localizada del anticuerpo reduciendo la difusión pasiva del anticuerpo fuera del sitio a tratar.

5 En algunos casos, las composiciones divulgadas en el presente documento, incluyendo un anticuerpo, se administran en una solución acuosa, por inyección parenteral. La formulación también puede estar en forma de suspensión o emulsión. En general, se proporcionan composiciones farmacéuticas que incluyen cantidades eficaces de anticuerpo y, opcionalmente, incluyen diluyentes farmacéuticamente aceptables, conservantes, solubilizantes, emulsionantes, adyuvantes y/o vehículos. Dichas composiciones incluyen opcionalmente una o más de las siguientes: diluyentes, 10 agua estéril, solución salina tamponada con diferente contenido de tampón (por ejemplo, Tris-HCl, acetato y fosfato), pH y fuerza iónica; y aditivos, tales como detergentes y agentes solubilizantes (por ejemplo, TWEEN 20 (polisorbato-20), Tween 80 (polisorbato-80)), antioxidantes (por ejemplo, ácido ascórbico, metabisulfito de sodio) y conservantes (por ejemplo, timersol, alcohol bencílico) y sustancias voluminizadoras (por ejemplo, lactosa, manitol). Los ejemplos de disolventes o vehículos no acuosos son propilenglicol, polietilenglicol, aceites vegetales, tales como aceite de oliva y aceite de maíz, gelatina y ésteres orgánicos inyectables, tales como oleato de etilo. Las formulaciones pueden 15 liofilizarse y redisolverse/resuspenderse inmediatamente antes de su uso. La formulación puede esterilizarse mediante, por ejemplo, filtración a través de un filtro de retención de bacterias, la incorporación de agentes esterilizantes a las composiciones, la irradiación de las composiciones o el calentamiento de las composiciones.

20 También se puede administrar un anticuerpo en formulaciones de liberación controlada. Se pueden fabricar dispositivos poliméricos de liberación controlada para una liberación sistémica a largo plazo después de la implantación de un dispositivo polimérico (barra, cilindro, película, disco) o inyección (micropartículas). La matriz puede estar en forma de micropartículas, tales como microesferas, donde el agente está disperso dentro de una matriz polimérica sólida, o microcápsulas, donde el núcleo es de un material diferente al de la cubierta polimérica, y el anticuerpo está disperso o suspendido en el núcleo, que puede ser de naturaleza líquida o sólida. Salvo que se defina 25 específicamente en el presente documento, micropartículas, microesferas y microcápsulas se usan indistintamente. Como alternativa, el polímero se puede moldear como una losa o película delgada, que varía de nanómetros a cuatro centímetros, un polvo producido mediante molienda u otras técnicas convencionales, o incluso un gel, tal como un hidrogel.

30 Se pueden utilizar matrices biodegradables o no biodegradables para la administración del anticuerpo, aunque en algunas realizaciones se prefieren matrices biodegradables. Estas pueden ser polímeros naturales o sintéticos, aunque en algunas realizaciones se prefieren los polímeros sintéticos debido a la mejor caracterización de los perfiles de degradación y liberación. El polímero se selecciona basándose en el período durante el cual se desea la liberación. En algunos casos, la liberación lineal puede ser más útil, aunque en otros, una liberación por impulsos o una "liberación 35 masiva" puede proporcionar resultados más eficaces. El polímero puede estar en forma de hidrogel (normalmente absorbiendo hasta aproximadamente un 90 % en peso de agua) y, opcionalmente, se puede reticular con polímeros o iones multivalentes.

40 Las matrices pueden formarse mediante evaporación de disolvente, secado por pulverización, extracción con disolvente y otros métodos conocidos por los expertos en la materia. Se pueden preparar microesferas bioerosionables usando cualquiera de los métodos desarrollados para fabricar microesferas para el suministro de fármacos, por ejemplo, como se describe en Mathiowitz y Langer, *J. Controlled Release*, 5:13-22 (1987); Mathiowitz, *et al.*, *Reactive Polymers*, 6:275-283 (1987); y Mathiowitz, *et al.*, *J. Appl. Polymer Sci.*, 35:755-774 (1988).

45 El anticuerpo se puede formular para liberación local para tratar el área de implante o inyección, que normalmente administrará una dosis que es mucho menor que la dosis para el tratamiento de todo el cuerpo, o administración sistémica. Estos pueden implantarse o inyectarse por vía subcutánea, en el músculo, la grasa o tragarse. Las composiciones farmacéuticas que incluyen los anticuerpos divulgados pueden ser para administración por vía parenteral (inyección intramuscular, intraperitoneal, intravenosa (i.v.) o subcutánea), y pueden formularse en formas 50 de dosificación adecuadas para cada vía de administración.

Las composiciones divulgadas en el presente documento se deben administrar a un sujeto en una cantidad terapéuticamente eficaz. Como se usa en el presente documento, la expresión "cantidad eficaz" o "cantidad terapéuticamente eficaz" significa una dosis suficiente para tratar, inhibir o aliviar uno o más síntomas del trastorno que se está tratando o para proporcionar de otro modo un efecto farmacológico y/o fisiológico deseado. La dosificación 55 precisa variará de acuerdo con una diversidad de factores, tales como variables dependientes del sujeto (por ejemplo, edad, salud del sistema inmunitario, etc.), la enfermedad y el tratamiento afectado.

IX. Métodos para producir anticuerpos

60 Los anticuerpos se pueden generar en cultivo celular, en fagos o en diversos animales, incluidos, pero sin limitación, vacas, conejos, cabras, ratones, ratas, hámsteres, cobayas, ovejas, perros, gatos, monos, chimpancés y simios. Por tanto, en un caso, un anticuerpo es un anticuerpo de mamífero. Pueden usarse técnicas de fagos para aislar un anticuerpo inicial o para generar variantes con características de especificidad o avided alteradas. Tales técnicas son 65 habituales y bien conocidas en la materia. En un caso, el anticuerpo se produce mediante métodos recombinantes conocidos en la materia. Por ejemplo, puede producirse un anticuerpo recombinante transfectando una célula

hospedadora con un vector que comprende una secuencia de ADN que codifica el anticuerpo. Se pueden utilizar uno o más vectores para transfectar la secuencia de ADN que expresa al menos una región VL y una VH en la célula hospedadora. Las descripciones ilustrativas de medios recombinantes de generación y producción de anticuerpos incluyen Delves, *Antibody Production: Essential Techniques* (Wiley, 1997); Shephard, *et al.*, *Monoclonal Antibodies* (Oxford University Press, 2000); Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice* (Academic Press, 1993); Current Protocols in Immunology (John Wiley & Sons, la edición más reciente).

Los anticuerpos divulgados se pueden modificar mediante medios recombinantes para aumentar la eficacia del anticuerpo en la mediación de la función deseada. Por lo tanto, está dentro del alcance de la invención que los anticuerpos puedan modificarse mediante sustituciones usando medios recombinantes. Normalmente, las sustituciones serán sustituciones conservadoras. Por ejemplo, al menos un aminoácido en la región constante del anticuerpo puede reemplazarse por un residuo diferente. Véanse, por ejemplo, la patente de EE. UU. n.º 5,624,821, la patente de EE. UU. n.º 6,194,551, la solicitud n.º WO 9958572; y Angal, *et al.*, *Mol. Immunol.* 30:105-08 (1993). La modificación en aminoácidos incluye eliminaciones, adiciones y sustituciones de aminoácidos. En algunos casos, tales cambios se realizan para reducir las actividades no deseadas, por ejemplo, citotoxicidad dependiente del complemento. Con frecuencia, los anticuerpos se marcan uniendo, ya sea de manera covalente o no covalente, una sustancia que proporciona una señal detectable. Se conoce una amplia diversidad de marcadores y técnicas de conjugación y se informan extensamente en la bibliografía científica y de patentes. Estos anticuerpos se pueden detectar para determinar su unión a proteínas, polipéptidos o proteínas de fusión de B7-H4. Véase, por ejemplo, *Antibody Engineering: A Practical Approach* (Oxford University Press, 1996).

Por ejemplo, los anticuerpos adecuados con las actividades biológicas deseadas se pueden identificar con los siguientes ensayos *in vitro* que incluyen, pero sin limitación: proliferación, migración, adhesión, crecimiento en agar blando, angiogénesis, comunicación célula-célula, apoptosis, transporte, transducción de señales y ensayos *in vivo*, tales como la inhibición del crecimiento tumoral. Los anticuerpos proporcionados en el presente documento también pueden ser útiles en aplicaciones de diagnóstico. Como anticuerpos de captura o no neutralizantes, pueden cribarse para determinar la capacidad de unirse al antígeno específico sin inhibir la unión al receptor o la actividad biológica del antígeno. Como anticuerpos neutralizantes, los anticuerpos pueden ser útiles en ensayos de unión competitiva.

Los anticuerpos que se pueden utilizar en las composiciones y métodos divulgados incluyen inmunoglobulina completa (*es decir.*, un anticuerpo inalterado) de cualquier clase, fragmentos de las mismas y proteínas sintéticas que contienen al menos el dominio variable de unión a antígeno de un anticuerpo. Los dominios variables difieren en secuencia entre anticuerpos y se utilizan en la unión y especificidad de cada anticuerpo particular por su antígeno particular. Sin embargo, la variabilidad no suele distribuirse uniformemente por los dominios variables de los anticuerpos. Normalmente, se concentra en tres segmentos llamados regiones determinantes de la complementariedad (CDR) o regiones hipervariables, tanto en los dominios variables de cadena ligera como de cadena pesada. Las partes más altamente conservadas de los dominios variables se denominan regiones marco (FR, del inglés *framework regions*). Cada uno de los dominios variables de las cadenas pesadas y ligeras naturales comprenden cuatro regiones FR, que adoptan en gran parte una configuración de lámina β , conectadas mediante tres CDR, que forman bucles que conectan y, en algunos casos, forman parte de, la estructura de lámina β . Las CDR en cada cadena se mantienen juntas muy cerca de las regiones FR y, con las CDR de la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio de unión a antígeno de los anticuerpos.

También se divulgan fragmentos de anticuerpos que tienen bioactividad. Los fragmentos, ya sean unidos a otras secuencias o no, incluyen inserciones, eliminaciones, sustituciones u otras modificaciones seleccionadas de regiones particulares o residuos de aminoácidos específicos, siempre que la actividad del fragmento no se altere o deteriore significativamente en comparación con el anticuerpo o fragmento de anticuerpo no modificado.

También se pueden adaptar técnicas para la producción de anticuerpos monocatenarios específicos de un péptido antigénico. Los expertos en la materia conocen bien los métodos para la producción de anticuerpos monocatenarios. Se puede crear un anticuerpo monocatenario mediante la fusión de los dominios variables de las cadenas pesada y ligera utilizando un enlazador peptídico corto, reconstituyendo así un sitio de unión a antígeno en una sola molécula. Se han desarrollado fragmentos variables de anticuerpos monocatenarios (scFv) en los que el extremo C de un dominio variable está unido al extremo N del otro dominio variable mediante un péptido o enlazador de 15 a 25 aminoácidos sin alterar significativamente la unión al antígeno o la especificidad de la unión. El enlazador se elige para permitir que la cadena pesada y la cadena ligera se unan en su orientación conformacional adecuada.

Se pueden genomanipular fragmentos variables monocatenarios divalentes (di-scFv) uniendo dos scFv. Esto se puede hacer produciendo una sola cadena peptídica con dos regiones VH y dos VL, lo que produce scFv en tándem. Los scFv también se pueden genomanipular con péptidos enlazadores que son demasiado cortos para que las dos regiones variables se plieguen juntas (aproximadamente cinco aminoácidos), lo que obliga a los scFv a dimerizarse. Este tipo se conoce como diacuerpos. Se ha demostrado que los diacuerpos tienen constantes de disociación hasta 40 veces más bajas que los scFv correspondientes, lo que significa que tienen una afinidad mucho mayor por su diana. Los enlazadores aún más cortos (uno o dos aminoácidos) conducen a la formación de trímeros (triacuerpos o tricuerpos). También se han producido tetracuerpos. Presentan una afinidad aún mayor por sus dianas que los diacuerpos.

Un anticuerpo monoclonal se obtiene a partir de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos, es decir, los anticuerpos individuales dentro de la población son idénticos excepto por posibles mutaciones de origen natural que pueden estar presentes en un pequeño subconjunto de moléculas de anticuerpo. Los anticuerpos monoclonales incluyen anticuerpos "quiméricos" en los que una parte de la cadena pesada y/o ligera es idéntica u homóloga a las secuencias correspondientes en los anticuerpos procedentes de una especie particular o pertenecientes a una clase o subclase de anticuerpo en particular, mientras que el resto de la(s) cadena(s) es idéntico u homólogo a secuencias correspondientes en anticuerpos procedentes de otra especie o que pertenecen a otra clase o subclase de anticuerpo, así como fragmentos de dichos anticuerpos, siempre que presenten la actividad antagonista deseada.

Los anticuerpos monoclonales se pueden producir mediante cualquier procedimiento que produzca anticuerpos monoclonales. En un método de hibridoma, un ratón u otro animal hospedador adecuado se suele inmunizar con un agente inmunizante para producir linfocitos que produzcan o sean capaces de producir anticuerpos que se unirán específicamente al agente inmunizante. Como alternativa, los linfocitos pueden inmunizarse *in vitro*.

Los anticuerpos también pueden prepararse mediante métodos de ADN recombinante. El ADN que codifica los anticuerpos divulgados se puede aislar fácilmente y se secuencia mediante procedimientos convencionales (por ejemplo, con sondas oligonucleotídicas que son capaces de unirse específicamente a los genes que codifican las cadenas ligera y pesada de los anticuerpos murinos). También se pueden generar y seleccionar bibliotecas de anticuerpos o fragmentos de anticuerpos activos mediante técnicas de presentación en fagos.

También se conocen en la materia métodos para producir anticuerpos mediante química de proteínas. Un método para producir proteínas que comprenden los anticuerpos es unir dos o más péptidos o polipéptidos mediante técnicas de química de proteínas. Por ejemplo, los péptidos o polipéptidos se pueden sintetizar químicamente usando equipamiento de laboratorio disponible actualmente usando química de Fmoc (9-fluorenilmetiloxycarbonilo) o Boc (*tert*-butiloxycarbonilo). (Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA). Un experto en la materia puede entender de forma sencilla que se puede sintetizar un péptido o polipéptido correspondiente al anticuerpo, por ejemplo, mediante reacciones químicas convencionales. Por ejemplo, se puede sintetizar un péptido o polipéptido y no escindirse de su resina de síntesis mientras que el otro fragmento de un anticuerpo se puede sintetizar y escindirse posteriormente de la resina, exponiendo de este modo un grupo terminal que está bloqueado funcionalmente en el otro fragmento. Mediante reacciones de condensación de péptidos, estos dos fragmentos se pueden unir covalentemente mediante un enlace peptídico en sus extremos C y N, respectivamente, para formar un anticuerpo o fragmentan del mismo. Como alternativa, el péptido o polipéptido se sintetiza independientemente *in vivo* como se describe anteriormente. Una vez aislado, estos péptidos o polipéptidos independientes pueden unirse para formar un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo mediante reacciones de condensación de péptidos similares.

Por ejemplo, la unión enzimática de segmentos peptídicos clonados o sintéticos permite que fragmentos peptídicos relativamente cortos se unan para producir fragmentos peptídicos de mayor tamaño, polipéptidos o dominios proteicos completos. Como alternativa, la unión química nativa de péptidos sintéticos se puede utilizar para construir sintéticamente grandes péptidos o polipéptidos a partir de fragmentos peptídicos más cortos. Este método incluye una reacción química de dos etapas. La primera etapa es la reacción quimioselectiva de un péptido- α -tioéster sintético desprotegido con otro segmento peptídico desprotegido que contiene un residuo Cys amino terminal para dar un intermedio ligado a tioéster como el producto covalente inicial. Sin un cambio en las condiciones de reacción, este intermedio sufre una reacción intramolecular rápida y espontánea para formar un enlace peptídico nativo en el sitio de unión.

B. Métodos para producir anticuerpos

El anticuerpo divulgado se puede fabricar mediante técnicas convencionales que se conocen en la materia. Para producir de forma recombinante un anticuerpo, se puede utilizar un ácido nucleico que contiene una secuencia de nucleótidos que codifica el anticuerpo para transformar, transducir o transfectar una célula hospedadora eucariota (por ejemplo, una celular de insecto, de levadura o de mamífero). En general, las construcciones de ácido nucleico incluyen una secuencia reguladora operativamente unida a una secuencia o secuencias de nucleótidos que codifican el anticuerpo. Las secuencias reguladoras (también denominadas en el presente documento secuencias de control de la expresión) normalmente no codifican un producto génico, sino que afectan la expresión de las secuencias de ácido nucleico a las que están operativamente unidas.

Los sistemas eucariotas útiles para expresar y producir polipéptidos son bien conocidos en la materia e incluyen, por ejemplo, células de mamífero cultivadas, tales como células CHO.

En las células hospedadoras eucariotas, se pueden utilizar varios sistemas de expresión basados en virus para expresar proteínas de fusión. Los sistemas de expresión basados en virus son bien conocidos en la materia e incluyen, pero sin limitación, vectores víricos basados en baculovirus, SV40, retrovirus o vaccinia.

Las estirpes celulares de mamíferos que expresan de forma estable un anticuerpo se pueden producir mediante vectores de expresión con elementos de control adecuados y un marcador seleccionable. Por ejemplo, los vectores

de expresión eucariotas pCR3.1 (Invitrogen Life Technologies) y p91023(B) (véase Wong *et al.* (1985) Science 228:810-815) son adecuados para la expresión de un anticuerpo en, por ejemplo, células de ovario de hámster chino (CHO), células COS-1, células de riñón embrionario humano HEK 293, células NIH3T3, células BHK21, células MDCK y células endoteliales vasculares humanas (HUVEC). Otros sistemas de expresión adecuados incluyen el GS Gene Expression System™ disponible a través de Lonza Group Ltd.

Tras la introducción de un vector de expresión mediante electroporación, lipofección, coprecipitación con fosfato de calcio o cloruro de calcio, DEAE dextrano u otro método de transfección adecuado, se pueden seleccionar estirpes celulares estables (por ejemplo, mediante selección metabólica o resistencia a los antibióticos a G418, kanamicina o higromicina). Las células transfectadas se pueden cultivar de manera que se exprese el anticuerpo y se pueda recuperar el polipéptido, por ejemplo, del sobrenadante del cultivo celular o de las células lisadas. Como alternativa, se puede producir un anticuerpo mediante (a) la unión de secuencias amplificadas en un vector de expresión de mamífero, tal como pcDNA3 (Invitrogen Life Technologies), y (b) la transcripción y traducción *in vitro* utilizando extracto de germen de trigo o lisado de reticulocitos de conejo.

Un anticuerpo se puede aislar mediante, por ejemplo, métodos cromatográficos, tales como cromatografía de afinidad, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de interacción hidrófoba, intercambio iónico con DEAE, filtración en gel y cromatografía de hidroxapatita. En algunos casos, se puede genomanipular un anticuerpo para que contenga un dominio adicional que contenga una secuencia de aminoácidos que permita capturar el anticuerpo en una matriz de afinidad. Además, se puede utilizar un marcador, tal como c-myc, hemaglutinina, polihistidina o Flag™ (Kodak), para ayudar en la purificación de polipéptidos. Dichos marcadores pueden insertarse en cualquier lugar del polipéptido, incluso en el extremo carboxilo o amino. Otras fusiones que pueden ser útiles incluyen enzimas que ayudan en la detección del polipéptido, tal como fosfatasa alcalina. También se puede utilizar cromatografía de inmunoafinidad para purificar polipéptidos. Además, se puede genomanipular un anticuerpo para que contenga una señal secretora (si no hay una señal secretora ya presente) que haga que el anticuerpo sea secretado por las células en las que se produce. A continuación, el anticuerpo secretado puede aislarse convenientemente del medio celular.

C. Métodos para producir moléculas de ácido nucleico aisladas

Se pueden producir moléculas de ácido nucleico aisladas mediante técnicas convencionales, que incluyen, sin limitación, técnicas comunes de clonación molecular y síntesis química de ácidos nucleicos. Por ejemplo, se pueden utilizar técnicas de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para obtener un ácido nucleico aislado que codifica un anticuerpo. La PCR es una técnica en la que los ácidos nucleicos diana se amplifican de manera enzimática. Normalmente, se puede emplear la información de la secuencia de los extremos de la región de interés o más allá para diseñar cebadores de oligonucleótidos que son idénticos en secuencia a las cadenas opuestas del molde que ha de amplificarse. La PCR puede usarse para amplificar secuencias específicas de ADN, así como de ARN, incluyendo secuencias de ADN genómico total o ARN celular total. Los cebadores suelen tener de 14 a 40 nucleótidos de longitud, pero pueden variar desde 10 nucleótidos hasta cientos de nucleótidos de longitud. Se describen técnicas generales de PCR, por ejemplo, en PCR Primer: A Laboratory Manual, ed. por Dieffenbach y Dveksler, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1995. Cuando se utiliza ARN como fuente del molde, la transcriptasa inversa se puede utilizar para sintetizar una cadena de ADN complementario (ADNc). También se pueden utilizar la reacción en cadena de la ligasa, la amplificación por desplazamiento de cadena, la replicación de secuencia autosostenida o la amplificación basada en secuencia de ácido nucleico para obtener ácidos nucleicos aislados. Véanse, por ejemplo, Lewis (1992) Genetic Engineering News 12:1; Guatelli *et al.* (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:1874-1878; y Weiss (1991) Science 254:1292-1293.

También se pueden sintetizar ácidos nucleicos aislados de forma química, ya sea como una única molécula de ácido nucleico o como una serie de oligonucleótidos (por ejemplo, usando tecnología con fosforamidita para la síntesis automatizada de ADN en la dirección 3' a 5'). Por ejemplo, se pueden sintetizar uno o más pares de oligonucleótidos largos (por ejemplo, >100 nucleótidos) que contengan la secuencia deseada, conteniendo cada par un segmento corto de complementariedad (por ejemplo, aproximadamente 15 nucleótidos) de manera que se forme un dúplex cuando se hibride el par de oligonucleótidos. La ADN polimerasa se puede utilizar para extender los oligonucleótidos, dando como resultado una única molécula de ácido nucleico bicatenaria por par de oligonucleótidos, que después puede ligarse en un vector. Los ácidos nucleicos aislados también pueden obtenerse mediante mutagénesis. Los ácidos nucleicos que codifican proteínas se pueden mutar mediante técnicas convencionales, incluidas la mutagénesis dirigida a oligonucleótidos y/o la mutagénesis dirigida a sitio mediante PCR. Véase, Short Protocols in Molecular Biology. Capítulo 8, Green Publishing Associates y John Wiley & Sons, editado por Ausubel *et al.*, 1992.

X. Ensayos y selección de anticuerpos

Los ensayos para la selección de anticuerpos incluyen:

1. Análisis de la afinidad de unión de B7-H4-Fc a ligandos en comparación con B7-H4.
2. Ensayos funcionales para confirmar que B7-H4-Fc evita la señalización por parte de las células que expresan B7-H4. Se pueden utilizar células informadoras para estos ensayos, u otra opción son las células primarias B7-H4+.

Se pueden utilizar ratones deficientes en B7-H4 ("inactivados") o ratones de tipo silvestre para la generación de AcM de alta afinidad contra B7-H4 mediante técnicas de inmunización patentadas. Se pueden utilizar ratones NZBWF1 con tendencia autoinmunitaria para generar AcM para superar la "tolerancia".

1. Fase I de selección: Unión de AcM a estirpes celulares transfectadas para expresar la B7-H4 en la superficie celular. Además, los AcM deben tener la capacidad de unirse a B7-H4 expresado endógenamente en la superficie de subconjuntos de células humanas primarias. Estos AcM deberían ser muy específicos para B7-H4. Los anticuerpos se pueden seleccionar mediante ELISA con proteína B7-H4 purificada para detectar anticuerpos anti-B7-H4.

2. Fase II de selección: Los AcM específicos de B7-H4 deberían bloquear la unión de B7-H4 a sus ligandos y/o células diana.

3. Fase III de selección: Ensayos funcionales para confirmar que los AcM B7-H4 o una combinación de AcM modulan la señalización de B7-H4. Estos ensayos utilizarán estirpes celulares que expresen B7-H4 endógeno o células primarias, tales como monocitos, macrófagos y subconjuntos de células dendríticas humanas para evaluar la función en presencia de AcM B7-H4. Además, se pueden utilizar estirpes celulares informadoras para determinar si las vías de señalización, tales como NFκB (indicador de NFκB) o NFAT (indicador de NFAT), están alteradas después del cultivo con AcM B7-H4.

4. Fase IV de selección: Ensayos funcionales para determinar si los AcM B7-H4 son capaces de inducir citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (CCDA), citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) o apoptosis celular a través de otros mecanismos, de estirpes celulares que expresan B7-H4. En particular, se probará la capacidad de los AcM B7-H4 para agotar estirpes celulares de leucemia mediante uno de estos métodos, que se sabe que expresan B7-H4 en la superficie celular. Los AcM B7-H4 también pueden genomanipularse para agotar las células que expresan B7-H4 y probarse como se describe más adelante en este documento mediante métodos conocidos.

5. Fase V de selección: Ensayos funcionales para determinar si los AcM B7-H4 son capaces de administrar o inducir una señal negativa (agonista) a través de B7-H4 en células que expresan B7-H4 para inhibir la función celular. Se evaluarán estirpes celulares que expresan endógenamente B7-H4 o transfectantes de estirpes celulares para detectar cambios en el fenotipo y la supervivencia después del cultivo con AcM B7-H4. En otros ensayos, se utilizarán estirpes celulares indicadoras para determinar que los AcM B7-H4 modulan vías de señalización positivas, tales como NF-κB (indicador de NF-κB) u otros indicadores de señalización celular conocidos. También se evaluará la inducción de la apoptosis en estirpes celulares.

Los ensayos de fase II y III se pueden utilizar para predecir las concentraciones de AcM B7-H4 necesarias para bloquear los niveles fisiológicos de ligandos *in vivo*.

XI. Aplicaciones terapéuticas

Los anticuerpos divulgados se pueden utilizar para tratar el cáncer.

Las células cancerosas adquieren un conjunto característico de capacidades funcionales durante su desarrollo, aunque a través de diversos mecanismos. Dichas capacidades incluyen evadir la apoptosis, autosuficiencia en señales de crecimiento, insensibilidad a las señales anticrecimiento, invasión de tejido/metástasis, potencial replicativo ilimitado y angiogénesis sostenida. La expresión "célula cancerosa" pretende abarcar células cancerosas tanto premalignas como malignas. En algunos casos, cáncer se refiere a un tumor benigno, que ha permanecido localizado. En otros casos, cáncer se refiere a un tumor maligno, que ha invadido y destruido estructuras corporales adyacentes y se dispersa a lugares distantes. En otros casos más, el cáncer está asociado con un antígeno canceroso específico (por ejemplo, antígeno pancarcinoma (KS 1/4), antígeno de carcinoma ovárico (CA125), antígeno prostático específico (PSA), antígeno carcinoembrionario (CEA), CD19, CD20, HER2/neu, etc.).

Los cánceres incluyen (pero sin limitación) los siguientes: carcinoma, incluyendo el de vejiga, mama, colon, riñón, hígado, pulmón, ovario, páncreas, estómago, cuello del útero, tiroides y piel; incluyendo carcinoma epidermoide; tumores hematopoyéticos de linaje linfoide, incluyendo leucemia, leucemia linfocítica aguda, leucemia linfoblástica aguda, linfoma de linfocitos B, linfoma de linfocitos T, linfoma de Berkett; tumores hematopoyéticos del linaje mielóide, incluyendo leucemias mielógenas agudas y crónicas y leucemia promielocítica; tumores de origen mesenquimatoso, incluyendo fibrosarcoma y rhabdomyosarcoma; otros tumores, incluyendo melanoma, seminoma, tetratocarcinoma, neuroblastoma y glioma; tumores del sistema nervioso central y periférico, incluyendo astrocitoma, neuroblastoma, glioma y schwannomas; tumores de origen mesenquimatoso, incluyendo fibrosarcoma, rhabdomyosarcoma y osteosarcoma; y otros tumores, incluyendo melanoma, xenoderma pigmentoso, queratoactantoma, seminoma, cáncer folicular de tiroides y teratocarcinoma.

También se pueden tratar los cánceres provocados por anomalías en la apoptosis. Dichos cánceres pueden incluir, pero sin limitación, linfomas foliculares, carcinomas con mutaciones de p53, tumores dependientes de hormonas de mama, próstata y ovario, y lesiones precancerosas, tales como poliposis adenomatosa familiar y síndromes mielodisplásicos. En casos específicos, el tumor maligno o los cambios disproliferativos (tales como metaplasias y displasias) o trastornos hiperproliferativos, se puede tratar o prevenir en el ovario, vejiga, mama, colon, pulmón, piel,

páncreas o útero. En otros casos específicos, se pueden tratar o prevenir el sarcoma, el melanoma o la leucemia.

Los anticuerpos divulgados son particularmente útiles para el tratamiento de cánceres asociados con células que expresan niveles anormalmente altos de B7-H4.

5

Los cánceres específicos incluyen, pero sin limitación,

- (i) **leucemias** incluidas, pero sin limitación, leucemia aguda, leucemia linfocítica aguda, leucemias mielocíticas agudas, tales como leucemias mieloblástica, promielocítica, mielomonocítica, monocítica, eritroleucemia y síndrome mielodisplásico, leucemias crónicas, tales como, pero sin limitación, leucemia mielocítica (granulocítica) crónica, leucemia linfocítica crónica, tricoleucemia; policitemia vera;
- (ii) **linfomas**, tales como, pero sin limitación, linfomas de la enfermedad de Hodgkin o no de la enfermedad de Hodgkin (por ejemplo, cinasa del linfoma anaplásico (ALK) difuso negativo, linfoma de linfocitos B grandes (DLBCL); cinasa del linfoma anaplásico (ALK) difuso positivo, linfoma de linfocitos B grandes (DLBCL); cinasa del linfoma anaplásico (ALK) positivo, linfoma de células grandes anaplásicas (ALCL) ALK+, linfoma mielode agudo (AML));
- (iii) **mielomas múltiples**, tales como, pero sin limitación, mieloma múltiple latente, mieloma no secretor, mieloma osteosclerótico, leucemia de células plasmáticas, plasmocitoma solitario y plasmocitoma extramedular; macroglobulinemia de Waldenstrom; gammapatía monoclonal de significado indeterminado; gammapatía monoclonal benigna; enfermedad de la cadena pesada;
- (iv) **sarcomas de hueso y tejido conectivo**, tales como, pero sin limitación, sarcoma óseo, osteosarcoma, condrosarcoma, sarcoma de Ewing, tumor maligno de células gigantes, fibrosarcoma óseo, cordoma, sarcoma del periostio, sarcomas de tejidos blandos, angiosarcoma (hemangiosarcoma), fibrosarcoma, sarcoma de Kaposi, leiomiomasarcoma, liposarcoma, linfangiosarcoma, neurilemoma, rabdomyosarcoma, sarcoma sinovial;
- (v) **tumores cerebrales** incluyendo, pero sin limitación, glioma, astrocitoma, glioma del tronco encefálico, ependimoma, oligodendroglioma, tumor no glial, neurinoma acústico, craneofaringioma, meduloblastoma, meningioma, pineocitoma, pineoblastoma, linfoma de cerebro primario;
- (vi) **cáncer de mama** incluyendo, pero sin limitación, adenocarcinoma, carcinoma lobular (de células pequeñas), carcinoma intraductal, cáncer de mama medular, cáncer de mama mucinoso, cáncer de mama tubular, cáncer de mama papilar, enfermedad de Paget y cáncer de mama inflamatorio;
- (vii) **cáncer suprarrenal**, incluyendo, pero sin limitación, feocromocitoma y carcinoma adrenocortical;
- (viii) **cáncer de tiroides**, tales como, pero sin limitación, cáncer de tiroides papilar o folicular, cáncer de tiroides medular y cáncer de tiroides anaplásico;
- (ix) **cáncer de páncreas**, incluyendo, pero sin limitación, insulinoma, gastrinoma, glucagonoma, vipoma, tumor secretor de somatostatina y tumor de células de los islotes o carcinoide;
- (x) **cáncer hipofisario** incluyendo, pero sin limitación, tumor secretor de prolactina;
- (xi) **cánceres de ojo** incluyendo, pero sin limitación, melanoma ocular, tal como melanoma del iris, melanoma coroideo y melanoma del cuerpo ciliar, y retinoblastoma;
- (xii) **cánceres vaginales**, que incluyen, pero sin limitación, carcinoma epidermoide, adenocarcinoma y melanoma;
- (xiii) **cáncer de vulva**, incluyendo, pero sin limitación, carcinoma epidermoide, melanoma, adenocarcinoma, carcinoma basocelular, sarcoma;
- (xiv) **cánceres de cuello uterino** incluyendo, pero sin limitación, carcinoma epidermoide y adenocarcinoma;
- (xv) **cánceres de útero** incluyendo, pero sin limitación, carcinoma endometrial y sarcoma de útero;
- (xvi) **cánceres de ovario** incluyendo, pero sin limitación, carcinoma epitelial de ovario, tumor limítrofe, tumor de células germinales y tumor estromal;
- (xvii) **cánceres de esófago** incluyendo, pero sin limitación, cáncer escamoso, adenocarcinoma, carcinoma adenoideo quístico, carcinoma mucoepidermoide, carcinoma adenoescamoso, sarcoma, melanoma, plasmocitoma, carcinoma verrucoso y carcinoma de células de avena (células pequeñas);
- (xviii) **cánceres de estómago** incluyendo, pero sin limitación, adenocarcinoma, hongo (polipoide), ulceración, de diseminación superficial, diseminación difusa, linfoma maligno, liposarcoma, fibrosarcoma y carcinosarcoma;
- (xix) **cánceres de colon; cánceres de recto y cánceres de hígado** incluyendo, pero sin limitación, carcinoma hepatocelular y hepatoblastoma,
- (xx) **cánceres de vesícula biliar** incluyendo, pero sin limitación, adenocarcinoma;
- (xxi) **colangiocarcinomas** incluyendo, pero sin limitación, papilar, nodular y difuso;
- (xxii) **cáncer de pulmón** incluyendo, pero sin limitación, cáncer de pulmón no microcítico, carcinoma de células escamosas (carcinoma epidermoide), adenocarcinoma, carcinoma de células grandes y cáncer de pulmón microcítico;
- (xxiii) **cánceres testiculares** incluyendo, pero sin limitación, tumor germinal, seminoma, anaplásico, clásico (típico), espermatocítico, no seminoma,
- (xxiv) **carcinoma embrionario, carcinoma teratómico, coriocarcinoma** (tumor del saco vitelino),
- (xxv) **cánceres de próstata** incluyendo, pero sin limitación, adenocarcinoma, leiomiomasarcoma y rabdomyosarcoma;
- (xxvi) **cánceres de pene**;
- (xxvii) **cánceres orales** incluyendo, pero sin limitación, carcinoma epidermoide; cánceres basales;
- (xxviii) **cánceres de glándulas salivales** incluyendo, pero sin limitación, adenocarcinoma, carcinoma mucoepidermoide y carcinoma adenoidquístico;
- (xxix) **cánceres de faringe** incluyendo, pero sin limitación, cáncer de células escamosas y verrugoso;

(xxx) **cánceres de piel** incluyendo, pero sin limitación, carcinoma basocelular, carcinoma de células escamosas y melanoma, melanoma de diseminación superficial, melanoma nodular, melanoma maligno lentigo, melanoma acral lentiginoso;

(xxxi) **cánceres de riñón** incluyendo, pero sin limitación, cáncer de células renales, adenocarcinoma, hipernefoma, fibrosarcoma, cáncer de células transicionales (pelvis renal y/u uréter); tumor de Wilms;

(xxxii) **cánceres de vejiga** incluyendo, pero sin limitación, carcinoma de células transicionales, cáncer de células escamosas, adenocarcinoma, carcinosarcoma.

Además, los cánceres incluyen mixosarcoma, sarcoma osteogénico, endoteliosarcoma, linfangioendoteliosarcoma, mesotelioma, sinovioma, hemangioblastoma, carcinoma epitelial, cistadenocarcinoma, carcinoma broncogénico, carcinoma de glándulas sudoríparas, carcinoma de glándulas sebáceas, carcinoma papilar y adenocarcinomas papilares (para más información sobre dichos trastornos, véase, Fishman *et al.*, 1985, Medicine, 2.^a Ed., J. B. Lippincott Co., Filadelfia y Murphy *et al.*, 1997, "Informed Decisions: The Complete Book of Cancer Diagnosis, Treatment, y Recovery", Viking Penguin, Penguin Books EE.UU., Inc., Estados Unidos de América).

XII. Terapias combinadas

Los anticuerpos divulgados se pueden administrar a un sujeto que los necesite solos o junto con uno o más agentes terapéuticos adicionales. En algunos casos, el anticuerpo y el agente terapéutico adicional se administran por separado, pero simultáneamente. El anticuerpo y el agente terapéutico adicional también se pueden administrar como parte de la misma composición. En otros casos, el anticuerpo y el segundo agente terapéutico se administran por separado y en momentos diferentes, pero como parte del mismo régimen terapéutico.

Al sujeto se le puede administrar un primer agente terapéutico 1, 2, 3, 4, 5, 6 o más horas, o 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 o más días antes de la administración de un segundo agente terapéutico. En algunos casos, al sujeto se le pueden administrar una o más dosis del primer agente cada 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 14, 21, 28, 35 o 48 días antes de una primera administración del segundo agente. Un anticuerpo, como se describe en el presente documento, puede ser el primer o el segundo agente terapéutico.

El anticuerpo y el agente terapéutico adicional se pueden administrar como parte de un régimen terapéutico. Por ejemplo, si se puede administrar un primer agente terapéutico a un sujeto cada cuatro días, el segundo agente terapéutico se puede administrar en el primer, segundo, tercer o cuarto día, o combinaciones de los mismos. El primer agente terapéutico o el segundo agente terapéutico pueden administrarse repetidamente durante todo el régimen terapéutico.

Los agentes terapéuticos adicionales se seleccionan basándose en la afección, trastorno o enfermedad a tratar. Por ejemplo, el anticuerpo se puede administrar junto con uno o más agentes adicionales que funcionan para mejorar o promover una respuesta inmunitaria o reducir o inhibir una respuesta inmunitaria.

i. Quimioterápicos

En particular, el anticuerpo B7-H4 se puede combinar con uno o más quimioterápicos y agentes proapoptóticos. Los agentes quimioterápicos representativos incluyen, pero sin limitación, amsacrina, bleomicina, busulfán, capecitabina, carboplatino, carmustina, clorambucilo, cisplatino, cladribina, clofarabina, crisantaspa, ciclofosfamida, citarabina, dacarbazina, dactinomicina, daunorrubicina, docetaxel, doxorubicina, epirubicina, etopósido, fludarabina, fluorouracilo, gemcitabina, hidroxycarbamida, idarrubicina, ifosfamida, irinotecán, leucovorina, doxorubicina liposómica, daunorrubicina liposómica, lomustina, melfalán, mercaptopurina, mesna, metotrexato, mitomicina, mitoxantrona, oxaliplatino, paclitaxel, pemetrexed, pentostatina, procarbazona, raltitrexed, satraplatino, estreptozocina, tegafur-uracilo, temozolomida, tenipósido, tiotepa, tioguanina, topotecán, treosulfano, vinblastina, vincristina, vindesina, vinorelbina o una combinación de los mismos. Los agentes proapoptóticos representativos incluyen, pero sin limitación, fludarabinetaurosporina, cicloheximida, actinomicina D, lactosilceramida, 15d-PGJ(2) y combinaciones de las mismas.

ii. Antagonistas de PD-1 y CTLA-4

Los anticuerpos B7-H4 se pueden administrar junto con un antagonista de PD-1. La muerte programada-1 (PD-1) es un miembro de la familia de receptores CD28 que genera una respuesta inmunitaria negativa cuando se induce en los linfocitos T. El contacto entre PD-1 y uno de sus ligandos (B7-H1 o B7-DC) induce una respuesta inhibitoria que disminuye la multiplicación de linfocitos T y/o la fuerza y/o duración de una respuesta de linfocitos T. Los antagonistas de PD-1 adecuados se describen en las patentes de EE. UU. n.º 8,114,845, 8,609,089 y 8,709,416, e incluyen compuestos o agentes que se unen y bloquean un ligando de PD-1 para interferir o inhibir la unión del ligando al receptor de PD-1, o se unen directamente y bloquean el receptor de PD-1 sin inducir la transducción de señales inhibitorias a través del receptor de PD-1.

En algunos casos, el antagonista del receptor de PD-1 se une directamente al receptor de PD-1 sin desencadenar la transducción de señales inhibitorias y también se une a un ligando del receptor de PD-1 para reducir o inhibir que el

ligando desencadene la transducción de señales a través del receptor de PD-1. Al reducir el número y/o la cantidad de ligandos que se unen al receptor de PD-1 y desencadenan la transducción de una señal inhibitoria, la señal negativa transmitida por la transducción de señales PD-1 atenúa menos células y se puede lograr una respuesta inmunitaria más sólida.

5 Se cree que la señalización de PD-1 está impulsada por la unión a un ligando de PD-1 (como B7-H1 o B7-DC) muy cerca de un antígeno peptídico presentado por el complejo principal de histocompatibilidad (MHC) (véase, por ejemplo, Freeman, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. A, 105:10275-10276 (2008)). Por tanto, las proteínas, anticuerpos o moléculas pequeñas que previenen la coligación de PD-1 y TCR en la membrana de los linfocitos T también son antagonistas de PD-1 útiles.

Los anticuerpos anti-PD-1 adecuados incluyen, pero sin limitación, los descritos en las siguientes publicaciones:

15 Hardy *et al.*, documento WO/2003/099196
 Korman *et al.*, documento WO/2006/121168
 Li *et al.*, documento WO/2009/014708
 Honjo *et al.*, documento WO/2004/004771
 Honjo *et al.*, documento WO/2004/072286
 20 Collins *et al.*, documento WO/2004/056875
 Ahmed *et al.*, documento WO/2008/083174
 Korman *et al.*, documento WO/2007/005874
 Terrett *et al.*, documento WO/2009/073533
 Berger *et al.*, Clin. Cancer Res., 14:30443051 (2008).

25 Un ejemplo específico de un anticuerpo anti-PD-1 es un anticuerpo descrito en Kosak, documento US 20070166281 (pub. 19 de julio de 2007) en par. 42, un anticuerpo anti-PD-1 humano, que en algunos casos se administra a una dosis de 3 mg/kg.

Los anticuerpos anti-B7-H1 ilustrativos incluyen, pero sin limitación, los descritos en las siguientes publicaciones:

30 Documento WO/2006/133396 (pub. 14 de diciembre de 2006)
 Documento WO/2008/083174 (pub. 10 de julio 2008)
 Documento US 2006/0110383 (pub. 25 de mayo de 2006)

35 Un ejemplo específico de un anticuerpo anti-B7-H1 es un anticuerpo descrito en el documento WO/2007/005874 (publicado el 11 de enero de 2007), un anticuerpo anti-B7-H1 humano.

En el documento WO2014/0044738 se divulgan anticuerpos anti-PD-1 y anti-B7-H1 adicionales.

40 Para anticuerpos anti-B7-DC, véanse los documentos US7,411,051, US7,052,694, US7,390,888.

Otros antagonistas del receptor de PD-1 ilustrativos incluyen, pero sin limitación, polipéptidos B7-DC, que incluyen homólogos y variantes de estos, así como fragmentos activos de cualquiera de los anteriores, y proteínas de fusión que incorporen cualquiera de estos. En algunos casos, la proteína de fusión incluye la parte soluble de B7-DC acoplada a la parte Fc de un anticuerpo, tal como IgG humana, y no incorpora toda o parte de la parte transmembrana de B7-DC humana.

El antagonista de PD-1 también puede ser un fragmento de un B7-H1 de mamífero, por ejemplo de ratón o primate, tal como de un ser humano, en donde el fragmento se une y bloquea PD-1, pero no da como resultado una transducción de señales inhibitorias a través de PD-1. Los fragmentos también pueden ser parte de una proteína de fusión, por ejemplo, una proteína de fusión Ig.

Otros polipéptidos antagonistas de PD-1 útiles incluyen aquellos que se unen a los ligandos del receptor de PD-1. Estos incluyen la proteína del receptor de PD-1, o fragmentos solubles de la misma, que puede unirse a los ligandos de PD-1, tales como B7-H1 o B7-DC, y previene la unión al receptor endógeno de PD-1, evitando así la transducción de señales inhibitorias. También se ha demostrado que B7-H1 se une a la proteína B7.1 (Butte *et al.*, Immunity, vol. 27, págs. 111-122, (2007)). Dichos fragmentos también incluyen la parte ECD soluble de la proteína PD-1 que incluye mutaciones, tales como la mutación A99L, que aumenta la unión a los ligandos naturales (Molnar *et al.*, PNAS, 105:10483-10488 (2008)). También son útiles B7-1 o fragmentos solubles de la misma, que pueden unirse al ligando de B7-H1 y evitar la unión al receptor de PD-1 endógeno, evitando así la transducción de señales inhibitorias.

También pueden ser antagonistas de PD-1 los ácidos nucleicos antisentido PD-1 y B7-H1, tanto el ADN como el ARN, así como las moléculas de ARNip. Estas moléculas antisentido evitan la expresión de PD-1 en los linfocitos T, así como la producción de ligandos de linfocitos T, tales como B7-H1, PD-L1 y/o PD-L2. Por ejemplo, el ARNip (por ejemplo, de aproximadamente 21 nucleótidos de longitud, que es específico para el gen que codifica PD-1, o que codifica un ligando de PD-1, y cuyos oligonucleótidos pueden adquirirse fácilmente comercialmente) que forma

complejos con vehículos, tal como la polietilenimina (véase Cubillos-Ruiz *et al.*, J. Clin. Invest. 119(8): 2231-2244 (2009), se absorbe fácilmente por las células que expresan PD-1 así como ligandos de PD-1 y reduce la expresión de estos receptores y ligandos para lograr una disminución en la transducción de señales inhibitoras en los linfocitos T, activando así los linfocitos T.

También se contemplan como agentes terapéuticos adicionales otras moléculas útiles para mediar los efectos de los linfocitos T en una respuesta inmunitaria. En algunos casos, la molécula es un antagonista de CTLA4, por ejemplo un anticuerpo anti-CTLA4 antagonista. Un ejemplo de un anticuerpo anti-CTLA4 contemplado para su uso en los métodos divulgados incluye un anticuerpo como se describe en Fischkoff *et al.*, documento WO/2007/056539.

Las dosis de los anticuerpos anti-PD-1, anti-B7-H1 y anti-CTLA4 se conocen en la materia y pueden estar en el intervalo de, por ejemplo, 0,1 a 100 mg/kg, o en intervalos más cortos de 1 a 50 mg/kg, o de 10 a 20 mg/kg. Una dosis adecuada para un sujeto humano puede estar entre 5 y 15 mg/kg, siendo un ejemplo específico 10 mg/kg de anticuerpo (por ejemplo, anticuerpo anti-PD-1 humano).

Ejemplos específicos de un anticuerpo anti-CTLA4 útil en los métodos divulgados son ipilimumab, un anticuerpo anti-CTLA4 humano, administrado a una dosis de, por ejemplo, aproximadamente 10 mg/kg, y tremelimumab, un anticuerpo humano anti-CTLA4, administrado a una dosis de, por ejemplo, aproximadamente 15 mg/kg. Véase también Sammartino, *et al.*, Clinical Kidney Journal, 3(2):135-137 (2010), publicado en línea en diciembre de 2009.

En otros casos, el antagonista es una molécula pequeña. Se ha demostrado que una serie de pequeños compuestos orgánicos se unen al ligando B7-1 para evitar la unión a CTLA4 (véase Erbe *et al.*, J. Biol. Chem., 277:7363-7368 (2002). Estos pequeños compuestos orgánicos podrían administrarse solos o junto con un anticuerpo anti-CTLA4 para reducir la transducción de señales inhibitoras de los linfocitos T.

iii. Agentes potenciadores

En algunos casos, agentes terapéuticos adicionales incluyen un agente potenciador. El agente potenciador actúa para aumentar la eficacia del regulador positivo de la respuesta inmunitaria, posiblemente por más de un mecanismo, aunque el mecanismo de acción preciso no es esencial para la práctica amplia de la presente invención.

En algunos casos, el agente potenciador es ciclofosfamida. La ciclofosfamida (CTX, Cytosan[®], o Neosar[®]) es un fármaco de oxazafosforina y sus análogos incluyen ifosfamida (IFO, Ifex), perfosfamida, trofosfamida (trofosfamida; Ixoten), y sales, solvatos, profármacos y metabolitos farmacéuticamente aceptables de los mismos (solicitud de patente De EE. UU. 20070202077). La ifosfamida (MITOXANA[®]) es un análogo estructural de la ciclofosfamida y su mecanismo de acción se considera idéntico o sustancialmente similar al de la ciclofosfamida. La perfosfamida (4-hidroperoxiciclofosfamida) y la trofosfamida también son agentes alquilantes que están estructuralmente relacionados con la ciclofosfamida. Por ejemplo, la perfosfamida alquila el ADN, inhibiendo así la replicación del ADN y la síntesis de ARN y proteínas. Se han diseñado y evaluado nuevos derivados de oxazafosforinas con un intento de mejorar la selectividad y la respuesta con una toxicidad reducida para el hospedador (Liang J., Huang M., Duan W., Yu X. Q., Zhou S. Design of new oxazaphosphorine anticancer drugs. Curr Pharm Des. 2007;13(9):963-78. Review). Estos incluyen mafosfamida (NSC 345842), glufosfamida (D19575, mostaza β -D-glucosilifosforamida), S-(-)-bromofosfamida (CBM-11), NSC 612567 (aldofosfamida perhidrotiazina) y NSC 613060 (aldofosfamida tiazolidina). La mafosfamida es un análogo de oxazafosforina que es una sal químicamente estable del ácido 4-tioetanosulfónico de 4-hidroxi-CPA. La glufosfamida es un derivado del IFO en el que la mostaza isofosforamida, el metabolito alquilante de IFO, está unido glucosídicamente a una molécula de β -D-glucosa. Se describen análogos de ciclofosfamida adicionales en la patente de EE. UU. 5,190,929 titulada "Cyclophosphamide analogs useful as anti-tumor agents".

Si bien el CTX en sí no es tóxico, algunos de sus metabolitos son agentes alquilantes citotóxicos que inducen el entrecruzamiento del ADN y, a dosis más elevadas, la cadena se rompe. Muchas células son resistentes a CTX porque expresan niveles elevados de la enzima desintoxicante aldehído deshidrogenasa (ALDH). CTX se dirige a los linfocitos en proliferación, ya que los linfocitos (pero no las células madre hematopoyéticas) expresan sólo niveles bajos de ALDH y las células en ciclo son más sensibles a los agentes de alquilación del ADN.

Dosis bajas de CTX (<200 mg/kg) pueden tener efectos inmunoestimulantes, incluida la estimulación de respuestas inmunitarias antitumorales en modelos de cáncer de humanos y en ratones (Brode & Cooke CritRev. Immunol. 28:109-126 (2008)). Estas dosis bajas son subterapéuticas y no tienen actividad antitumoral directa. Por el contrario, dosis elevadas de CTX inhiben la respuesta antitumoral. Varios mecanismos pueden explicar el papel de CTX en la potenciación de la respuesta inmunitaria antitumoral: (a) agotamiento de Treg CD4+CD25+FoxP3+ (y específicamente Treg proliferantes, que pueden ser especialmente supresores), (b) agotamiento de linfocitos B; (c) inducción de óxido nítrico (NO), lo que da como resultado la supresión del crecimiento de células tumorales; (d) movilización y expansión de MDSC CD11b+Gr-1+. Estos efectos primarios tienen numerosos efectos secundarios; por ejemplo, después del agotamiento de Treg, los macrófagos producen más IFN- γ y menos IL-10. También se ha demostrado que CTX induce la expresión de tipo IIFN y promueve la proliferación homeostática de linfocitos.

El agotamiento de Treg se cita con mayor frecuencia como el mecanismo por el cual CTX potencia la respuesta

inmunitaria antitumoral. Esta conclusión se basa en parte en los resultados de experimentos de transferencia adoptiva. En el modelo de tumor AB1-HA, el tratamiento con CTX el día 9 proporciona una tasa de curación del 75 %. La transferencia de Treg purificada el día 12 inhibió casi por completo la respuesta de CTX (van der Most *et al.* Cancer Immunol. Immunother. 58:1219-1228 (2009). Se observó un resultado similar en el modelo de tumor HHD2: la transferencia adoptiva de Treg CD4+CD25+ después del pretratamiento con CTX eliminó la respuesta terapéutica a la vacuna (Taieb, J. J. Immunol. 176:2722-2729 (2006)).

Numerosos ensayos clínicos en seres humanos han demostrado que dosis bajas de CTX son un agente seguro, bien tolerado y eficaz para promover respuestas inmunitarias antitumorales (Bas y Mastrangelo, Cancer Immunol. Immunother. 47:1-12 (1998)).

La dosis óptima de CTX para potenciar una respuesta inmunitaria antitumoral es una que reduce el recuento general de linfocitos T mediante la reducción de los niveles de Treg por debajo del intervalo normal, pero es subterapéutico (véase Machiels *et al.* Cancer Res. 61:3689-3697 (2001)).

En ensayos clínicos en seres humanos en los que se ha utilizado CTX como agente inmunopotenciador, habitualmente se ha utilizado una dosis de 300 mg/m². Para un hombre promedio (6 pies (1,80 m), 170 libras (78 kg) con una superficie corporal de 1,98 m²), 300 mg/m² son 8 mg/kg, o 624 mg de proteína total. En modelos de cáncer en ratones, se ha observado eficacia en dosis que varían de 15 a 150 mg/kg, que se relacionan con 0,45 a 4,5 mg de proteína total en un ratón de 30 g (Machiels *et al.* Cancer Res. 61:3689-3697 (2001), Hengst *et al.*, Cancer Res. 41:2163-2167 (1981), Hengst, Cancer Res. 40:2135-2141 (1980)).

Para los mamíferos más grandes, tal como un primate, tal como un paciente humano, se pueden utilizar dichas dosis en mg/m², pero también se pueden utilizar dosis unitarias administradas durante un intervalo de tiempo finito. Estas dosis unitarias que pueden administrarse diariamente durante un período de tiempo finito, tal como hasta 3 días, o hasta 5 días, o hasta 7 días, o hasta 10 días, o hasta 15 días o hasta 20 días o hasta 25 días, están todas contempladas específicamente. Se puede aplicar el mismo régimen para los otros agentes potenciadores mencionados en el presente documento.

En otros casos, el agente potenciador es un agente que reduce la actividad y/o el número de linfocitos T reguladores (T-reg), tal como sunitinib (SUTENT®), anti-TGFβ o imatinib (GLEEVAC®). El régimen terapéutico mencionado también puede incluir la administración de un adyuvante.

Los agentes potenciadores útiles también incluyen inhibidores de la mitosis, tal como paclitaxol, inhibidores de la aromatasas (por ejemplo, letrozol) e inhibidores de la angiogénesis (inhibidores de VEGF, por ejemplo, Avastin, VEGF-Trap) (véase, por ejemplo, Li *et al.*, Vascular endothelial growth factor blockade reduces intratumoral regulatory T cells and enhances the efficacy of a GM-CSF-secreting cancer immunotherapy. Clin Cancer Res. 15 de noviembre de 2006; 12(22): 6808-16), antraciclinas, oxaliplatino, doxorubicina, antagonistas de TLR4 y antagonistas de IL-18.

40 XIII. Kits

Los anticuerpos B7-H4 divulgados se pueden envasar en un recipiente herméticamente cerrado, tal como una ampolla o un sobre, indicando la cantidad. El anticuerpo se puede administrar en forma de polvo liofilizado esterilizado en seco o concentrado sin agua en un recipiente cerrado herméticamente, y puede reconstituirse, por ejemplo, con agua o solución salina a la concentración apropiada para la administración a un sujeto. Por ejemplo, el anticuerpo se puede administrar como un polvo liofilizado estéril seco en un recipiente herméticamente cerrado a una dosis unitaria de al menos 5 mg, o al menos 10 mg, al menos 15 mg, al menos 25 mg, al menos 35 mg, al menos 45 mg, al menos 50 mg o al menos 75 mg. El agente liofilizado se puede almacenar entre 2 y 8 °C en su recipiente original y normalmente se administra en las 12 horas, las 6 horas, las 5 horas, las 3 horas o la 1 hora después de su reconstitución.

En un caso alternativo, el anticuerpo se puede administrar en forma líquida en un recipiente herméticamente cerrado indicando la cantidad y concentración. En algunos casos, la forma líquida del anticuerpo se puede administrar en un recipiente herméticamente cerrado que incluya al menos 1 mg/ml, o al menos 2,5 mg/ml, al menos 5 mg/ml, al menos 8 mg/ml, al menos 10 mg/ml, al menos 15 mg/ml, al menos 25 mg/ml, al menos 50 mg/ml, al menos 100 mg/ml, al menos 150 mg/ml, al menos 200 mg/ml del agente.

También se proporcionan paquetes y kits farmacéuticos que incluyen uno o más recipientes llenos de anticuerpos. Además, también se puede incluir uno o más de otros agentes profilácticos o terapéuticos útiles para el tratamiento de un cáncer en el paquete o kit farmacéutico. El paquete o kit farmacéutico también puede incluir uno o más recipientes llenos con uno o más de los ingredientes de las composiciones farmacéuticas divulgadas. Opcionalmente, asociado a tal(es) recipiente(s), puede haber un aviso en la forma prescrita por un organismo estatal que regula la fabricación, el uso o la venta de productos farmacéuticos o biológicos, reflejando dicho aviso la aprobación por la agencia de fabricación, uso o venta para administración a seres humanos.

También se proporcionan kits diseñados para los métodos descritos anteriormente. En particular, un kit también incluye uno o más agentes profilácticos o terapéuticos diferentes útiles para el tratamiento del cáncer, en uno o más

recipientes.

A menos que se definan de otra manera, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que entiende comúnmente un experto en la materia a la que pertenece la invención divulgada.

5

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo anti-B7-H4 que comprende:
 - 5 (a) una cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEQ ID NO: 63; y
 - (b) una cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEQ ID NO: 81.
2. Una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo anti-B7H4 de la reivindicación 1.
- 10 3. Una secuencia de ácido nucleico o secuencias de ácido nucleico que codifican un anticuerpo de la reivindicación 1.
4. Un vector que comprende una secuencia de ácido nucleico o secuencias de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 3.
- 15 5. Una célula hospedadora que comprende una secuencia de ácido nucleico o secuencias de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 3 o un vector de acuerdo con la reivindicación 4.