

ANTICUERPOS DE B7-H4 Y MÉTODOS PARA USARLOS

REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUDES RELACIONADAS

[0001] La presente solicitud reivindica el beneficio de la solicitud provisional estadounidense n.º 62/550,173, presentada el 25 de agosto de 2017, la solicitud provisional estadounidense n.º 62/579,774, presentada el 31 de octubre de 2017, la solicitud provisional estadounidense n.º 62/607,810, presentada el 19 de diciembre de 2017 y la solicitud provisional estadounidense n.º 62/656,789, presentada el 12 de abril de 2018, cada una de las cuales se incorpora a la presente en su totalidad mediante esta referencia.

REFERENCIA A UN LISTADO DE SECUENCIAS QUE SE PRESENTÓ ELECTRÓNICAMENTE A TRAVÉS DE EFS-WEB

[0002] El contenido del listado de secuencias presentado electrónicamente (nombre: 3986.0090004_SL_ST25.txt, tamaño: 331,354 bytes, Fecha de creación: 3 de agosto, 2018) se incorpora a la presente mediante referencia en su totalidad.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Campo

[0003] La presente descripción se refiere a anticuerpos que se unen específicamente a composiciones de B7-H4 humana que comprenden dichos anticuerpos y métodos para producir y utilizar anticuerpos que se unen específicamente a B7-H4.

Descripción de la técnica relacionada

[0004] B7-H4 (también conocida como B7x, B7-S1 y VTCN1) es una molécula inmunorreguladora que comparte homología con otros miembros de la familia B7, incluso PD-L1. Es una proteína transmembrana del tipo I que comprende tanto ectodominios IgV como IgC. Si bien la expresión de B7-H4 en tejidos sanos está relativamente limitada a nivel de proteína, B7-H4 se expresa en varios tumores sólidos, tales como carcinomas ginecológicos de mama, ovario y endometrio. La expresión de B7-H4 en tumores tiende a correlacionarse con un pronóstico negativo. El receptor para B7-H4 es

desconocido, pero se cree que se expresa en linfocitos T. Se cree que B7-H4 inhibe directamente la actividad de los linfocitos T.

[0005] Dada la expresión y función de B7-H4, se proporcionan en la presente anticuerpos que se unen específicamente a B7-H4 y el uso de estos anticuerpos para modular la actividad de B7-H4, incluso, por ejemplo, en el tratamiento del cáncer.

COMPENDIO

[0006] Se proporciona en la presente un anticuerpo aislado o fragmento de unión al antígeno de este que se une específicamente a B7-H4 humana, que comprende secuencias de la región determinante de la complementariedad (CDR) 1 de región variable de cadena pesada (VH), CDR2 VH, CDR3 VH y CDR1, CDR2 y CDR3 de región variable de cadena ligera (VL) seleccionadas del grupo que consiste en: SEQ ID NO:5-10, respectivamente; SEQ ID NO:15-20, respectivamente; SEQ ID NO:25-30, respectivamente; SEQ ID NO:35-40, respectivamente; SEQ ID NO:45-50, respectivamente; SEQ ID NO:55-60, respectivamente; SEQ ID NO:65-70, respectivamente; SEQ ID NO:75-80, respectivamente; SEQ ID NO:85-90, respectivamente; SEQ ID NO:95-100, respectivamente; SEQ ID NO:105-110, respectivamente; SEQ ID NO:115-120, respectivamente; SEQ ID NO:125-130, respectivamente; SEQ ID NO:135-140, respectivamente; SEQ ID NO:145-150, respectivamente; SEQ ID NO:155-160, respectivamente; SEQ ID NO:165-170, respectivamente; SEQ ID NO:175-180, respectivamente; SEQ ID NO:185-190, respectivamente; y SEQ ID NO:195-200, respectivamente.

[0007] En una modalidad, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este comprende una VH que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:11, 21, 31, 41, 464, 51, 61, 71, 81, 91, 101, 111, 121, 131, 141, 151, 161, 171, 181, 191 o 201.

[0008] En una modalidad, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este comprende una VL que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:12, 22, 32, 42, 52, 62, 72, 82, 92, 102, 112, 122, 132, 142, 152, 162, 172, 182, 192 o 202.

[0009] En una modalidad, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este comprende una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera, donde la región variable de cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:11, 21, 31, 41, 464, 51, 61, 71, 81, 91, 101, 111, 121, 131, 141, 151, 161, 171, 181, 191 o 201.

[00010] También se proporciona en la presente un anticuerpo aislado o fragmento de unión al

antígeno de este que se une específicamente a B7-H4 humana, donde el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera, donde la región variable de cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:12, 22, 32, 42, 52, 62, 72, 82, 92, 102, 112, 122, 132, 142, 152, 162, 172, 182, 192 o 202.

5 [00011] También se proporciona en la presente un anticuerpo aislado o fragmento de unión al antígeno de este que se une específicamente a B7-H4 humana, que comprende una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera que comprende las secuencias de aminoácidos de las: SEQ ID NO:11 y 12, respectivamente; SEQ ID NO:21 y 22, respectivamente; SEQ ID NO:31 y 32, respectivamente; SEQ ID NO:41 y 42, respectivamente; SEQ ID NO:464 y 42, respectivamente, SEQ ID NO:51 y 52, respectivamente; SEQ ID NO:61 y 62, respectivamente; SEQ ID NO:71 y 72, respectivamente; SEQ ID NO:81 y 82, respectivamente; SEQ ID NO:91 y 92, respectivamente; SEQ ID NO:101 y 102, respectivamente; SEQ ID NO:111 y 112, respectivamente; SEQ ID NO:121 y 122, respectivamente; SEQ ID NO:131 y 132, respectivamente; SEQ ID NO:141 y 142, respectivamente; SEQ ID NO:151 y 152, respectivamente; SEQ ID NO:161 y 162, respectivamente; SEQ ID NO:171 y 172, respectivamente; SEQ ID NO:181 y 182, respectivamente; SEQ ID NO:191 y 192, respectivamente; o SEQ ID NO:201 y 202, respectivamente.

[00012] En una modalidad, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este comprende una región constante de cadena pesada. En una modalidad, la región constante de cadena pesada se selecciona del grupo que consiste en regiones constantes de cadena pesada de inmunoglobulinas IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁ e IgA₂ humanas.

[00013] En una modalidad, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno comprende además una región constante de cadena ligera. En una modalidad, la región constante de cadena ligera se selecciona del grupo que consiste en regiones constantes de cadena ligera de inmunoglobulinas IgGκ e IgGλ humanas.

25 [00014] En una modalidad, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno comprende además una región constante de cadena pesada y una región constante de cadena ligera, donde la región constante de cadena pesada es una región constante de cadena pesada de IgG₁ humana, y donde la región constante de cadena ligera es una región constante de cadena ligera de IgGκ humana.

30 [00015] En una modalidad, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:13, 23, 33, 43, 469, 53, 63, 73, 83, 93, 103, 113, 123, 133, 143, 153, 163, 173, 183, 193 o 203.

[00016] En una modalidad, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este comprende una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:14, 24, 34, 44, 54, 64, 74, 84, 94, 104, 114, 124, 134, 144, 154, 164, 174, 184, 194 o 204.

5 [00017] En una modalidad, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este comprende una cadena pesada y una cadena ligera que comprende las secuencias de aminoácidos de las: SEQ ID NO:13 y 14, respectivamente; SEQ ID NO:23 y 24, respectivamente; SEQ ID NO:33 y 34, respectivamente; SEQ ID NO:43 y 44, respectivamente; SEQ ID NO:469 y 44, respectivamente; SEQ ID NO:53 y 54, respectivamente; SEQ ID NO:63 y 64, respectivamente; SEQ ID NO:73 y 74, respectivamente; SEQ ID NO:83 y 84, respectivamente; SEQ ID NO:93 y 94, respectivamente; SEQ ID NO:103 y 104, respectivamente; SEQ ID NO:113 y 114, respectivamente; SEQ ID NO:123 y 124, respectivamente; SEQ ID NO:133 y 134, respectivamente; SEQ ID NO:143 y 144, respectivamente; SEQ ID NO:153 y 154, respectivamente; SEQ ID NO:163 y 164, respectivamente; SEQ ID NO:173 y 174, respectivamente; SEQ ID NO:183 y 184, respectivamente; SEQ ID NO:193 y 194, respectivamente; o SEQ ID NO:203 y 204, respectivamente.

15 [00018] También se proporciona en la presente un anticuerpo aislado o fragmento de unión al antígeno que se une específicamente a B7-H4 humana, donde el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este comprende las CDR1 VH, CDR2 VH, CDR3 VH, CDR1 VL, CDR2 VL y CDR3 VL de un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en 15461, 20500, 20501, 20502, 20502.1, 22208, 15462, 22213, 15465, 20506, 15483, 20513, 22216, 15489, 20516, 15472, 15503, 15495, 15478, 20 15441 y 20496. En una modalidad, las CDR son las CDR definidas por Kabat, las CDR definidas por Chothia o las CDR definidas por AbM.

[00019] También se proporciona en la presente un anticuerpo aislado o fragmento de unión al antígeno de este que se une específicamente a B7-H4 humana, que comprende las secuencias de la región determinante de la complementariedad (CDR) 1 de región variable de cadena pesada (VH), CDR2 VH, CDR3 VH y CDR1, CDR2 y CDR3 de región variable de cadena ligera (VL) de las SEQ ID NO:458-463, respectivamente. En una modalidad, (i) el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:464 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:42 o (ii) el anticuerpo comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:469 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:44.

[00020] También se proporciona en la presente un anticuerpo aislado o fragmento de unión al antígeno de este que se une específicamente a B7-H4 humana, que comprende las secuencias de la región determinante de la complementariedad (CDR) 1 de región variable de cadena pesada (VH), CDR2 VH, CDR3 VH y CDR1, CDR2 y CDR3 de región variable de cadena ligera (VL) de las SEQ ID NO:35-40, respectivamente. En una modalidad, (i) el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:41 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:42 o (ii) el anticuerpo comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:43 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:44.

[00021] También se proporciona en la presente un anticuerpo aislado o fragmento de unión al antígeno de este que se une específicamente a B7-H4 humana, que comprende las secuencias de la región determinante de la complementariedad (CDR) 1 de región variable de cadena pesada (VH), CDR2 VH, CDR3 VH y CDR1, CDR2 y CDR3 de región variable de cadena ligera (VL) de las SEQ ID NO:65-70, respectivamente. En una modalidad, (i) el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:71 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:72 o (ii) donde el anticuerpo comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:73 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:74.

[00022] Además, se proporciona en la presente un anticuerpo aislado o un fragmento de unión al antígeno de este que se une al mismo epítipo de B7-H4 humana como el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este de cualquiera de las reivindicaciones 1-20. En una modalidad, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este se une al mismo epítipo de B7-H4 humana según se determina mediante SPR.

[00023] En una modalidad, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este es un anticuerpo humano o un fragmento de unión al antígeno de este. En una modalidad, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este es un anticuerpo murino, humanizado o quimérico o un fragmento de unión al antígeno de este.

[00024] En una modalidad, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este induce la proliferación de linfocitos T. En una modalidad, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno

aumenta la proliferación de linfocitos T en al menos 21 % en comparación con el tratamiento con un anticuerpo de control. En una modalidad, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno aumenta la proliferación de linfocitos T de entre alrededor de 5 % a alrededor de 35 % en comparación con el tratamiento con un anticuerpo de control. En una modalidad, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este induce la proliferación de linfocitos T CD4+. En una modalidad, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este aumenta la proliferación de linfocitos T CD4+ en al menos 9 % en comparación con el tratamiento con un anticuerpo de control. En una modalidad, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este aumenta la proliferación de linfocitos T CD4+ de entre alrededor de 5 % a alrededor de 15 % en comparación con el tratamiento con un anticuerpo de control. En una modalidad, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este induce la proliferación de linfocitos T CD8+. En una modalidad, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este aumenta la proliferación de linfocitos T CD8+ en al menos 11 % en comparación con el tratamiento con un anticuerpo de control. En una modalidad, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este aumenta la proliferación de linfocitos T CD8+ de entre alrededor de 5 % a alrededor de 15 % en comparación con el tratamiento con un anticuerpo de control.

[00025] En una modalidad, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este induce la producción de interferón gamma (IFN γ). En una modalidad, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este es capaz de aumentar la producción de IFN γ al menos 2 veces, al menos 3 veces, al menos 4 veces, al menos 5 veces, al menos 6 veces, al menos 7 veces, al menos 8 veces, entre al menos 2 veces y al menos 10 veces, o entre al menos 3 veces y al menos 10 veces.

[00026] En una modalidad, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este es capaz de inducir citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC, por sus siglas en inglés) en una célula que expresa B7-H4. En una modalidad, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este induce lisis específica en al menos 20 %, al menos 30 %, al menos 40 %, entre alrededor de 20 % y alrededor de 50 %, o entre alrededor de 30 % y alrededor de 50 % de células que expresan B7-H4.

[00027] En una modalidad, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este inhibe el crecimiento tumoral en un modelo de carcinoma colorrectal CT26, un modelo 4T1 de carcinoma de mama murino o un modelo B16-moB7-H4/H3 de línea celular de melanoma. En una modalidad, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este reduce el crecimiento tumoral en al menos 25 %, al menos 30 %, al menos 40 %, al menos 45 % o al menos 50 % en comparación con el tratamiento con un anticuerpo de control.

[00028] En una modalidad, la inducción de la proliferación de linfocitos T, la inducción de la proliferación de linfocitos T CD4+, la inducción de la proliferación de linfocitos T CD8+, la inducción de la producción de IFN γ , la actividad de ADCC y/o la inhibición del crecimiento tumoral depende de la dosis.

5 [00029] En una modalidad, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este se une a B7-H4 de mono cynomolgus. En una modalidad, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este se une a B7-H4 de rata. En una modalidad, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este se une a B7-H4 de ratón. En una modalidad, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este se une a B7-H4 humana, B7-H4 de mono cynomolgus, B7-H4 de rata y B7-H4 de ratón.

10 [00030] En una modalidad, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este se une al dominio IgV de B7-H4 humana.

[00031] En una modalidad, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este se encuentra afucosilado.

15 [00032] En una modalidad, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este es un anticuerpo de longitud completa. En una modalidad, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este es un fragmento de unión al antígeno. En una modalidad, el fragmento de unión al antígeno comprende un Fab, Fab', F(ab')₂, Fd, Fv de cadena simple o scFv, Fv unido por disulfuro, dominio V-NAR, IgNar, intracuerpo, IgG Δ CH2, minicuerpo, F(ab')₃, tetracuerpo, triacuerpo, diacuerpo, anticuerpo de dominio simple, DVD-Ig, Fcab, mAb², (scFv)₂ o scFv-Fc.

20 [00033] En una modalidad, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este comprende además una etiqueta detectable.

[00034] También se proporciona en la presente un polinucleótido aislado que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica la región variable de cadena pesada o la cadena pesada de un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este que se proporciona en la presente. En una
25 modalidad, la molécula de ácido nucleico codifica la VH de la SEQ ID NO:11, 21, 31, 41, 464, 51, 61, 71, 81, 91, 101, 111, 121, 131, 141, 151, 161, 171, 181, 191 o 201 o la cadena pesada de la SEQ ID NO:13, 23, 33, 43, 469, 53, 63, 73, 83, 93, 103, 113, 123, 133, 143, 153, 163, 173, 183, 193 o 203. En una modalidad, la molécula de ácido nucleico comprende la secuencia de la SEQ ID NO:213, 223, 233, 243, 470, 253, 263, 273, 283, 293, 303, 313, 323, 333, 343, 353, 363, 373, 383, 393 o 403. En
30 una modalidad, la molécula de ácido nucleico comprende (i) la secuencia de la SEQ ID NO:213, 223,

233, 243, 470, 253, 263, 273, 283, 293, 303, 313, 323, 333, 343, 353, 363, 373, 383, 393 o 403 y (ii) la secuencia de la SEQ ID NO:408.

[00035] También se proporciona en la presente un polinucleótido aislado que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica la región variable de cadena ligera o la cadena ligera de un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este que se proporciona en la presente. En una modalidad, la molécula de ácido nucleico codifica la VL de la SEQ ID NO:12, 22, 32, 42, 52, 62, 72, 82, 92, 102, 112, 122, 132, 142, 152, 162, 172, 182, 192 o 202 o la cadena ligera de la SEQ ID NO:14, 24, 34, 44, 54, 64, 74, 84, 94, 104, 114, 124, 134, 144, 154, 164, 174, 184, 194 o 204. En una modalidad, la molécula de ácido nucleico comprende la secuencia de la SEQ ID NO:214, 224, 234, 244, 254, 264, 274, 284, 294, 304, 314, 324, 334, 344, 354, 364, 374, 384, 394 o 404. En una modalidad, la molécula de ácido nucleico comprende (i) la secuencia de la SEQ ID NO:214, 224, 234, 244, 254, 264, 274, 284, 294, 304, 314, 324, 334, 344, 354, 364, 374, 384, 394 o 404 y (ii) la secuencia de la SEQ ID NO:406.

[00036] También se proporciona en la presente un polinucleótido aislado que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica la región variable de cadena pesada o la cadena pesada de un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno que se proporciona en la presente y la región variable de cadena ligera o la cadena ligera del anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este.

[00037] También se proporciona en la presente un vector aislado que comprende un polinucleótido que se proporciona en la presente.

[00038] También se proporciona en la presente una célula hospedadora que comprende un polinucleótido que se proporciona en la presente, un vector que se proporciona en la presente, un primer vector que comprende un polinucleótido que se proporciona en la presente (por ejemplo, un polinucleótido que comprende un ácido nucleico que codifica una cadena pesada o cadena pesada variable) y un segundo vector que comprende otro polinucleótido que se proporciona en la presente (por ejemplo, un polinucleótido que comprende un ácido nucleico que codifica una cadena ligera o cadena ligera variable). En una modalidad, la célula hospedadora es una célula que se selecciona del grupo que consiste en una célula de *E. coli*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Streptomyces*, levadura, CHO, YB/20, NS0, PER-C6, HEK-293T, NIH-3T3, HeLa, BHK, Hep G2, SP2/0, R1.1, B-W, L-M, COS 1, COS 7, BSC1, BSC40, BMT10, célula vegetal, célula de insecto y una célula humana en cultivo de tejido. En una modalidad, la célula hospedadora es una célula CHO. En una modalidad, la célula hospedadora (por ejemplo, una célula hospedadora de mamífero, tal como una célula CHO) carece

de un gen de alfa-1,6-fucosiltransferasa (FUT8) funcional.

[00039] También se proporciona en la presente un método (por ejemplo, un método in vitro) para producir un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este que se une a B7-H4 humana que comprende cultivar una célula hospedadora que se proporciona en la presente de manera que se exprese una molécula de ácido nucleico y se produzca el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este.

[00040] También se proporciona en la presente un anticuerpo aislado o fragmento de unión al antígeno de este que se une específicamente a B7-H4 humana y se codifica mediante un polinucleótido que se proporciona en la presente.

[00041] También se proporciona en la presente una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este que se proporciona en la presente, un polinucleótido que se proporciona en la presente, un vector que se proporciona en la presente o una célula hospedadora que se proporciona en la presente; y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

[00042] También se proporciona en la presente una composición farmacéutica que comprende (i) anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno que se proporcionan en la presente y (ii) un excipiente farmacéuticamente aceptable, donde al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % de los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno de estos en la composición están afucosilados.

[00043] También se proporciona en la presente una composición farmacéutica que comprende (i) anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno que se proporcionan en la presente y (ii) un excipiente farmacéuticamente aceptable, donde al menos 95 % de los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno de estos en la composición están afucosilados.

[00044] También se proporciona en la presente una composición farmacéutica que comprende (i) anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno de estos que se unen específicamente a B7-H4 humana y comprenden secuencias de región determinante de la complementariedad (CDR) 1 de región variable de cadena pesada (VH), CDR2 VH, CDR3 VH y CDR1, CDR2 y CDR3 de región variable de cadena ligera (VL) de las SEQ ID NO:458-463, respectivamente y (ii) un excipiente farmacéuticamente aceptable, donde al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % de los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno de estos en la composición están afucosilados. En una modalidad, (i) el anticuerpo

o fragmento de unión al antígeno de este comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:464 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:42 o (ii) el anticuerpo comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:469 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:44.

[00045] También se proporciona en la presente una composición farmacéutica que comprende (i) anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno de estos que se unen específicamente a B7-H4 humana y comprenden secuencias de región determinante de la complementariedad (CDR) 1 de región variable de cadena pesada (VH), CDR2 VH, CDR3 VH y CDR1, CDR2 y CDR3 de región variable de cadena ligera (VL) de las SEQ ID NO:458-463, respectivamente y (ii) un excipiente farmacéuticamente aceptable, donde al menos 95 % de los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno de estos en la composición están afucosilados. En una modalidad, (i) el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:464 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:42 o (ii) el anticuerpo comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:469 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:44.

[00046] También se proporciona en la presente una composición farmacéutica que comprende (i) anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno de estos que se unen específicamente a B7-H4 humana y comprenden secuencias de región determinante de la complementariedad (CDR) 1 de región variable de cadena pesada (VH), CDR2 VH, CDR3 VH y CDR1, CDR2 y CDR3 de región variable de cadena ligera (VL) de las SEQ ID NO:35-40, respectivamente y (ii) un excipiente farmacéuticamente aceptable, donde al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % de los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno de estos en la composición están afucosilados. En una modalidad, (i) el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:41 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:42 o (ii) el anticuerpo comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:43 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:44.

[00047] También se proporciona en la presente una composición farmacéutica que comprende (i) anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno de estos que se unen específicamente a B7-H4

humana y comprenden secuencias de región determinante de la complementariedad (CDR) 1 de región variable de cadena pesada (VH), CDR2 VH, CDR3 VH y CDR1, CDR2 y CDR3 de región variable de cadena ligera (VL) de las SEQ ID NO:35-40, respectivamente y (ii) un excipiente farmacéuticamente aceptable, donde al menos 95 % de los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno de estos en la composición están afucosilados. En una modalidad, (i) el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:41 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:42 o (ii) el anticuerpo comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:43 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:44.

[00048] También se proporciona en la presente una composición farmacéutica que comprende (i) anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno de estos que se unen específicamente a B7-H4 humana y comprenden secuencias de región determinante de la complementariedad (CDR) 1 de región variable de cadena pesada (VH), CDR2 VH, CDR3 VH y CDR1, CDR2 y CDR3 de región variable de cadena ligera (VL) de las SEQ ID NO:65-70, respectivamente y (ii) un excipiente farmacéuticamente aceptable, donde al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % de los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno de estos en la composición están afucosilados. En una modalidad, (i) el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:71 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:72 o (ii) donde el anticuerpo comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:73 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:74.

[00049] También se proporciona en la presente una composición farmacéutica que comprende (i) anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno de estos que se unen específicamente a B7-H4 humana y comprenden secuencias de región determinante de la complementariedad (CDR) 1 de región variable de cadena pesada (VH), CDR2 VH, CDR3 VH y CDR1, CDR2 y CDR3 de región variable de cadena ligera (VL) de las SEQ ID NO:65-70, respectivamente y (ii) un excipiente farmacéuticamente aceptable, donde al menos 95 % de los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno de estos en la composición están afucosilados. En una modalidad, (i) el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:71 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:72 o (ii) donde el anticuerpo

comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:73 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:74.

[00050] En una modalidad, la fucosilación es indetectable en la composición.

5 [00051] También se proporciona en la presente un método para inducir la proliferación de linfocitos T que comprende poner en contacto un linfocito T con un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este que se proporciona en la presente, un polinucleótido que se proporciona en la presente, un vector que se proporciona en la presente, una célula hospedadora que se proporciona en la presente o una composición farmacéutica que se proporciona en la presente. En una
10 modalidad, la proliferación de linfocitos T se reduce en al menos 30 %, al menos 40 %, al menos 50 %, al menos 60 %, al menos 70 % o al menos 80 % (por ejemplo, en comparación con el tratamiento con un anticuerpo de control).

[00052] También se proporciona en la presente un método para inducir la proliferación de linfocitos T CD4+ que comprende poner en contacto un linfocito T CD4+ con un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este que se proporciona en la presente, un polinucleótido que se proporciona en
15 la presente, un vector que se proporciona en la presente, una célula hospedadora que se proporciona en la presente o una composición farmacéutica que se proporciona en la presente. En una modalidad, la proliferación de linfocitos T CD4+ se reduce en al menos 30 %, al menos 40 %, al menos 50 %, al menos 60 %, al menos 70 % o al menos 80 % (por ejemplo, en comparación con el tratamiento con un anticuerpo de control).

20 [00053] También se proporciona en la presente un método para inducir la proliferación de linfocitos T CD8+ que comprende poner en contacto un linfocito T CD8+ con un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este que se proporciona en la presente, un polinucleótido que se proporciona en la presente, un vector que se proporciona en la presente, una célula hospedadora que se proporciona en la presente o una composición farmacéutica que se proporciona en la presente. En una
25 modalidad, la proliferación de linfocitos T CD8+ se reduce en al menos 30 %, al menos 40 %, al menos 50 %, al menos 60 %, al menos 70 % o al menos 80 % (por ejemplo, en comparación con el tratamiento con un anticuerpo de control).

[00054] También se proporciona en la presente un método para inducir la producción de interferón gamma que comprende poner en contacto un linfocito T con un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este que se proporciona en la presente, un polinucleótido que se proporciona en la
30 presente, un vector que se proporciona en la presente, una célula hospedadora que se proporciona

en la presente o una composición farmacéutica que se proporciona en la presente. En una modalidad, la producción de interferón gamma aumenta en al menos 30 %, al menos 40 %, al menos 50 %, al menos 60 %, al menos 70 % o al menos 80 % (por ejemplo, en comparación con el tratamiento con un anticuerpo de control).

5 [00055] También se proporciona en la presente un método para destruir una célula que expresa B7-H4 que comprende poner en contacto la célula con un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este que se proporciona en la presente, un polinucleótido que se proporciona en la presente, un vector que se proporciona en la presente, una célula hospedadora que se proporciona en la presente o una composición farmacéutica que se proporciona en la presente.

10 [00056] También se proporciona en la presente un método para agotar las células que expresan B7-H4 en una población de células que comprende poner en contacto la población de células con un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este que se proporciona en la presente, un polinucleótido que se proporciona en la presente, un vector que se proporciona en la presente, una célula hospedadora que se proporciona en la presente o una composición farmacéutica que se
15 proporciona en la presente.

[00057] En una modalidad, la destrucción o agotamiento se produce por medio de ADCC.

[00058] En una modalidad, el contacto es *in vitro*. En una modalidad, el contacto es en un sujeto.

[00059] También se proporciona en la presente un método para tratar el cáncer en un sujeto, donde el método comprende administrarle al sujeto una cantidad eficaz de un anticuerpo o fragmento de
20 unión al antígeno de este que se proporciona en la presente, un polinucleótido que se proporciona en la presente, un vector que se proporciona en la presente, una célula hospedadora que se proporciona en la presente o una composición farmacéutica que se proporciona en la presente. En una modalidad, el cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer de mama, tal como cáncer de mama triple negativo o carcinoma ductal invasivo, carcinoma de endometrio, cáncer de ovario,
25 cáncer de pulmón no microcítico, cáncer de páncreas, cáncer de tiroides, cáncer renal y cáncer de vejiga. En una modalidad, el cáncer de mama es cáncer de mama triple negativo o donde el cáncer de pulmón no microcítico es carcinoma de células escamosas. En una modalidad, el cáncer de pulmón no microcítico es un adenocarcinoma. En una modalidad, el cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer de cabeza y cuello, cáncer de pulmón microcítico, cáncer gástrico y
30 melanoma. En una modalidad, el cáncer de ovario es adenocarcinoma seroso. En una modalidad, el cáncer de mama es adenocarcinoma ductal.

[00060] En una modalidad, el cáncer tiene respuesta inadecuada al inhibidor de PD-1 y/o respuesta inadecuada al inhibidor de PD-L1. En una modalidad, el cáncer expresa un nivel bajo de PD-L1.

[00061] En una modalidad, el sujeto es un ser humano.

5 [00062] También se proporciona en la presente un método para detectar B7-H4 en una muestra que comprende poner en contacto dicha muestra con un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este que se proporciona en la presente. En una modalidad, la muestra se obtiene de un cáncer en un sujeto humano.

10 [00063] También se proporciona en la presente un kit que comprende un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este que se proporciona en la presente, un polinucleótido que se proporciona en la presente, un vector que se proporciona en la presente, una célula hospedadora que se proporciona en la presente o una composición farmacéutica que se proporciona en la presente y a) un reactivo de detección, b) un antígeno de B7-H4, c) un aviso que refleje la aprobación para uso o venta para administración a seres humanos o d) una combinación de estos.

15 [00064] También se proporciona en la presente un anticuerpo aislado o fragmento de unión al antígeno, donde el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno inhibe la actividad de bloqueo de punto de control de linfocitos T de B7-H4. En una modalidad, la actividad de bloqueo de punto de control de linfocitos T se mide mediante un aumento en la producción de IL-2 en relación con células de control.

20 [00065] También se proporciona en la presente una composición farmacéutica que comprende (i) anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno y (ii) un excipiente farmacéuticamente aceptable, donde los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno inhiben la actividad de bloqueo de punto de control de linfocitos T de B7-H4. En una modalidad, la actividad de bloqueo de punto de control de linfocitos T se mide mediante un aumento en la producción de IL-2 en relación con células de control.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

25 [00066] La **Figura 1A** muestra la expresión de B7-H4 en una variedad de tejidos tumorales. (Véase el Ejemplo 1.)

[00067] La **Figura 1B** muestra la prevalencia de B7-H4 en diversos tipos de tumores mediante IHC. (Véase el Ejemplo 1.)

- [00068] La **Figura 2A** muestra la unión de los anticuerpos de B7-H4 a células HEK293T que expresan B7-H4 humana, de mono cynomolgus o de ratón. (Véase el Ejemplo 6.)
- [00069] La **Figura 2B** muestra la unión de anticuerpos de B7-H4 a células SK-BR-3 y a células HEK293T que expresan B7-H4 de ratón, mono cynomolgus o rata. (Véase el Ejemplo 6.)
- 5 [00070] La **Figura 3A** muestra el efecto de anticuerpos de B7-H4 sobre la proliferación de linfocitos T totales, CD4⁺ o CD8⁺. (Véase el Ejemplo 7.)
- [00071] La **Figura 3B** muestra el efecto de anticuerpos de B7-H4 sobre la producción de interferón gamma (IFN γ). (Véase el Ejemplo 7.)
- 10 [00072] La **Figura 3C** muestra el efecto de anticuerpos de B7-H4 sobre la proliferación de linfocitos T totales, CD4⁺ o CD8⁺ y sobre la producción de interferón gamma (IFN γ). (Véase el Ejemplo 7.)
- [00073] La **Figura 3D** muestra el efecto de diversas concentraciones de anticuerpos de B7-H4 sobre la producción de interferón gamma (IFN γ). (Véase el Ejemplo 7.)
- 15 [00074] Las **Figuras 4A-4D** muestran la unión de anticuerpos fucosilados y afucosilados con B7-H4 en células SK-BR-3 (Figura 4A) y con células HEK293T que expresan B7-H4 de ratón (Figura 4B), mono cynomolgus (Figura 4C) o rata (Figura 4D). (Véase el Ejemplo 9.)
- [00075] Las **Figuras 5A y 5B** muestran la unión de anticuerpos de B7-H4 afucosilados y fucosilados (respectivamente) con el alelo V158 del receptor IIIa de Fc γ (Fc γ RIIIa). (Véase el Ejemplo 10.)
- 20 [00076] La **Figura 6A** muestra la actividad de bloqueo de punto de control de linfocitos T de anticuerpos de B7-H4 fucosilados y afucosilados. (Véase el Ejemplo 11.)
- [00077] La **Figura 6B** muestra la actividad de ligando de punto de control de linfocitos T de anticuerpos de B7-H4 afucosilados en comparación con un isotipo de control que se midió mediante la producción de IL-2. (Véase el Ejemplo 11.)
- 25 [00078] La **Figura 7** muestra la actividad de ADCC de anticuerpos de B7-H4 fucosilados y afucosilados contra una línea celular que expresa B7-H4. (Véase el Ejemplo 12.)
- [00079] La **Figura 8** muestra la actividad de ADCC de anticuerpos de B7-H4 fucosilados y afucosilados contra células con diversos niveles de expresión de B7-H4. (Véase el Ejemplo 13.)

[00080] La **Figura 9A** muestra la eficacia antitumoral *in vivo* del anticuerpo de B7-H4 20502. (Véase el Ejemplo 14.)

[00081] La **Figura 9B** muestra la eficacia antitumoral *in vivo* del anticuerpo de B7-H4 22213. (Véase el Ejemplo 14.)

5 [00082] La **Figura 10** muestra la eficacia antitumoral *in vivo* de una versión murina del anticuerpo de B7-H4 20502 en ratones en los que se implantaron células 4T1 (carcinoma de mama) y B16 (melanoma). (Véase el Ejemplo 14.)

10 [00083] La **Figura 11** muestra la eficacia antitumoral *in vivo* de 20502 afucosilado en un modelo de xenoinjerto de cáncer de mama humana MX-1. Las imágenes muestran la expresión de B7-H4 humana en el tumor de xenoinjerto de MX-1 (izquierda) y la expresión de B7-H4 murina en los tumores 4T1 (derecha). (Véase el Ejemplo 14.)

[00084] Las **Figuras 12A-12C** muestran la eficacia antitumoral *in vivo* de 20502-mslgG2a-F administrado el mismo día que un anticuerpo anti-PD-1. (Véase el Ejemplo 15.) * indica $p < 0,05$; y **** indica $p < 0,0001$.

15 [00085] La **Figura 13** muestra que el tratamiento con 20502 afucosilado (paneles inferiores) da como resultado la infiltración de células NK (paneles izquierdos), infiltración de linfocito T (paneles centrales) y regulación por incremento de PD-L1 (paneles derechos) en comparación con el tratamiento con un anticuerpo de control (paneles superiores). (Véase el Ejemplo 16.)

20 [00086] La **Figura 14A** muestra que el anticuerpo 20502-mslgG2a-F reduce significativamente el crecimiento tumoral en células de carcinoma de mama 4T1 en una manera dependiente de la dosis. (Véase el Ejemplo 17.)

25 [00087] La **Figura 14B** muestra que el anticuerpo 20502-mslgG2a-F inhibe significativamente el crecimiento tumoral a 30 mg/kg ($p = 0,0003$), 20 mg/kg ($p = 0,0103$), 10 mg/kg ($p = 0,0419$), 3 mg/kg ($p = 0,0277$) y 1 mg/kg ($p = 0,0333$) según se evalúa mediante ANOVA de una vía en el Día 30. (Véase el Ejemplo 17.)

[00088] La **Figura 15A** muestra que el anticuerpo 20502-mslgG2a-F reduce significativamente el crecimiento de B16 que expresa B7-H4/H3. (Véase el Ejemplo 17.)

[00089] La **Figura 15 B** muestra que el anticuerpo 20502-mslgG2a-F inhibe significativamente el

crecimiento tumoral a 30 mg/kg ($p = 0,0085$), 20 mg/kg ($p = 0,0041$), 10 mg/kg ($p = 0,0017$) y 3 mg/kg ($p = 0,0420$) según se evalúa mediante ANOVA de una vía en el Día 23. (Véase el Ejemplo 17.)

DESCRIPCIÓN DETALLADA

5 [00090] Se proporcionan en la presente anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos monoclonales) y fragmentos de unión al antígeno de estos que se unen específicamente a B7-H4 (por ejemplo, B7-H4 humana). Los anticuerpos anti-B7-H4 y fragmentos de unión al antígeno de estos pueden, por ejemplo, dar como resultado una actividad de bloqueo de punto de control de linfocitos T (por ejemplo, según se mide mediante un aumento de interferón gamma (IFN γ), proliferación de linfocitos T CD4, proliferación de linfocitos T CD8 y/o proliferación de linfocitos T totales) y/o tener una citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (actividad de ADCC).

10 [00091] También se proporcionan ácidos nucleicos aislados (polinucleótidos), tales como ADN complementario (ADNc), que codifican dichos anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno de estos. Se proporcionan además vectores (por ejemplo, vectores de expresión) y células (por ejemplo, células hospedadoras) que comprenden ácidos nucleicos (polinucleótidos) que codifican dichos anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno de estos. También se proporcionan métodos para elaborar dichos anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno de estos. En otros aspectos, se proporcionan en la presente métodos para tratar determinadas afecciones, tal como el cáncer. También se proporcionan composiciones relacionadas (por ejemplo, composiciones farmacéuticas), kits y métodos de detección.

1.1 Terminología

25 [00092] Tal como se usa en la presente, el término “B7-H4” se refiere a polipéptidos B7-H4 de mamífero, incluso, de modo no taxativo, polipéptidos B7-H4 naturales e isoformas de polipéptidos B7-H4. “B7-H4” comprende polipéptidos B7-H4 sin procesar de longitud completa, así como formas de polipéptidos B7-H4 que surgen del procesamiento dentro de la célula. Tal como se usa en la presente, el término “B7-H4 humana” se refiere a un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:1. Un “polinucleótido de B7-H4”, “nucleótido de B7-H4” o “ácido nucleico de B7-H4” se refiere a un polinucleótido que codifica B7-H4.

30 [00093] El término “PD-1”, tal como se usa en la presente, se refiere a polipéptidos PD-1 de mamífero, incluso, de modo no taxativo, polipéptidos PD-1 naturales e isoformas de polipéptidos PD-

1. PD-1 también se denomina proteína de la muerte programada 1 o proteína de la muerte celular programada 1. “PD-1” comprende polipéptidos PD-1 sin procesar de longitud completa, así como formas de polipéptidos PD-1 que surgen del procesamiento en la célula. Tal como se usa en la presente, el término “PD-1 humana” se refiere a un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:439:

PGWFLDSPDR PWNPTTFSPA LLVVTEGDNA TFTCSFSNTS ESFVLNWYRM SPSNQTDKLA
 AFPEDRSQPG QDCRFRVTQL PNGRDFHMSV VRARRNDSGT YLCGAISLAP KAKIKESLRA
 ELRVTERRAE VPTAHPSPSP RPAGQFQTLV VGVVGGLLS LVLLVWVLAV ICSRAARGTI
 GARRTGQPLK EDPSAVPVFS VDYGELDFQW REKTPEPPVP CVPEQTEYAT IVFPSGMGTS
 SPARRGSADG PRSAQPLRPE DGHCSWPL (SEQ ID NO:439) (PD-1 humana madura sin una
 secuencia de señal). Un “polinucleótido de PD-1”, “nucleótido de PD-1” o “ácido nucleico de PD-1” se refiere a un polinucleótido que codifica PD-1.

[00094] El término "anticuerpo" se refiere a una molécula de inmunoglobulina que reconoce y se une específicamente a un objetivo, tal como una proteína, polipéptido, péptido, carbohidrato, polinucleótido, lípido o combinaciones de los anteriores, a través de al menos un sitio de reconocimiento de antígeno dentro de la región variable de la molécula de inmunoglobulina. Tal como se usa en la presente, el término “anticuerpo” comprende anticuerpos policlonales intactos, anticuerpos monoclonales intactos, anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados, anticuerpos humanos, proteínas de fusión que comprenden un anticuerpo y cualquier otra molécula de inmunoglobulina modificada, siempre que los anticuerpos presenten la actividad biológica deseada. Un anticuerpo puede ser de cualquiera de las cinco clases fundamentales de inmunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, o subclases (isotipos) de estas (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2) de acuerdo a la identidad de sus dominios constantes de cadena pesada a los que se hace referencia como alfa, delta, épsilon, gamma y mu, respectivamente. Las diferentes clases de inmunoglobulinas tienen estructuras de subunidades y configuraciones tridimensionales diferentes y conocidas. Los anticuerpos pueden estar no conjugados o conjugados con otras moléculas, tales como toxinas, radioisótopos, etc.

[00095] La expresión “fragmento de anticuerpo” se refiere a una parte de un anticuerpo intacto. Un “fragmento de unión al antígeno”, “dominio de unión al antígeno” o “región de unión al antígeno” se refiere a una parte de un anticuerpo intacto que se une a un antígeno. Un fragmento de unión al antígeno puede contener las regiones determinantes antigénicas de un anticuerpo intacto (por ejemplo, regiones determinantes de la complementariedad (CDR)). Los ejemplos de fragmentos de

unión al antígeno de anticuerpos incluyen, de modo no taxativo, fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂ y Fv, anticuerpos lineales y anticuerpos de cadena simple. Un fragmento de unión al antígeno de un anticuerpo puede derivar de cualquier especie animal, tales como roedores (por ejemplo, ratón, rata o hámster) y seres humanos o pueden producirse de forma artificial.

5 [00096] Los términos “anticuerpo anti-B7-H4”, “anticuerpo de B7-H4” o “un anticuerpo que se une a B7-H4” se refieren a un anticuerpo que es capaz de unirse a B7-H4 con suficiente afinidad de modo que el anticuerpo sea útil como agente de diagnóstico y/o terapéutico al dirigirse a B7-H4. El alcance de la unión de un anticuerpo anti-B7-H4 con una proteína no B7-H4 no relacionada puede ser menor que alrededor de 10 % de la unión del anticuerpo con B7-H4 según se mide, por ejemplo, mediante
10 un radioinmunoensayo (RIA).

[00097] Los términos “anticuerpo anti-PD-1”, “anticuerpo de PD-1” o “un anticuerpo que se une a PD-1” se refieren a un anticuerpo que es capaz de unirse a PD-1 con suficiente afinidad de modo que el anticuerpo sea útil como agente de diagnóstico y/o terapéutico al dirigirse a PD-1. El alcance de la unión de un anticuerpo anti-PD-1 a una proteína no PD-1 no relacionada puede ser menor que
15 alrededor de 10 % de la unión del anticuerpo a PD-1 tal como se midió, por ejemplo, mediante un radioinmunoensayo (RIA).

[00098] Un anticuerpo “monoclonal” o fragmento de unión al antígeno de este se refiere a una población de anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno homogénea que participa en el reconocimiento y unión altamente específicos de un determinante antigénico único o epítipo. Esto es
20 opuesto a los anticuerpos policlonales que típicamente incluyen diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes antigénicos. La expresión anticuerpo “monoclonal” o fragmento de unión al antígeno de este abarca tanto anticuerpos monoclonales de longitud completa e intactos como fragmentos de anticuerpos (tales como Fab, Fab', F(ab')₂, Fv), mutantes de cadena simple (scFv), proteínas de fusión que comprenden una parte de anticuerpo y otras moléculas de
25 inmunoglobulina modificada que comprenden un sitio de reconocimiento de antígeno. Además, anticuerpo “monoclonal” o fragmento de unión al antígeno de este se refiere a dichos anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno de estos elaborados de cualquier cantidad de formas, incluso, de modo no taxativo, hibridoma, selección de fagos, expresión recombinante y animales transgénicos.

[00099] Tal como se usan en la presente, “región variable” o “dominio variable” se usan de forma
30 indistinta y son comunes en la técnica. La región variable típicamente hace referencia a una parte de un anticuerpo, generalmente una parte de una cadena ligera o pesada, típicamente de alrededor de

110 a 120 aminoácidos o 110 a 125 aminoácidos de extremo amino en la cadena pesada madura y alrededor de 90 a 115 aminoácidos en la cadena ligera madura, que difieren ampliamente en la secuencia entre los anticuerpos y se usan en la unión y especificidad de un anticuerpo particular para su antígeno particular. La variabilidad en la secuencia se concentra en dichas regiones denominadas regiones determinantes de complementariedad (CDR), mientras que las regiones más conservadas en el dominio variable se denominan regiones marco (FR, por sus siglas en inglés). Sin pretender limitarse por ninguna teoría o mecanismo en particular, se cree que las CDR de las cadenas ligera y pesada son principalmente responsables de la interacción y especificidad del anticuerpo con el antígeno. En determinadas modalidades, la región variable es una región variable humana. En determinadas modalidades, la región variable comprende CDR de roedor o murinas y regiones marco (FR) humanas. En modalidades particulares, la región variable es una región variable de primate (por ejemplo, primate no humano). En determinadas modalidades, la región variable comprende CDR de roedor o murinas y regiones marco (FR) de primate (por ejemplo, primate no humano).

[000100] Las expresiones "VL" y "dominio de VL" se usan de forma indistinta para hacer referencia a la región variable de cadena ligera de un anticuerpo.

[000101] Las expresiones "VH" y "dominio de VH" se usan de forma indistinta para hacer referencia a la región variable de cadena pesada de un anticuerpo.

[000102] Se reconocen en la técnica la expresión "numeración de Kabat" y expresiones similares, que hacen referencia a un sistema de numeración de residuos de aminoácidos en las regiones variables de cadenas pesada y ligera de un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno de este. En determinados aspectos, las CDR se pueden determinar conforme al sistema de numeración de Kabat (véase, por ejemplo, Kabat EA & Wu TT (1971) Ann NY Acad Sci 190: 382-391 y Kabat EA et ál., (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, quinta edición, U.S. Department of Health and Human Services, publicación de NIH n.º 91-3242). Al usar el sistema de numeración de Kabat, las CDR dentro de una molécula de cadena pesada del anticuerpo típicamente se encuentran presentes en las posiciones de aminoácidos 31 a 35, que opcionalmente pueden incluir uno o dos aminoácidos adicionales, después de 35 (denominado en el esquema de numeración de Kabat como 35A y 35B) (CDR1), posiciones de aminoácidos 50 a 65 (CDR2) y posiciones de aminoácidos 95 a 102 (CDR3). Al usar el sistema de numeración de Kabat, las CDR dentro de una molécula de cadena ligera de anticuerpo típicamente se encuentran presentes en las posiciones de aminoácidos 24 a 34 (CDR1), posiciones de aminoácidos 50 a 56 (CDR2) y posiciones de aminoácidos 89 a 97 (CDR3). En una modalidad específica, se han determinado las CDR de los anticuerpos descritos en

la presente de acuerdo con el esquema de numeración de Kabat.

[000103] Chothia, en cambio, hace referencia a la ubicación de los bucles estructurales (Chothia y Lesk J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987)). El extremo del bucle CDR-H1 de Chothia, cuando se enumera mediante el uso de la convención de numeración de Kabat varía entre H32 y H34 según la longitud del bucle (esto se debe a que el esquema de numeración de Kabat ubica las inserciones en H35A y H35B; si 35A y 35B no están presentes, el bucle finaliza en 32; si solo 35A está presente, el bucle termina en 33; si tanto 35A como 35B están presente, el bucle termina en 34). Las regiones hipervariables AbM representan un punto medio entre las CDR de Kabat y los bucles estructurales de Chothia y son utilizadas por el software de modelado de anticuerpos AbM de Oxford Molecular.

Bucle	Kabat	AbM	Chothia
L1	L24-L34	L24-L34	L24-L34
L2	L50-L56	L50-L56	L50-L56
L3	L89-L97	L89-L97	L89-L97
H1	H31-H35B	H26-H35B (Numeración de Kabat)	H26-H32..34
H1	H31-H35	H26-H35 (Numeración de Chothia)	H26-H32
H2	H50-H65	H50-H58	H52-H56
H3	H95-H102	H95-H102	H95-H102

[000104] Tal como se utiliza en la presente, la expresión “región constante” o “dominio constante” son intercambiables y tienen un significado común en la técnica. La región constante es una parte de anticuerpo, por ejemplo, una parte de extremo carboxilo de una cadena ligera y/o pesada no está directamente implicada en la unión de un anticuerpo al antígeno, pero que puede presentar diversas funciones efectoras, tales como la interacción con el receptor de Fc. La región constante de una molécula de inmunoglobulina generalmente tiene una secuencia de aminoácidos más conservada con respecto a un dominio variable de inmunoglobulina. En determinados aspectos, un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este comprende una región constante o parte de esta que sea

suficiente para la citotoxicidad medida por células dependiente del anticuerpo (ADCC).

[000105] Tal como se utiliza en la presente en referencia a un anticuerpo, "cadena pesada" puede hacer referencia a cualquier tipo distintivo, por ejemplo, alfa (α), delta (δ), épsilon (ϵ), gamma (γ) y mu (μ), basándose en la secuencia de aminoácidos del dominio constante, lo que genera las clases IgA, IgD, IgE, IgG e IgM de anticuerpos, respectivamente, incluso las subclases de IgG₁, IgG₂, IgG₃ e IgG₄. Las secuencias de aminoácidos de cadena pesada son conocidas en la técnica. En modalidades específicas, la cadena pesada es una cadena pesada humana.

[000106] Como se usa en la presente, la expresión "cadena ligera", cuando se usa con referencia a un anticuerpo, puede referirse a cualquier tipo distinto, por ejemplo, kappa (κ) o lambda (λ), basándose en la secuencia de aminoácidos de los dominios constantes. Las secuencias de aminoácidos de cadena ligera son conocidas en la técnica. En modalidades específicas, la cadena ligera es una cadena ligera humana.

[000107] La expresión anticuerpos "quiméricos" o fragmentos de unión al antígeno de estos se refiere a anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno de estos donde la secuencia de aminoácidos deriva de dos o más especies. Típicamente, la región variable tanto de la cadena ligera como pesada corresponde a la región variable de anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno de estos derivados de una especie de mamíferos (por ejemplo, ratón, rata, conejo, etc.) con la especificidad, afinidad y capacidad deseadas, mientras que las regiones constantes son homólogas a las secuencias en anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno de estos derivados de otras (generalmente seres humanos) para evitar provocar una respuesta inmunitaria en dicha especie.

[000108] La expresión anticuerpo "humanizado" o fragmento de unión al antígeno de este se refiere a formas de anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno de estos no humanos (por ejemplo, murinos) que son cadenas de inmunoglobulina específicas, inmunoglobulinas quiméricas o fragmentos de estas que contienen secuencias no humanas mínimas (por ejemplo, murinas). Típicamente, los anticuerpos humanizados o fragmentos de unión al antígeno de estos son inmunoglobulinas humanas en las que se reemplazan residuos de la región determinante de complementariedad (CDR) con residuos de la CDR de una especie no humana (por ejemplo, ratón, rata, conejo, hámster) que tienen la capacidad ("con injerto de CDR"), afinidad y especificidad deseadas (Jones et ál., Nature 321:522-525, 1986; Riechmann et ál., Nature 332:323-327, 1988; Verhoeyen et ál., Science 239:1534-1536, 1988). En algunos casos, los residuos de la región marco (FR) de Fv de una inmunoglobulina humana se reemplazan con los residuos correspondientes en un

anticuerpo o fragmento de una especie no humana que tenga la especificidad, afinidad y/o capacidad deseadas. El anticuerpo humanizado o fragmento de unión al antígeno de este puede modificarse adicionalmente con la sustitución de residuos adicionales, ya sea en la región marco de Fv y/o dentro de los residuos no humanos reemplazados para perfeccionar y optimizar la especificidad, afinidad y/o capacidad del anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este. En general, el anticuerpo humanizado o fragmento de unión al antígeno de este comprenderá sustancialmente todos de al menos uno, y típicamente dos o tres, dominios variables que contienen todas, o sustancialmente todas, las regiones CDR que corresponden a la inmunoglobulina no humana mientras que todas, o sustancialmente todas, las regiones FR son de una secuencia de consenso de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado o fragmento de unión al antígeno de este también puede comprender al menos una parte de una región o dominio constante (Fc) de inmunoglobulina, típicamente de una inmunoglobulina humana. Los ejemplos de métodos usados para generar anticuerpos humanizados se describen en la patente estadounidense 5,225,539; Roguska et ál., Proc. Natl. Acad. Sci., EUA, 91(3):969-973 (1994), y Roguska et ál., Protein Eng. 9(10):895-904 (1996). En algunas modalidades, un “anticuerpo humanizado” es un anticuerpo revestido.

[000109] La expresión anticuerpo “humano” o fragmento de unión al antígeno de este se refiere a un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este que tiene una secuencia de aminoácidos derivada de un locus génico de inmunoglobulina humana, donde dicho anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este está elaborado mediante el uso de cualquier procedimiento conocido en la técnica. Esta de unión al antígeno de un anticuerpo humano o fragmento de unión al antígeno de este incluye anticuerpos intactos o de longitud completa y fragmentos de estos.

[000110] Un anticuerpo “afucosilado” o fragmento de unión al antígeno de este o un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno que “carece de fucosa” se refiere a un anticuerpo isotipo de IgG1 o IgG3 o fragmento de unión al antígeno de este que carece de fucosa en su glicosilación de región constante. La glicosilación de IgG1 o IgG3 humanas ocurre en Asn297 como glicosilación de complejo de oligosacárido biantenarico fucosilado núcleo terminado con hasta 2 residuos Gal. En algunas modalidades, un anticuerpo afucosilado carece de fucosa en Asn297. Estas estructuras se designan como G0, G1 (a 1,6 o a 1,3) o residuos de glicano G2, en función de la cantidad de residuos Gal en el extremo. Véase, por ejemplo, Raju, T. S., BioProcess Int. 1: 44-53 (2003)). La glicosilación de tipo CHO del anticuerpo Fc se describe, por ejemplo, en Routier, F. FL, Glycoconjugate J. 14: 201-207 (1997)).

[000111] Los métodos para medir la fucosa incluyen cualquier método conocido en la técnica. A los

finis de la presente, la fucosa se detecta mediante el método descrito en el Ejemplo 1 de WO2015/017600, que se incorpora a la presente mediante esta referencia en su totalidad. Brevemente, se realiza el análisis de glicano al liberar glicanos del análisis (por ejemplo, liberación enzimática), marcar los glicanos con ácido antranílico (2-AA) y después purificar los glicanos marcados. Se utiliza HPLC de fase normal con detección fluorescente para separar los glicanos y medir la cantidad relativa de cada glicano en el anticuerpo. Los glicanos pueden identificarse de forma positiva como que carecen o incluyen fucosa mediante espectrometría de masas. En algunas modalidades, la fucosa es indetectable en una composición que comprende una pluralidad de anticuerpos afucosilados o fragmentos de unión al antígeno de estos. En algunas modalidades, un anticuerpo afucosilado o fragmento de unión al antígeno de este tiene actividad de ADCC mejorada, que puede medirse mediante el ensayo en el Ejemplo 12 de la presente. En algunas modalidades, un anticuerpo afucosilado o fragmento de unión al antígeno de este tiene afinidad mejorada por Fc gamma RIIIA. En algunas modalidades, un anticuerpo afucosilado o fragmento de unión al antígeno de este tiene afinidad mejorada por Fc gamma RIIIA(V158). En algunas modalidades, un anticuerpo afucosilado o fragmento de unión al antígeno de este tiene afinidad mejorada por Fc gamma RIIIA(F158). La afinidad por Fc gamma RIIIA o sus alelos puede medirse mediante el ensayo proporcionado en el Ejemplo 10 de la presente.

[000112] En general, “afinidad de unión” se refiere a la resistencia de la suma total de las interacciones no covalentes entre un único sitio de unión de una molécula (por ejemplo, un anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno de este) y su compañero de unión (por ejemplo, un antígeno). A menos que se indique lo contrario, tal como se usa en la presente, “afinidad de unión” se refiere a afinidad de unión intrínseca que refleja una interacción 1:1 entre los miembros de un par de unión (por ejemplo, anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este y antígeno). La afinidad de una molécula X con su compañero Y puede estar representada generalmente por la constante de disociación (K_D). La afinidad se puede medir y/o expresar de una cantidad de formas conocidas en la técnica, incluso, de modo no taxativo, constante de disociación de equilibrio (K_D), y constante de asociación de equilibrio (K_A). La K_D se calcula como el cociente de k_{off}/k_{on} , mientras que K_A se calcula a partir del cociente k_{on}/k_{off} . La k_{on} se refiere a la constante de tasa de asociación de, por ejemplo, un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este a un antígeno, y la k_{off} se refiere a la disociación de, por ejemplo, un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este de un antígeno. La k_{on} y k_{off} se pueden determinar mediante técnicas conocidas por un experto en la técnica, tales como BIAcore® o KinExA.

[000113] Tal como se usa en la presente, un “epítopo” es un término de la técnica y se refiere a una

región localizada de un antígeno al cual un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este puede unirse de forma específica. Un epítipo puede ser, por ejemplo, aminoácidos contiguos de un polipéptido (epítipo lineal o contiguo) o un epítipo, por ejemplo, puede unirse a partir de dos o más regiones no contiguas de un polipéptido o polipéptidos (epítipo conformacional, no lineal, discontinuo o no contiguo). En determinadas modalidades, es posible determinar el epítipo al que se une un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este, mediante, por ejemplo, espectroscopía por RMN, ensayos de cristalografía de difracción de rayos X, ensayos ELISA, intercambio de hidrógeno/deuterio acoplado con espectrometría de masa (por ejemplo, espectrometría de masa y electroaspersión de cromatografía líquida), ensayos de barrido de oligopéptidos basado en matriz y/o correspondencia de mutagénesis (por ejemplo, mapeo de mutagénesis dirigida al sitio). Para cristalografía de rayos X, se puede lograr la cristalización mediante el uso de cualquiera de los métodos conocidos en la técnica (por ejemplo, Giegé R et ál., (1994) *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 50(Pt 4): 339-350; McPherson A (1990) *Eur J Biochem* 189: 1-23; Chayen NE (1997) *Structure* 5: 1269-1274; McPherson A (1976) *J Biol Chem* 251: 6300-6303). Se pueden estudiar cristales de anticuerpo/fragmento de unión al antígeno de este:antígeno mediante el uso de técnicas de difracción de rayos X conocidas y se pueden refinar usando software informático tal como X-PLOR (Yale University, 1992, distribuido por Molecular Simulations, Inc.; véase, por ejemplo, *Meth Enzymol* (1985) tomos 114 y 115, ed Wyckoff HW et ál.; Estados Unidos 2004/0014194), y BUSTER (Bricogne G (1993) *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 49(Pt 1): 37-60; Bricogne G (1997) *Meth Enzymol* 276A: 361-423, ed Carter CW; Roversi P et ál., (2000) *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 56(Pt 10): 1316-1323). Los estudios de mapeo de mutagénesis se pueden lograr mediante el uso de cualquier método conocido por un experto en la técnica. Véase, por ejemplo, Champe M et ál., (1995) *J Biol Chem* 270: 1388-1394 y Cunningham BC & Wells JA (1989) *Science* 244: 1081-1085, en donde encontrará una descripción de técnicas de mutagénesis que incluyen técnicas de mutagénesis de barrido de alanina.

[000114] Un anticuerpo de B7-H4 que “se une al mismo epítipo” que un anticuerpo de B7-H4 de referencia se refiere a un anticuerpo que se une a los mismos residuos de aminoácidos de B7-H4 que el anticuerpo de B7-H4 de referencia. La capacidad del anticuerpo de B7-H4 de unirse al mismo epítipo que un anticuerpo de B7-H4 de referencia se determina mediante un ensayo de intercambio de hidrógeno/deuterio (véase Coales et ál. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2009; 23: 639-647).

[000115] Tal como se usan en la presente, las expresiones “se une de forma inmuno-específica”, “reconoce de forma inmuno-específica”, “se une específicamente” y “reconoce específicamente” son expresiones análogas en el contexto de anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno de estos.

Estas expresiones indican que el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este se une a un epítipo por medio de su dominio de unión al antígeno y que la unión implica cierta complementariedad entre el dominio de unión al antígeno y el epítipo. Por consiguiente, un anticuerpo que “se une específicamente” a B7-H4 humana (SEQ ID NO:1) también puede unirse a B7-H4 de otras especies (por ejemplo, B7-H4 de mono cynomolgus, ratón y/o rata) y/o proteínas B7-H4 producidas a partir de otros alelos humanos, pero la extensión de la unión a una proteína no B7-H4 no relacionada (por ejemplo, otros miembros de la familia de proteínas B7, tal como PD-L1) es menor que 10 % de la unión del anticuerpo a B7-H4 según se mide, por ejemplo, mediante un radioinmunoensayo (RIA).

5

10

[000116] En una modalidad específica, se proporciona en la presente un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este que se une a B7-H4 humana, de mono cynomolgus, ratón y rata.

15

[000117] Se dice que un anticuerpo inhibe de manera competitiva la unión de un anticuerpo de referencia a un epítipo dado si se une preferentemente a dicho epítipo o un epítipo superpuesto al punto de bloquear, en cierto grado, la unión del anticuerpo de referencia al epítipo. La inhibición competitiva puede determinarse mediante cualquier método conocido en la técnica, por ejemplo, ensayos ELISA de competición. Se puede decir que un anticuerpo inhibe de forma competitiva la unión del anticuerpo de referencia a un epítipo dado en al menos un 90 %, al menos un 80 %, al menos un 70 %, al menos un 60 % o al menos un 50 %.

20

25

[000118] Un polipéptido, anticuerpo, polinucleótido, vector, célula o composición que está “aislado” es un polipéptido, anticuerpo, polinucleótido, vector, célula o composición que se encuentra en una forma que no se encuentra en la naturaleza. Los polipéptidos, anticuerpos, polinucleótidos, vectores, células o composiciones aislados incluyen aquellos que fueron purificados a un grado que ya no se encuentren en una forma en la que se encuentran en la naturaleza. En algunas modalidades, un anticuerpo, polinucleótido, vector, célula o composición que está aislada es sustancialmente pura. Tal como se usa en la presente, “sustancialmente puro” se refiere a material que es al menos 50% puro (es decir, libre de contaminantes), al menos 90% puro, al menos 95% puro, al menos 98% o al menos 99% puro.

30

[000119] Los términos “polipéptido”, “péptido” y “proteína” se utilizan de manera intercambiable en la presente y se refieren a polímeros de aminoácidos de cualquier longitud. El polímero puede ser lineal o ramificado, puede comprender aminoácidos modificados y puede ser interrumpido por no aminoácidos. Los términos también comprenden un polímero de aminoácidos que ha sido modificado

naturalmente o mediante intervención; por ejemplo, formación de enlace disulfuro, glicosilación, lipidación, acetilación, fosforilación o cualquier otra manipulación o modificación, tal como conjugación con un componente de marcado. También se incluyen en la definición, por ejemplo, polipéptidos que contienen uno o más análogos de un aminoácido (incluyendo, por ejemplo, aminoácidos no naturales, etc.), así como otras modificaciones conocidas en la técnica. Se entiende que debido a que los polipéptidos de la presente invención se basan en anticuerpos, en determinadas modalidades, los polipéptidos pueden ocurrir como cadenas simples o cadenas asociadas.

[000120] “Porcentaje de identidad” se refiere a la extensión de identidad entre dos secuencias (por ejemplo, secuencias de aminoácidos o secuencias de ácido nucleico). El porcentaje de identidad se puede determinar mediante la alineación de dos secuencias y la introducción de huecos para maximizar la identidad entre secuencias. Las alineaciones se pueden generar mediante el uso de programas conocidos en la técnica. A los fines de la presente, la alineación de las secuencias de nucleótidos puede realizarse con el programa blastn con los parámetros por defecto y la alineación de secuencias de aminoácidos se pueden realizar mediante el programa blastp con los parámetros por defecto (Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI, por sus siglas en inglés) en la web, ncbi.nlm.nih.gov).

[000121] Tal como se usa en la presente, la expresión “célula hospedadora” puede ser cualquier tipo de célula, por ejemplo, una célula primaria, una célula en un cultivo o una célula de una línea celular. En modalidades específicas, la expresión “célula hospedadora” se refiere a una célula transfectada con una molécula de ácido nucleico y la progenie o progenie potencial de dicha célula. La progenie de dicha célula puede no ser idéntica a la célula original transfectada con la molécula de ácido nucleico, por ejemplo, debido a las mutaciones o influencias medioambientales que pueden ocurrir en las generaciones posteriores o integración de la molécula de ácido nucleico en el genoma de la célula hospedadora.

[000122] La expresión “formulación farmacéutica” hace referencia a una preparación en forma tal que permite que la actividad biológica del ingrediente activo sea eficaz y que no contiene ningún componente adicional inaceptablemente tóxico para un sujeto al cual se administraría la formulación. La formulación puede ser estéril.

[000123] Los términos “administrar”, “administrado”, “administración” y similares, tal como se usan en la presente, se refieren a métodos que pueden utilizarse para permitir el suministro de un fármaco,

por ejemplo, un anticuerpo de B7-H4 o fragmento de unión al antígeno de este al sitio deseado de acción biológica (por ejemplo, administración intravenosa). Las técnicas de administración que se pueden emplear con los agentes y métodos descritos en la presente se encuentran, por ejemplo, en Goodman y Gilman, *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, edición actual, Pergamon; y Remington's, *Pharmaceutical Sciences*, edición actual, Mack Publishing Co., Easton, Pa.

[000124] La administración "en combinación con" uno o más agentes terapéuticos adicionales incluye la administración simultánea (concurrente) o consecutiva en cualquier orden.

[000125] La terapia combinada puede proporcionar "sinergia", es decir, el efecto producido al utilizar los agentes activos en forma conjunta es mayor que la suma de los efectos resultantes del uso de los agentes activos por separado. Se puede lograr un efecto sinérgico cuando los agentes activos se: (1) formulan conjuntamente y se administran o suministran de forma simultánea en una formulación de dosificación unitaria combinada, (2) se administran de manera serial, alternada o en paralelo como formulaciones separadas, o (3) mediante algún otro régimen. Cuando se administra en terapia alternada, se puede obtener un efecto sinérgico cuando los agentes activos se administran o suministran secuencialmente, por ejemplo, por diferentes inyecciones en jeringas separadas. Una "combinación sinérgica" produce un efecto que es mayor que la suma de los efectos de la combinación de los agentes activos de forma individual.

[000126] La terapia combinada puede proporcionar un efecto "aditivo", es decir, el efecto producido al utilizar los agentes activos en forma conjunta es igual que la suma de los efectos resultantes del uso de los agentes activos por separado.

[000127] Tal como se usan en la presente, los términos "sujeto" y "paciente" se usan de forma indistinta. El sujeto puede ser un animal. En algunas modalidades, el sujeto es un mamífero, tal como un animal no humano (por ejemplo, una vaca, cerdo, caballo, gato, perro, rata, ratón, mono u otro primate, etc.). En algunas modalidades, el sujeto es un mono cynomolgus. En algunas modalidades, el sujeto es un ser humano.

[000128] La expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad de un fármaco, por ejemplo, un anticuerpo anti-B7-H4 o fragmento de unión al antígeno de este eficaz para tratar una enfermedad o un trastorno en un sujeto. En el caso del cáncer, la cantidad terapéuticamente eficaz del fármaco puede reducir la cantidad de células cancerosas; reducir el tamaño o carga tumoral; inhibir (es decir, enlentecer en cierta medida y, en una modalidad determinada, detener) la infiltración de células cancerosas en órganos periféricos; inhibir (es decir, enlentecer en cierta medida y, en una

modalidad determinada, detener) la metástasis tumoral; inhibir en cierta medida el crecimiento tumoral; aliviar en cierta medida uno o más de los síntomas asociados con el cáncer; y/o producir una respuesta favorable tal como mayor supervivencia sin evolución (PFS, por sus siglas en inglés), supervivencia sin enfermedad (DFS, por sus siglas en inglés) o supervivencia general (OS, por sus siglas en inglés), respuesta completa (CR, por sus siglas en inglés), respuesta parcial (PR, por sus siglas en inglés) o, en algunos casos, enfermedad estable (SD, por sus siglas en inglés), una disminución de enfermedad progresiva (PD), por sus siglas en inglés, un menor tiempo para evolución (TTP, por sus siglas en inglés) o cualquier combinación de estos. En la medida en que el fármaco pueda prevenir el crecimiento y/o destruir las células cancerosas existentes, éste puede ser citoestático y/o citotóxico.

[000129] Términos tales como “tratar” o “tratamiento” o “aliviar” se refieren a medidas terapéuticas que curan, enlentecen, reducen los síntomas de, y/o detienen la evolución de una afección o trastorno patológico diagnosticado. Por lo tanto, los que necesitan tratamiento incluyen los que ya fueron diagnosticados con el trastorno o se sospecha que lo padezcan. En determinadas modalidades, un sujeto se “trata” exitosamente contra el cáncer de acuerdo con métodos de la presente invención si el paciente muestra uno o más de los siguientes: una reducción en la cantidad o ausencia total de células cancerosas; una reducción en el tamaño tumoral; inhibición o ausencia de infiltración de células cancerosas en órganos periféricos que incluyen, por ejemplo, propagación del cáncer en tejido blando y huesos; inhibición o ausencia de metástasis tumoral; inhibición o ausencia de crecimiento tumoral; alivio de uno o más síntomas asociados con el cáncer específico; menor morbilidad y mortalidad; mejora en la calidad de vida; reducción de la tumorigenicidad, frecuencia tumorigénica o capacidad tumorigénica de un tumor; reducción en la cantidad o frecuencia de células madre cancerosas en un tumor; diferenciación de células tumorigénicas de un estado no tumorigénico; aumento de la supervivencia sin evolución (PFS), supervivencia sin enfermedad (DFS) o supervivencia general (OS), respuesta completa (CR), respuesta parcial (PR), enfermedad estable (SD), una disminución de enfermedad progresiva (PD), un menor tiempo para evolución (TTP) o cualquier combinación de estos.

[000130] Los términos “cáncer” y “canceroso” se refieren o describen las afecciones fisiológicas en mamíferos donde una población de células se caracteriza por tener un crecimiento celular no regulado. Los ejemplos de cáncer incluyen, de modo no taxativo, cánceres ginecológicos (por ejemplo, cáncer de mama (incluso cáncer de mama triple negativo, carcinoma ductal), cáncer de ovario y cáncer de endometrio), cáncer de pulmón no microcítico, cáncer de páncreas, cáncer de tiroides, cáncer renal (por ejemplo, carcinoma de células renales) y cáncer de vejiga (por ejemplo,

carcinoma de células uroteliales). Un cáncer de pulmón no microcítico puede ser, por ejemplo, un adenocarcinoma. Los ejemplos adicionales de cáncer incluyen, por ejemplo, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de pulmón microcítico, cáncer gástrico, melanoma, colangiocarcinoma, glioblastoma o glioblastoma multiforme (GBM) y carcinoma de células de Merkel. En una modalidad, el cáncer de ovario es adenocarcinoma seroso. En una modalidad, el cáncer de mama es adenocarcinoma ductal. El cáncer puede ser un "cáncer que expresa B7-H4" o "un cáncer con expresión de B7-H4". Dichas expresiones se refieren a un cáncer que comprende células que expresan B7-H4. El cáncer puede ser un tumor primario o pueden ser cáncer avanzado o metastásico.

[000131] Un cáncer "refractario" es aquel que avanza incluso a pesar de que se administre un tratamiento antitumoral, tal como quimioterapia, al paciente con cáncer.

[000132] Un cáncer "recurrente" es aquel que ha vuelto a crecer, ya sea en el lugar inicial o en un lugar distante, después de una respuesta a la terapia inicial.

[000133] Un paciente "con recaída" es aquel que tiene signos o síntomas de cáncer tras la remisión. Opcionalmente, el paciente tuvo la recaída después de la terapia adyuvante o neoadyuvante.

[000134] "Actividad de bloqueo de punto de control de linfocitos T" se refiere al bloqueo o inhibición de una respuesta o actividad de punto de control de linfocitos T. La actividad de bloqueo de punto de control de linfocitos T puede medirse en un ensayo de células que presentan antígenos artificiales (aAPC, por sus siglas en inglés) basado en cambios en la producción de IFN γ . Los linfocitos T humanos se pueden enriquecer a partir de PBMC mediante el uso de un kit de enriquecimiento de linfocitos T (tal como un kit de enriquecimiento de linfocitos T humanos EasySep™ o un kit similar). Los linfocitos T enriquecidos se cultivan con perlas (por ejemplo, perlas anti-CD3/anti-CD28). Después de un período de tiempo, se eliminan magnéticamente las perlas y los linfocitos T se lavan e incuban. A continuación, los linfocitos T se lavan e incuban junto con células que presentan antígenos artificiales (aAPC) en presencia de la titulación de dosis de anticuerpo de B7-H4. Las aAPC se pueden tratar con mitomicina C y después se pueden lavar cuidadosamente antes de agregarlas al cocultivo de linfocitos T. Después del cocultivo de linfocitos T, aAPC y anticuerpos de B7-H4, se pueden centrifugar las placas y se pueden recoger los sobrenadantes y evaluarse para detectar la producción de IFN γ mediante ELISA. La producción de IFN γ se puede graficar en función de la concentración de anticuerpo, y se puede calcular la potencia de EC50 mediante el uso de ajuste de curva de regresión no lineal. Los resultados pueden medirse como EC50 +/- STD en nM. La actividad de bloqueo de punto de control de linfocitos T mediante anticuerpos B7-H4 se puede

demostrar mediante un aumento en la producción de IFN γ . La “actividad de bloqueo de punto de control de linfocitos T” también se puede medir en un ensayo mediante el uso de células que expresan B7-H4 de forma endógena. Los linfocitos T humanos primarios pueden enriquecerse a partir de PBMC donantes HLA-A2+ mediante el uso de un kit de aislamiento de linfocitos T (por ejemplo, kit de aislamiento de linfocitos Pan T humanos). Se pueden generar linfocitos T que expresan MART-I TCR mediante primero la activación de linfocitos Pan T enriquecidos con perlas (por ejemplo, Dynabeads anti-CD3/anti-CD28), IL-2 e IL-7 durante 48 horas. Se pueden entonces transducir linfocitos T activados con partículas lentivirales MART-I TCR en presencia de IL-2, IL-7 y polibreno. Después de la transducción, se pueden expandir los linfocitos Pan T MART-I TCR+ durante un período de tiempo en presencia de IL-2 e IL-7. Para generar líneas celulares objetivo que expresan HLA-A2, se pueden transducir líneas celulares que expresan B7-H4 endógena con partículas lentivirales HLA-A2 durante un período de tiempo (por ejemplo, 48 horas). Además, se puede inactivar B7-H4 de la línea celular HLA-A2+. Después se pueden cocultivar los linfocitos Pan T MART-I TCR+ en presencia de diversas líneas celulares objetivo a una proporción E:T 1:1, péptido MART-I y un anticuerpo de B7-H4 o un isotipo humano de control. Después de la coincubación, las placas se pueden centrifugar y los sobrenadantes se pueden recoger y evaluar para detectar la producción de IL-2. La producción de IL-2 se puede medir mediante un kit de inmunoensayo estándar (tal como en ensayo AlphaLISA o ensayo similar).

[000135] Tal como se usa en la presente descripción y reivindicaciones, las formas singulares “un”, “una” y “el/la” incluyen las formas plurales a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

[000136] Se entiende que cuando se describan las modalidades en la presente con la expresión “comprende”, también se proporcionan las modalidades análogas descritas en términos de “consiste en” y/o “consiste esencialmente en”. En la presente descripción, “comprende”, “comprenden”, “contiene”, “tiene” y similares pueden tener los significados que se les asignan en la legislación de patentes de Estados Unidos y pueden significar “incluye”, “incluyen” y similares; asimismo, “consiste esencialmente en” o “consiste esencialmente” tienen el significado que les asigna la legislación de patentes de Estados Unidos y estas expresiones tienen un sentido amplio, lo que permite la presencia de más elementos de los que se mencionan, siempre que las características básicas o novedosas de lo que se menciona no cambien por la presencia de más elementos de los que se mencionan, pero esto excluye las modalidades de la técnica previa.

[000137] A menos que se indique específicamente o sea evidente a partir del contexto, tal como se usa en la presente, se entiende que el término “o” es inclusivo. El término “y/o” tal como se usa en la

presente en una frase como “A y/o B” se pretende que incluya tanto “A y B”, “A o B”, “A” y “B”. De manera similar, el término “y/o” tal como se usa en una frase como “A, B y/o C” se pretende que abarque cada una de las siguientes modalidades. A, B, y C; A, B, o C; A o C; A o B; B o C; A y C; A y B; B y C; A (solo); B (solo); y C (solo).

- 5 [000138] Tal como se usan en la presente, las expresiones “alrededor de” y “aproximadamente”, cuando se usan para modificar un valor numérico o intervalo numérico, indican que las desviaciones de 5 % a 10 % por encima y 5 % a 10 % por debajo del valor o intervalo permanecen dentro del significado deseado del valor o intervalo mencionado.

- 10 [000139] Cualquier composición o método que se proporciona en la presente puede combinarse con cualquier otra composición o método que se proporciona en la presente.

1.2 Anticuerpos:

- 15 [000140] En un aspecto específico, se proporcionan en la presente anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos monoclonales, tales como anticuerpos quiméricos, humanizados o humanos) y fragmentos de unión al antígeno de estos que se unen específicamente a B7-H4 (por ejemplo, B7-H4 humana). Las secuencias de aminoácidos para B7-H4 humana, de mono cynomolgus, murina y de rata son conocidas en la técnica y también se proporcionan en la presente representadas por las SEQ ID NO:1-4, respectivamente.

B7-H4 humana:

- 20 MASLGQILFWSIISIIILAGAIALIIGFGISGRHSITVTTVASAGNIGEDGILSCTFEPDIKLSDIVIQWLKEG
VLGLVHEFKEGKDELSEQDEMFRGRTAVFADQVIVGNASRLKNVQLTDAGTYKCYIITSKGKGNANL
EYKTGAFSMPEVNVVDYNASSETLRCEAPRWFPQPTVVWASQVDQGANFSEVSNTSFELNSENVTM
KVVSVLYNVTINNTYSCMIENDIAKATGDIKVTSEIKRRSHLQLLNSKASLCVSSFFAISWALLPLSPYL
MLK (SEQ ID NO:1)

- 25 B7-H4 de mono cynomolgus:

MASLGQILFWSIISIIIFILAGAIALIIGFGISGRHSITVTTVASAGNIGEDGILSCTFEPDIKLSDIVIQWLKEG
VIGLVHEFKEGKDELSEQDEMFRGRTAVFADQVIVGNASRLKNVQLTDAGTYKCYIITSKGKGNANL
EYKTGAFSMPEVNVVDYNASSETLRCEAPRWFPQPTVVWASQVDQGANFSEVSNTSFELNSENVTM

KVVSVLYNVTINNTYSCMIENDIAKATGDIKVTSEIKRRSHLQLLNSKASLCVSSFLAISWALLPLAPYL
MLK (SEQ ID NO:2)

B7-H4 murina

5 MASLGQIIFWSIINIIILAGAIALIIGFGISGKHFITVTTFTSAGNIGEDGTLSCTFEPDIKLNIGIVIQLKEGI
KGLVHEFKEGKDDLSQQHEMFRGRTAVFADQVVVGNASRLKKNVQLTDAGTYTCYIRTSKGKGNAN
LEYKTGAFSMPEINVDYNASSESLRCEAPRWFPQPTVAWASQVDQGANFSEVSNTSFELNSENVTM
KVVSVLYNVTINNTYSCMIENDIAKATGDIKVTSEVKRRSQLLLNSGPSPCVFSSAFVAGWALLSLS
CCLMLR (SEQ ID NO:3)

B7-H4 de rata

10 MASLGQIIFWSIINVIILAGAIVLIIGFGISGKHFITVTTFTSAGNIGEDGTLSCTFEPDIKLNIGIVIQLKEG
IKGLVHEFKEGKDDLSQQHEMFRGRTAVFADQVVVGNASRLKKNVQLTDAGTYTCYIHTSKGKGNAN
LEYKTGAFSMPEINVDYNASSESLRCEAPRWFPQPTVAWASQVDQGANFSEVSNTSFELNSENVTM
KVVSVLYNVTINNTYSCMIENDIAKATGDIKVTSEVKRRSQLELLNSGPSPCVSSVSAAGWALLSLSC
CLMLR (SEQ ID NO:4)

15 [000141] En determinadas modalidades, un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este
descrito en la presente se une a B7-H4 humana. En determinadas modalidades, un anticuerpo o
fragmento de unión al antígeno de este se une al B7-H4 humana y de mono cynomolgus. En
determinadas modalidades, un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este se une al B7-H4
humana, murina y de rata. En determinadas modalidades, un anticuerpo o fragmento de unión al
20 antígeno de este se une al B7-H4 humana, de mono cynomolgus, murina y de rata.

[000142] B7-H4 contiene un ectodominio de IgC (aminoácidos 153-241 de la SEQ ID NO:1) y un
dominio de IgV (aminoácidos 35-146 de la SEQ ID NO:1).

[000143] En determinadas modalidades, un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este
descrito en la presente se une al dominio de IgV de B7-H4 humana. Por consiguiente, se
25 proporcionan en la presente anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno de estos que se unen a
un polipéptido que comprende los aminoácidos 35-146 de la SEQ ID NO:1.

[000144] En determinadas modalidades, un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este
descrito en la presente se une a B7-H4 humana y comprende las seis CDR de un anticuerpo
enumerado en las Tablas 1 y 2 (es decir, las tres CDR VH del anticuerpo enumerado en la Tabla 1 y

las tres CDR VL del mismo anticuerpo enumerado en la Tabla 2).

Tabla 1 Secuencias de aminoácidos de CDR VH¹

Anticuerpo	CDR1 VH (SEQ ID NO:)	CDR2 VH (SEQ ID NO:)	CDR3 VH (SEQ ID NO:)
15461	GSISSSSYWG (SEQ ID NO:5)	NIYYSGSTYYNPSLKS(SE Q ID NO:6)	AREGSYPNWFDP (SEQ ID NO:7)
20500	GSIKSGSHYWG (SEQ ID NO:15)	NIYYSGSTYYNPSLRS(SE Q ID NO:16)	AREGSYPNWFDP (SEQ ID NO:17)
20501	GSIKSGSHYWG (SEQ ID NO:25)	NIYYSGSTYYNPSLKS(SE Q ID NO:26)	AREGSYPNWLDP (SEQ ID NO:27)
20502	GSIKSGSYYWG(SEQ ID NO:458)	NIYYSGSTYYNPSLRS(SE Q ID NO:459)	AREGSYPNQFDP (SEQ ID NO:460)
20502.1	GSIKSGSYYWG (SEQ ID NO:35)	NIYYSGSTYYNPSLKS (SEQ ID NO:36)	AREGSYPNQFDP (SEQ ID NO:37)
22208	GSIKSGSHYWG (SEQ ID NO:45)	NIYYSGSTYYNPSLKS (SEQ ID NO:46)	AREGSYPNWFDP (SEQ ID NO:47)
15462	GSISSSSYWG (SEQ ID NO:55)	NIYYSGSTYYNPSLKS (SEQ ID NO:56)	AREGSYTTVLNV (SEQ ID NO:57)
22213	GSIGRGSYYWG (SEQ ID NO:65)	NIYYSGSTYYNPSLKS (SEQ ID NO:66)	AREGSYTTVLNV (SEQ ID NO:67)
15465	GSISSGGYYWS (SEQ ID NO:75)	NIYYSGSTYYNPSLKS (SEQ ID NO:76)	ARESSTISADFDL (SEQ ID NO:77)
20506	GSISHGGYYWS (SEQ ID NO:85)	NIYYSGSTYYNPSLKS (SEQ ID NO:86)	ARESSTISADFDL (SEQ ID NO:87)

15483	GSISSGGYYWS (SEQ ID NO:95)	NIYYSGSTYYNPSLKS (SEQ ID NO:96)	ARGLSTIDEAFDP (SEQ ID NO:97)
20513	GSISDGSYYWS (SEQ ID NO:105)	NIYYSGSTYYNPSLRS (SEQ ID NO:106)	ARGLSTIDEAFDP (SEQ ID NO:107)
22216	GSISDGSYYWS (SEQ ID NO:115)	NIYYSGSTYYNPSLRS (SEQ ID NO:116)	ARGLSTIDEAFDP (SEQ ID NO:117)
15489	GSISSYYWS (SEQ ID NO:125)	YIYSSGSTNYPNPSLKS (SEQ ID NO:126)	ARGSGQYAAPDYG MDV (SEQ ID
20516	GSIISSYYWG (SEQ ID NO:135)	YIYSSGSTSYNPSLKS (SEQ ID NO:136)	ARGSGLYAAPDYG LDV (SEQ ID
15472	FTFSSYAMS (SEQ ID NO:145)	TISGSGGSTYYADSVKG (SEQ ID NO:146)	ARGAGHYDLVGRY (SEQ ID NO:147)
15503	FTFSSYAMS (SEQ ID NO:155)	AISGSGGSTYYADSVKG (SEQ ID NO:156)	ARVGFRALNY (SEQ ID NO:157)
15495	GTFSSY AIS (SEQ ID NO:165)	GIIPIFGTASYAQKFQG (SEQ ID NO:166)	ARQQYDGRRYFGL (SEQ ID NO:167)
15478	GTFSSY AIS (SEQ ID NO:175)	GIIPIFGTANYAQKFQG (SEQ ID NO:176)	ARGGPWFDP (SEQ ID NO:177)
15441	FTFSSYAMS (SEQ ID NO:185)	AISGSGGSTSYADSVKG (SEQ ID NO:186)	AKPSLATMLAFDI (SEQ ID NO:187)
20496	GSISSSVYYWS (SEQ ID NO:195)	SILVSGSTYYNPSLKS (SEQ ID NO:196)	ARAVSFLDV (SEQ ID NO:197)

¹Las CDR VH en la Tabla 1 se determinaron de acuerdo con Kabat.

Tabla 2 Secuencias de aminoácidos de CDR VL²

Anticuerpo	CDR1 VL (SEQ ID NO:)	CDR2 VL (SEQ ID NO:)	CDR3 VL (SEQ ID NO:)
15461	RASQSVSSNLA (SEQ ID NO:8)	GASTRAT (SEQ ID NO:9)	QQYHSFPFT (SEQ ID NO:10)
20500	RASQSVSSNLA (SEQ ID NO:18)	GASTRAT (SEQ ID NO:19)	QQYHSFPFT (SEQ ID NO:20)
20501	RASQSVSSNLA (SEQ ID NO:28)	GASTRAT (SEQ ID NO:29)	QQYHSFPFT (SEQ ID NO:30)
20502	RASQSVSSNLA (SEQ ID NO:461)	GASTRAT (SEQ ID NO:462)	QQYHSFPFT (SEQ ID NO:463)
20502.1	RASQSVSSNLA (SEQ ID NO:38)	GASTRAT (SEQ ID NO:39)	QQYHSFPFT (SEQ ID NO:40)
22208	RASQSVSTNLA (SEQ ID NO:48)	DASARVT (SEQ ID NO:49)	QQYHSFPFT (SEQ ID NO:50)
15462	RASQSVSSSYLA (SEQ ID NO:58)	GASSRAT (SEQ ID NO:59)	QQAASYPLT (SEQ ID NO:60)
22213	RASQSVASSHLA (SEQ ID NO:68)	DAVSRAT (SEQ ID NO:69)	QQAASYPLT (SEQ ID NO:70)
15465	RASQGISRWLA (SEQ ID NO:78)	AASSLQS (SEQ ID NO:79)	QQAHTFPYT (SEQ ID NO:80)
20506	RASQGISRWLA (SEQ ID NO:88)	AASSLQS (SEQ ID NO:89)	QQAHTFPYT (SEQ ID NO:90)
15483	RASQSISSWLA (SEQ ID NO:98)	KASSLES (SEQ ID NO:99)	QQDNSYPYT (SEQ ID NO:100)
20513	RASQSISSWLA (SEQ ID NO:108)	KASSLES (SEQ ID NO:109)	QQDNSYPYT (SEQ ID NO:110)

22216	RASKSISSWLA (SEQ ID NO:118)	EASSLHS (SEQ ID NO:119)	QQDNSYPYT (SEQ ID NO:120)
15489	RASQSISSWLA (SEQ ID NO:128)	KASSLES (SEQ ID NO:129)	QQDNSFPFT (SEQ ID NO:130)
20516	RASQSISSWLA (SEQ ID NO:138)	KASSLES (SEQ ID NO:139)	QQDNSFPFT (SEQ ID NO:140)
15472	RASQSISSYLN (SEQ ID NO:148)	AASSLQS (SEQ ID NO:149)	QQLYSLPPT (SEQ ID NO:150)
15503	RASQDISSWLA (SEQ ID NO:158)	AASSLQS (SEQ ID NO:159)	QQATSYPPWT (SEQ ID NO:160)
15495	RASQSVSSNLA (SEQ ID NO:168)	SASTRAT (SEQ ID NO:169)	QQVNVWPPT (SEQ ID NO:170)
15478	RASQSISSWLA (SEQ ID NO:178)	KASSLES (SEQ ID NO:179)	QQYNSYPFT (SEQ ID NO:180)
15441	RASQSISSWLA (SEQ ID NO:188)	DASSLES (SEQ ID NO:189)	QQSKSYPR (SEQ ID NO:190)
20496	RASQSISSYLN (SEQ ID NO: 198)	GASSLQS (SEQ ID NO: 199)	QQSYDPPWT (SEQ ID NO: 200)

[000145] ²Las CDR VL en la Tabla 2 se determinaron de acuerdo con Kabat.

[000146] En determinadas modalidades, un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este descrito en la presente se une a B7-H4 humana y comprende la VH de un anticuerpo enumerado en la Tabla 3.

5 Tabla 3: Secuencias de aminoácidos de cadena pesada variable (VH)

Anticuerpo	Secuencia de aminoácidos VH (SEQ ID NO)
15461	QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSSSYYWGWIRQPPG

	KGLEWIGNIYYSGSTYYNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLSSVTAA DTAVYYCAREGSYPNWFDPWGQGTTLTVSS (SEQ ID NO: 11)
20500	QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSIKSGSHYWGWRQPPG KGLEWIGNIYYSGSTYYNPSLRSRTISVDTSKNQFSLKLSSVTAA DTAVYYCAREGSYPNWFDPWGQGTTLTVSS (SEQ ID NO:21)
20501	QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSIKSGSHYWGWRQPPG KGLEWIGNIYYSGSTYYNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLSSVTAA DTAVYYCAREGSYPNWLDPWGQGTTLTVSS (SEQ ID NO:31)
20502	QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSIKSGSYYWGWRQPPG KGLEWIGNIYYSGSTYYNPSLRSRTISVDTSKNQFSLKLSSVTAA DTAVYYCAREGSYPNQFDPWGQGTTLTVSS (SEQ ID NO:464)
20502.1	QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSIKSGSYYWGWRQPPG KGLEWIGNIYYSGSTYYNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLSSVTAA DTAVYYCAREGSYPNQFDPWGQGILTVSS (SEQ ID NO:41)
22208	QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSIKSGSHYWGWRQPPG KGLEWIGNIYYSGSTYYNPSLKSRTMSVDTSKNQFSLKLSSVTA ADTAVYYCAREGSYPNWFDPWGQGTTLTVSS (SEQ ID NO:51)
15462	QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSSSYYWGWRQPPG KGLEWIGNIYYSGSTYYNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLSSVTAA DTAVYYCAREGSYTTVLNVWGQGTMTVSS (SEQ ID NO:61)
22213	QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSIGRGSYYWGWRQPPG KGLEWIGNIYYSGSTYYNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLSSVTAA DTAVYYCAREGSYTTVLNVWGQGTMTVSS (SEQ ID NO:71)
15465	QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGGSISSGGYYWSWIRQHPG KGLEWIGNIYYSGSTYYNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLSSVTAA DTAVYYCARESSTISADFDLWGRGTLTVSS (SEQ ID NO:81)
20506	QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTASGGSIHGGYYWSWIRQHPG

	KGLEWIGNIYYSGSTYYNPSLKSRTVMSVDTSKNQFSLKLSSVTA ADTAVYYCARESSTISADFDLWGRGTLVTVSS (SEQ ID NO:91)
15483	QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGGSISSGGYYWSWIRQHPG KGLEWIGNIYYSGSTYYNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLSSVTAA DTAVYYCARGLSTIDEAFDPWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:101)
20513	QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSI SDGSYYWSWIRQHPG KGLEWIGNIYYSGSTYYNPSLRSRTVMSVDTSKNQFSLKLSSVTA ADTAVYYCARGLSTIDEAFDPWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:111)
22216	QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGGSI SDGSYYWSWIRQHPG KGLEWIGNIYYSGSTYYNPSLRSRTVMSVDTSKNQFSLKLSSVTA ADTAVYYCARGLSTIDEAFDPWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:121)
15489	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSYYWSWIRQPPGKG LEWIGIYSSGSTNYNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADT AVYYCARGSGQYAAPDYGMDVWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO:131)
20516	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSIISYYWGWIRQPPGKGL EWIGIYSSGSTSYNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTA VYYCARGSGLYAAPDYGLDVWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO:141)
15472	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGK GLEWVSTISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRA EDTAVYYCARGAGHYDLVGRYWQGTLVTVSS (SEQ ID NO:151)
15503	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGK GLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRA EDTAVYYCARVGFRALNYWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO:161)
15495	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAISWVRQAPGQ GLEWMGGIIPFGTASYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSE DTAVYYCARQQYDGRRYFGLWGRGTLVTVSS (SEQ ID NO:171)

15478	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAISWVRQAPGQ GLEWMGGIIPFGTANYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSE DTAVYYCARGGPWFDPWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:181)
15441	EVQLLESGLLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGK GLEWVSAISGSGGSTSYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRA EDTAVYYCAKPSLATMLAFDIWGQGTMTVTVSS (SEQ ID NO:191)
20496	QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSSVYYWSWIRQPPG KGLEWIGSILVSGSTYYNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLSSVTAA DTAVYYCARAVSFLDVWGQGTMTVIVSS (SEQ ID NO:201)

[000147] En determinadas modalidades, un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este descrito en la presente se une a B7-H4 humana y comprende la VL de un anticuerpo enumerado en la Tabla 4.

5 **Tabla 4: Secuencias de aminoácidos de cadena ligera variable (VL)**

Anticuerpo	Secuencia de aminoácidos VL (SEQ ID NO)
15461	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSNLAWYQQKPGQ APRLLIYGASTRATGIPARFSGSGSGTEFTLTISLQSEDFAVYY CQQYHSFPFTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:12)
20500	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSNLAWYQQKPGQ APRLLIYGASTRATGIPARFSGSGSGTEFTLTISLQSEDFAVYY CQQYHSFPFTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:22)
20501	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSNLAWYQQKPGQ APRLLIYGASTRATGIPARFSGSGSGTEFTLTISLQSEDFAVYY CQQYHSFPFTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:32)
20502 20502.1	y EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSNLAWYQQKPGQ APRLLIYGASTRATGIPARFSGSGSGTEFTLTISLQSEDFAVYY

	CQQYHSFPFTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:42)
22208	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSTNLAWYQQKPGQ APRLLIYDASARVTGIPARFSGSGSGTEFTLTISLQSEDFAVYY CQQYHSFPFTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:52)
15462	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPG QAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAV YYCQQAASYPLTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:62)
22213	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVASSHLAWYQQKPG QAPRLLIYDAVSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAV YYCQQAASYPLTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:72)
15465	DIQMTQSPSSVSASVGDRVITICRASQGISRWLAWYQQKPGK APKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATY YCQQAHTFPYTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:82)
20506	DIQMTQSPSSVSASVGDRVITICRASQGISRWLAWYQQKPGK APKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATY YCQQAHTFPYTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:92)
15483	DIQMTQSPSTLSASVGDRVITICRASQSISSWLAWYQQKPGKA PKLLIYKASSLESGVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPDDEFATYY CQQDNSYPYTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:102)
20513	DIQMTQSPSTLSASVGDRVITICRASQSISSWLAWYQQKPGKA PKLLIYKASSLESGVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPDDEFATYY CQQDNSYPYTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:112)
22216	DIQMTQSPSTLSASVGDRVITICRASKSISSWLAWYQQKPGKA PKLLIYEASSLHSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPDDEFATYY CQQDNSYPYTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:122)
15489	DIQMTQSPSTLSASVGDRVITICRASQSISSWLAWYQQKPGKA PKLLIYKASSLESGVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPDDEFATYY CQQDNSFPFTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:132)

20516	DIQMTQSPSTLSASVGDRVITICRASQSISSWLAWYQQKPGKA PKLLIYKASSLESGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFATYY CQQDNSFPPTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:142)
15472	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASQSISSYLNWYQQKPGKA PKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYY CQQLYSLPPTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:152)
15503	DIQMTQSPSSVSASVGDRVITICRASQDISSWLAWYQQKPGKA PKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYY CQQATSYPPWTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:162)
15495	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSNLAWYQQKPGQ APRLLIYSASTRATGIPARFSGSGSGTEFTLTISSLQSEDFAVYY CQQVNVWPPTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:172)
15478	DIQMTQSPSTLSASVGDRVITICRASQSISSWLAWYQQKPGKA PKLLIYKASSLESGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFATYY CQQYNSYPPPTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:182)
15441	DIQMTQSPSTLSASVGDRVITICRASQSISSWLAWYQQKPGKA PKLLIYDASSLESGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFATYY CQQSKSYPRTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:192)
20496	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASQSISSYLNWYQQKPGKA PKLLIYGASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYY CQQSYDPPWTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:202)

[000148] En determinadas modalidades, un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este descrito en la presente se une a B7-H4 humana y comprende la VH y la VL de un anticuerpo enumerado en las Tablas 3 y 4 (es decir, la VH del anticuerpo enumerado en la Tabla 3 y la VL del mismo anticuerpo enumerado en la Tabla 4).

- 5 [000149] En determinadas modalidades, un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este descrito en la presente se une a B7-H4 humana y comprende las regiones marco de VH de un anticuerpo enumerado en la Tabla 5.

Tabla 5 Secuencias de aminoácidos de FR de VH⁴

Anticuerpo	FR1 VH (SEQ ID NO:)	FR2 VH (SEQ ID NO:)	FR3 VH (SEQ ID NO:)	FR4 VH (SEQ ID NO:)
15461	QLQLQESGPGLVK PSETLSLTCTVSG (SEQ ID NO:205)	WIRQPPGKGL EWIG (SEQ ID NO:206)	RVTISVDTSKN QFSLKLSSVTA ADTAVYYC (SEQ ID NO:207)	WGQGTLLV TVSS (SEQ ID NO:208)
20500	QLQLQESGPGLVK PSETLSLTCTVSG (SEQ ID NO:215)	WIRQPPGKGL EWIG (SEQ ID NO:216)	RVTISVDTSKN QFSLKLSSVTA ADTAVYYC (SEQ ID NO:217)	WGQGTLLV TVSS (SEQ ID NO:218)
20501	QLQLQESGPGLVK PSETLSLTCTVSG (SEQ ID NO:225)	WIRQPPGKGL EWIG (SEQ ID NO:226)	RVTISVDTSKN QFSLKLSSVTA ADTAVYYC (SEQ ID NO:227)	WGQGTLLV TVSS (SEQ ID NO:228)
20502	QLQLQESGPGLVK PSETLSLTCTVSG (SEQ ID NO:465)	WIRQPPGKGL EWIG (SEQ ID NO:466)	RVTISVDTSKN QFSLKLSSVTA ADTAVYYC (SEQ ID NO:467)	WGQGTLLV TVSS (SEQ ID NO:468)
20502.1	QLQLQESGPGLVK PSETLSLTCTVSG (SEQ ID NO:235)	WIRQPPGKGL EWIG (SEQ ID NO:236)	RVTISVDTSKN QFSLKLSSVTA ADTAVYYC (SEQ ID NO:237)	WGQGILV TVSS (SEQ ID NO:238)

22208	QLQLQESGPGLVK PSETLSLTCTVSG (SEQ ID NO:245)	WIRQPPGKGL EWIG (SEQ ID NO:246)	RVTMSVDTSK NQFSLKLSSVT AADTAVYYC (SEQ ID NO:247)	WGQGTLV TVSS (SEQ ID NO:248)
15462	QLQLQESGPGLVK PSETLSLTCTVSG (SEQ ID NO:255)	WIRQPPGKGL EWIG (SEQ ID NO:256)	RVTISVDTSKN QFSLKLSSVTA ADTAVYYC (SEQ ID NO:257)	WGQGTMOV TVSS (SEQ ID NO:258)
22213	QLQLQESGPGLVK PSETLSLTCTVSG (SEQ ID NO:265)	WIRQPPGKGL EWIG (SEQ ID NO:266)	RVTISVDTSKN QFSLKLSSVTA ADTAVYYC (SEQ ID NO:267)	WGQGTMOV TVSS (SEQ ID NO:268)
15465	QVQLQESGPGLVK PSQTLSLTCTVSG (SEQ ID NO:275)	WIRQHPGKGL EWIG (SEQ ID NO:276)	RVTISVDTSKN QFSLKLSSVTA ADTAVYYC (SEQ ID NO:277)	WGRGTLV TVSS (SEQ ID NO:278)
20506	QLQLQESGPGLVK PSETLSLTCTASG (SEQ ID NO:285)	WIRQHPGKGL EWIG (SEQ ID NO:286)	RVTMSVDTSK NQFSLKLSSVT AADTAVYYC (SEQ ID NO:287)	WGRGTLV TVSS (SEQ ID NO:288)
15483	QVQLQESGPGLVK PSQTLSLTCTVSG (SEQ ID NO:295)	WIRQHPGKGL EWIG (SEQ ID NO:296)	RVTISVDTSKN QFSLKLSSVTA ADTAVYYC (SEQ ID NO:297)	WGQGTLV TVSS (SEQ ID NO:298)

20513	QLQLQESGPGLVK PSETLSLTCTVSG (SEQ ID NO:305)	WIRQHPGKGL EWIG (SEQ ID NO:306)	RVTMSVDTSK NQFSLKLSSVT AADTAVYYC (SEQ ID NO:307)	WGQGTLV TVSS (SEQ ID NO:308)
22216	QVQLQESGPGLVK PSQTLSLTCTVSG (SEQ ID NO:315)	WIRQHPGKGL EWIG (SEQ ID NO:316)	RVTMSVDTSK NQFSLKLSSVT AADTAVYYC (SEQ ID NO:317)	WGQGTLV TVSS (SEQ ID NO:318)
15489	QVQLQESGPGLVK PSETLSLTCTVSG (SEQ ID NO:325)	WIRQPPGKGL EWIG (SEQ ID NO:326)	RVTISVDTSKN QFSLKLSSVTA ADTAVYYC (SEQ ID NO:327)	WGQGTTV TVSS (SEQ ID NO:328)
20516	QVQLQESGPGLVK PSETLSLTCTVSG (SEQ ID NO:335)	WIRQPPGKGL EWIG (SEQ ID NO:336)	RVTISVDTSKN QFSLKLSSVTA ADTAVYYC (SEQ ID NO:337)	WGQGTTV TVSS (SEQ ID NO:338)
15472	EVQLLES GGGLVQ PGGSLRLSCAASG (SEQ ID NO:345)	WVRQAPGKGL EWVS (SEQ ID NO:346)	RFTISRDN SKN TLYLQMNSLR AEDTAVYYC (SEQ ID NO:347)	WGQGT LV T VSS (SEQ ID NO:348)
15503	EVQLLES GGGLVQ PGGSLRLSCAASG (SEQ ID NO:355)	WVRQAPGKGL EWVS (SEQ ID NO:356)	RFTISRDN SKN TLYLQMNSLR AEDTAVYYC (SEQ ID NO:357)	WGQGTTV TVSS (SEQ ID NO:358)

15495	QVQLVQSGAEVKK PGSSVKVSCKASG (SEQ ID NO:365)	WVRQAPGQGL EWMG (SEQ ID NO:366)	RVTITADESTS TAYMELSSLR SEDTAVYYC (SEQ ID NO:367)	WGRGTLV TVSS (SEQ ID NO:368)
15478	QVQLVQSGAEVKK PGSSVKVSCKASG (SEQ ID NO:375)	WVRQAPGQGL EWMG (SEQ ID NO:376)	RVTITADESTS TAYMELSSLR SEDTAVYYC (SEQ ID NO:377)	WGQGTLV TVSS (SEQ ID NO:378)
15441	EVQLLES GGGLVQ PGGSLRLSCAASG (SEQ ID NO:385)	WVRQAPGKGL EWVS (SEQ ID NO:386)	RFTISRDN SKN TLYLQMNSLR AEDTAVYYC (SEQ ID NO:387)	WGQGT MV TVSS (SEQ ID NO:388)
20496	QLQLQESGPGLVK PSETLSLTCTVSG (SEQ ID NO:395)	WIRQPPGKGL EWIG (SEQ ID NO:396)	RVTISVDTSKN QFSLKLSSVTA ADTAVYYC (SEQ ID NO:397)	WGQGT MV IVSS (SEQ ID NO:398)

⁴Las regiones marco de VH descritas en la Tabla 5 se determinaron basándose en los límites del sistema de numeración de Kabat para las CDR. En otras palabras, las CDR VH se determinaron mediante Kabat y las regiones marco son los residuos de aminoácidos que rodean las CDR en la región variable en el formato FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 y FR4.

5

[000150] En determinadas modalidades, un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este descrito en la presente se une a B7-H4 humana y comprende las regiones marco de VL de un anticuerpo enumerado en la Tabla 6.

Tabla 6 Secuencias de aminoácidos de FR de VL³

Anticu erno	FR1 VL	FR2 VL	FR3 VL	FR4 VL
15461	EIVMTQSPATLSVSPG ERATLSC (SEQ ID NO:209)	WYQQKPGQAPR LLIY (SEQ ID NO:210)	GIPARFSGSGSGTEFTLTIS SLQSEDFAVYYC (SEQ ID NO:211)	FGGGT KVEIK (SEQ ID
20500	EIVMTQSPATLSVSPG ERATLSC (SEQ ID NO:219)	WYQQKPGQAPR LLIY (SEQ ID NO:220)	GIPARFSGSGSGTEFTLTIS SLQSEDFAVYYC (SEQ ID NO:221)	FGGGT KVEIK (SEQ ID
20501	EIVMTQSPATLSVSPG ERATLSC (SEQ ID NO:229)	WYQQKPGQAPR LLIY (SEQ ID NO:230)	GIPARFSGSGSGTEFTLTIS SLQSEDFAVYYC (SEQ ID NO:231)	FGGGT KVEIK (SEQ ID
20502 y 20502.	EIVMTQSPATLSVSPG ERATLSC (SEQ ID NO:239)	WYQQKPGQAPR LLIY (SEQ ID NO:240)	GIPARFSGSGSGTEFTLTIS SLQSEDFAVYYC (SEQ ID NO:241)	FGGGT KVEIK (SEQ ID
22208	EIVMTQSPATLSVSPG ERATLSC (SEQ ID NO: 249)	WYQQKPGQAPR LLIY (SEQ ID NO:250)	GIPARFSGSGSGTEFTLTIS SLQSEDFAVYYC (SEQ ID NO:251)	FGGGT KVEIK (SEQ ID
15462	EIVLTQSPGTLSLSPG ERATLSC (SEQ ID NO:259)	WYQQKPGQAPR LLIY (SEQ ID NO:260)	GIPDRFSGSGSGTDFTLTIS RLEPEDFAVYYC (SEQ ID NO:261)	FGGGT KVEIK (SEQ ID
22213	EIVLTQSPGTLSLSPG ERATLSC (SEQ ID NO:269)	WYQQKPGQAPR LLIY (SEQ ID NO:270)	GIPDRFSGSGSGTDFTLTIS RLEPEDFAVYYC (SEQ ID NO:271)	FGGGT KVEIK (SEQ ID
15465	DIQMTQSPSSVSASV GDRVITIC (SEQ ID NO:279)	WYQQKPGKAPK LLIY (SEQ ID NO:280)	GVPSRFSGSGSGTDFTLTIS SLQPEDFATYYC (SEQ ID NO:281)	FGGGT KVEIK (SEQ ID
20506	DIQMTQSPSSVSASV GDRVITIC (SEQ ID NO:289)	WYQQKPGKAPK LLIY (SEQ ID NO:290)	GVPSRFSGSGSGTDFTLTIS SLQPEDFATYYC (SEQ ID NO:291)	FGGGT KVEIK (SEQ ID

15483	DIQMTQSPSTLSASV GDRVITC (SEQ ID NO:299)	WYQQKPGKAPK LLIY (SEQ ID NO:300)	GVPSRFSGSGSGTEFTLTIS SLQPDDFATYYC (SEQ ID NO:301)	FGGGT KVEIK (SEQ ID
20513	DIQMTQSPSTLSASV GDRVITC (SEQ ID NO:309)	WYQQKPGKAPK LLIY (SEQ ID NO:310)	GVPSRFSGSGSGTEFTLTIS SLQPDDFATYYC (SEQ ID NO:311)	FGGGT KVEIK (SEQ ID
22216	DIQMTQSPSTLSASV GDRVITC (SEQ ID NO:319)	WYQQKPGKAPK LLIY (SEQ ID NO:320)	GVPSRFSGSGSGTEFTLTIS SLQPDDFATYYC (SEQ ID NO:321)	FGGGT KVEIK (SEQ ID
15489	DIQMTQSPSTLSASV GDRVITC (SEQ ID NO:329)	WYQQKPGKAPK LLIY (SEQ ID NO:330)	GVPSRFSGSGSGTEFTLTIS SLQPDDFATYYC (SEQ ID NO:331)	FGGGT KVEIK (SEQ ID
20516	DIQMTQSPSTLSASV GDRVITC (SEQ ID NO:339)	WYQQKPGKAPK LLIY (SEQ ID NO:340)	GVPSRFSGSGSGTEFTLTIS SLQPDDFATYYC (SEQ ID NO:341)	FGGGT KVEIK (SEQ ID
15472	DIQMTQSPSSLSASV GDRVITC (SEQ ID NO:349)	WYQQKPGKAPK LLIY (SEQ ID NO:350)	GVPSRFSGSGSGTDFTLTIS SLQPEDFATYYC (SEQ ID NO:351)	FGGGT KVEIK (SEQ ID NO:352)
15503	DIQLTQSPSSVSASVG DRVITC (SEQ ID NO:359)	WYQQKPGKAPK LLIY (SEQ ID NO:360)	GVPSRFSGSGSGTDFTLTIS SLQPEDFATYYC (SEQ ID NO:361)	FGGGT KVEIK (SEQ ID
15495	EIVMTQSPATLSVSPG ERATLSC (SEQ ID NO:369)	WYQQKPGQAPR LLIY (SEQ ID NO:370)	GIPARFSGSGSGTEFTLTIS SLQSEDAVYYC (SEQ ID NO:371)	FGGGT KVEIK (SEQ ID
15478	DIQMTQSPSTLSASV GDRVITC (SEQ ID NO:379)	WYQQKPGKAPK LLIY (SEQ ID NO:380)	GVPSRFSGSGSGTEFTLTIS SLQPDDFATYYC (SEQ ID NO:381)	FGGGT KVEIK (SEQ ID

15441	DIQMTQSPSTLSASV GDRVITTC (SEQ ID NO:389)	WYQQKPGKAPK LLIY (SEQ ID NO:390)	GVPSRFSGSGSGTEFTLTIS SLQPDDFATYYC (SEQ ID NO:391)	FGGGT KVEIK (SEQ ID
20496	DIQMTQSPSSLSASV GDRVITTC (SEQ ID NO:399)	WYQQKPGKAPK LLIY (SEQ ID NO:400)	GVPSRFSGSGSGTDFTLTIS SLQPEDFATYYC (SEQ ID NO:401)	FGGGT KVEIK (SEQ ID NO:402)

³Las regiones marco de VL descritas en la Tabla 6 se determinaron basándose en los límites del sistema de numeración de Kabat para las CDR. En otras palabras, las CDR VL se determinaron mediante Kabat y las regiones marco son los residuos de aminoácidos que rodean las CDR en la región variable en el formato FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 y FR4.

- 5 [000152] En determinadas modalidades, un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este descrito en la presente se une a B7-H4 humana y comprende las cuatro regiones marco de VH y las cuatro regiones marco de VL de un anticuerpo enumerado en las Tablas 5 y 6 (es decir, las cuatro regiones marco de VH del anticuerpo enumerado en la Tabla 5 y las cuatro regiones marco de VL del mismo anticuerpo enumerado en la Tabla 6).
- 10 [000153] En determinadas modalidades, un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este descrito en la presente se une a B7-H4 humana y comprende la secuencia de cadena pesada un anticuerpo enumerado en la Tabla 7.

Tabla 7: Secuencias de aminoácidos de cadena pesada de longitud completa

Anticuerpo	Secuencia de aminoácidos de cadena pesada de longitud completa (SEQ ID NO)
15461	QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSSSYWGWIRQPP GKGLEWIGNIYYSGSTYYNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLSSV TAADTAVYYCAREGSYPNWFDPWGQGLTVTVSSASTKGPSVF PLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT FPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK KVEPKSCDKHTCTPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST

	YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQP REPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:13)
20500	QLQLQESGPGPLVKPSETLSLTCTVSGGSIKSGSHYWGWIQPP GKGLEWIGNIYYSGSTYYNPSLRSRVTISVDTSKNQFSLKLSSV TAADTAVYYCAREGSYPNWFDWPWGQGTTLTVSSASTKGPSVF PLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT FPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK KVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQP REPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:23)
20501	QLQLQESGPGPLVKPSETLSLTCTVSGGSIKSGSHYWGWIQPP GKGLEWIGNIYYSGSTYYNPSLRSRVTISVDTSKNQFSLKLSSV TAADTAVYYCAREGSYPNWLDPWGQGTTLTVSSASTKGPSVF PLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT FPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK KVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQP REPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:33)
20502	QLQLQESGPGPLVKPSETLSLTCTVSGGSIKSGSYWGWIQPP GKGLEWIGNIYYSGSTYYNPSLRSRVTISVDTSKNQFSLKLSSV TAADTAVYYCAREGSYPNQFDPWGQGTTLTVSSASTKGPSVF PLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT FPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK KVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE

	EVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQP REPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:469)
20502.1	QLQLQESGPGGLVKPSETLSLTCTVSGGSIKSGSYWGWIRQPP GKGLEWIGNIYYSGSTYYNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLSSV TAADTAVYYCAREGSYPNQFDPWGQGILVTVSSASTKGPSVFP LAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKK VEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQP REPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:43)
22208	QLQLQESGPGGLVKPSETLSLTCTVSGGSIKSGSHYWGWIRQPP GKGLEWIGNIYYSGSTYYNPSLKSRTMSVDTSKNQFSLKLSS VTAADTAVYYCAREGSYPNWFDPWGQGTLVTVSSASTKGPSV FPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH TFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVD KKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ PREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:53)
15462	QLQLQESGPGGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSSSYYWGWIRQPP GKGLEWIGNIYYSGSTYYNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLSSV TAADTAVYYCAREGSYTTVLNVWGQGTMTVTVSSASTKGPSVF PLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK

	KVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:63)
22213	QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSIGRGSYYWGWIROP PGKGLEWIGNIYYSGSTYYNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLSS VTAADTAVYYCAREGSYTTVLNVWGQGTMTVSSASTKGPSV FPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH TFPVAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVD KKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ PREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:73)
15465	QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGGSISSGGYYWSWIRQH PGKGLEWIGNIYYSGSTYYNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLSS VTAADTAVYYCARESSTISADFDLWGRGTLTVSSASTKGPSV FPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH TFPVAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVD KKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ PREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:83)
20506	QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTASGGSISHGGYYWSWIRQHP GKGLEWIGNIYYSGSTYYNPSLKSRTMSVDTSKNQFSLKLSS VTAADTAVYYCARESSTISADFDLWGRGTLTVSSASTKGPSV FPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH

	TFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVD KKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ PREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:93)
15483	QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGGSISSGGYYWSWIRQH PGKGLEWIGNIYYSGSTYYNPSLRSRVTSVDTSKNQFSLKLSS VTAADTAVYYCARGLSTIDEAFDPWGQGTLVTVSSASTKGPSV FPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH TFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVD KKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ PREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:103)
20513	QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISDGSYYWSWIRQHP GKGLEWIGNIYYSGSTYYNPSLRSRVTMSVDTSKNQFSLKLSS VTAADTAVYYCARGLSTIDEAFDPWGQGTLVTVSSASTKGPSV FPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH TFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVD KKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ PREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:113)
22216	QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGGSISDGSYYWSWIRQH PGKGLEWIGNIYYSGSTYYNPSLRSRVTMSVDTSKNQFSLKLS SVTAADTAVYYCARGLSTIDEAFDPWGQGTLVTVSSASTKGPS

	VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV HTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV DKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:123)
15489	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSYYWSWIRQPPGK GLEWIGYIYSSGSTNYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTA ADTAVYYCARGSGQYAAPDYGMDVWGQGTTVTVSSASTKGP SVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK VDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:133)
20516	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSIISYYWGWIRQPPGK GLEWIGYIYSSGSTSYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAA DTAVYYCARGSGLYAAPDYGLDVWGQGTTVTVSSASTKGPSV FPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH TFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVD KKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ PREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:143)
15472	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPG KGLEWVSTISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNS

	LRAEDTAVYYCARGAGHYDLVGRYWGQGTTLTVSSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV HTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV DKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:153)
15503	EVQLLESGLLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPG KGLEWWSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNS LRAEDTAVYYCARVGFALNYWGQGTTLTVSSASTKGPSVFP LAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKK VEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQP REPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:163)
15495	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGGTFSSYAISWVRQAPG QGLEWMGGIPIFGTASYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSL RSED TAVYYCARQQYDGRRYFGLWGRGTLTVSSASTKGPSV FPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH TFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVD KKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ PREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:173)
15478	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGGTFSSYAISWVRQAPG

	QGLEWMGGIIPFGTANYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSL RSEDTAVYYCARGGPWFDPWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLA PSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVE PKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP QVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEA LHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:183)
15441	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPG KGLEWVSAISGSGGSTSYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNS LRAEDTAVYYCAKPSLATMLAFDIWGQGMVTVSSASTKGPSV FPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH TFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVD KKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ PREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:193)
20496	QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSSVYYWSWIRQPP GKGLEWIGSILVSGSTYYNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLSSVT AADTAVYYCARAVSFLDVWGQGMVIVSSASTKGPSVFPLAPS SKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEP KSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP QVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEA LHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:203)

[000154] En determinadas modalidades, un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este descrito en la presente se une a B7-H4 humana y comprende la secuencia de cadena ligera un anticuerpo enumerado en la Tabla 8.

Tabla 8: Secuencias de aminoácidos de cadena ligera de longitud completa

Anticuerpo	Secuencia de aminoácidos de cadena ligera de longitud completa (SEQ ID NO)
15461	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSNLAWYQQKPG QAPRLLIYGASTRATGIPARFSGSGSGTEFTLTISSLQSEDFAV YYCQQYHSFPFTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSG TASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK DSTYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNR GEC (SEQ ID NO:14)
20500	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSNLAWYQQKPG QAPRLLIYGASTRATGIPARFSGSGSGTEFTLTISSLQSEDFAV YYCQQYHSFPFTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSG TASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK DSTYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNR GEC (SEQ ID NO:24)
20501	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSNLAWYQQKPG QAPRLLIYGASTRATGIPARFSGSGSGTEFTLTISSLQSEDFAV YYCQQYHSFPFTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSG TASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK DSTYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNR GEC (SEQ ID NO:34)
20502 y 20502.1	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSNLAWYQQKPG QAPRLLIYGASTRATGIPARFSGSGSGTEFTLTISSLQSEDFAV YYCQQYHSFPFTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSG TASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK DSTYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNR GEC (SEQ ID NO:44)

22208	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSTNLAWYQQKPG QAPRLLIYDASARVTGIPARFSGSGSGTEFTLTISLQSEDFAV YYCQQYHSFPFTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSG TASVVCLLNNFYPPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK DSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNR GEC (SEQ ID NO:54)
15462	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPG QAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAV YYCQQAASYPLTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSG TASVVCLLNNFYPPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK DSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNR GEC (SEQ ID NO:64)
22213	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVASSHLAWYQQKPG QAPRLLIYDAVSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAV YYCQQAASYPLTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSG TASVVCLLNNFYPPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK DSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNR GEC (SEQ ID NO:74)
15465	DIQMTQSPSSVSASVGDRVITICRASQGISRWLAWYQQKPG KAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFA TYCQQAHTFPYTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKS GTASVVCLLNNFYPPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS KDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFN RGEC (SEQ ID NO:84)
20506	DIQMTQSPSSVSASVGDRVITICRASQGISRWLAWYQQKPG KAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFA TYCQQAHTFPYTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKS GTASVVCLLNNFYPPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS KDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFN RGEC (SEQ ID NO:94)

15483	DIQMTQSPSTLSASVGDRVITICRASQSISSWLAWYQQKPGK APKLLIYKASSLESGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFATY YCQQDNSYPYTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSG TASVVCLLNNFYPPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK DSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNR GEC (SEQ ID NO:104)
20513	DIQMTQSPSTLSASVGDRVITICRASQSISSWLAWYQQKPGK APKLLIYKASSLESGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFATY YCQQDNSYPYTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSG TASVVCLLNNFYPPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK DSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNR GEC (SEQ ID NO:114)
22216	DIQMTQSPSTLSASVGDRVITICRASKSISSWLAWYQQKPGK APKLLIYEASSLHSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFATY YCQQDNSYPYTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSG TASVVCLLNNFYPPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK DSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNR GEC (SEQ ID NO:124)
15489	DIQMTQSPSTLSASVGDRVITICRASQSISSWLAWYQQKPGK APKLLIYKASSLESGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFATY YCQQDNSFPFTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGT ASVVCLLNNFYPPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKD STYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRG EC (SEQ ID NO:134)
20516	DIQMTQSPSTLSASVGDRVITICRASQSISSWLAWYQQKPGK APKLLIYKASSLESGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFATY YCQQDNSFPFTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGT ASVVCLLNNFYPPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKD STYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRG EC (SEQ ID NO:144)

15472	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASQSISSYLNWYQQKPGK APKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFAT YYCQQLYSLPPTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSG TASVVCLLNNFYPPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK DSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNR GEC (SEQ ID NO:154)
15503	DIQLTQSPSSVSASVGDRVITICRASQDISSWLAWYQQKPGK APKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFAT YYCQQATSYPPWTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLK SGTASVVCLLNNFYPPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQD SKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSF NRGEC (SEQ ID NO:164)
15495	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSNLAWYQQKPG QAPRLIYASSTRATGIPARFSGSGSGTEFTLTISLQSEDFAV YYCQQVNVWPPTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKS GTASVVCLLNNFYPPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS KDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFN RGEC (SEQ ID NO:174)
15478	DIQMTQSPSTLSASVGDRVITICRASQSISSWLAWYQQKPGK APKLLIYKASSLESGVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPDDEFATY YCQQYNSYPPFTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSG TASVVCLLNNFYPPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK DSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNR GEC (SEQ ID NO:184)
15441	DIQMTQSPSTLSASVGDRVITICRASQSISSWLAWYQQKPGK APKLLIYDASSLESGVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPDDEFATY YCQQSKSYPRFTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGT ASVVCLLNNFYPPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKD STYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRG EC (SEQ ID NO:194)

20496	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASQSISSYLNWYQQKPGK APKLLIYGASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFAT YYCQQSYDPPWTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKS GTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS KDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFN RGEC (SEQ ID NO:204)
-------	--

[000155] En determinadas modalidades, un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este descrito en la presente se une a B7-H4 humana y comprende la secuencia de cadena pesada y la secuencia de cadena ligera de un anticuerpo enumerado en las Tablas 7 y 8 (es decir, la secuencia de cadena pesada del anticuerpo enumerado en la Tabla 7 y la secuencia de cadena ligera del mismo anticuerpo enumerado en la Tabla 8).

[000156] En determinadas modalidades, un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno descrito en la presente se une a B7-H4 humana, comprende las seis CDR de un anticuerpo enumerado en las Tablas 1 y 2 (es decir, las tres CDR VH del anticuerpo enumerado en la Tabla 1 y las tres CDR VL del mismo anticuerpo enumerado en la Tabla 2) y comprende una VH que comprende una secuencia al menos 80 % idéntica a la secuencia de VH del mismo anticuerpo en la Tabla 3 y una VL que comprende una secuencia al menos 80 % idéntica a la secuencia de VL del mismo anticuerpo en la Tabla 4. En determinadas modalidades, un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno descrito en la presente se une a B7-H4 humana, comprende las seis CDR de un anticuerpo enumerado en las Tablas 1 y 2 (es decir, las tres CDR VH del anticuerpo enumerado en la Tabla 1 y las tres CDR VL del mismo anticuerpo enumerado en la Tabla 2) y comprende una VH que comprende una secuencia al menos 85 % idéntica a la secuencia de VH del mismo anticuerpo en la Tabla 3 y una VL que comprende una secuencia al menos 85 % idéntica a la secuencia de VL del mismo anticuerpo en la Tabla 4.

[000157] En determinadas modalidades, un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno descrito en la presente se une a B7-H4 humana, comprende las seis CDR de un anticuerpo enumerado en las Tablas 1 y 2 (es decir, las tres CDR VH del anticuerpo enumerado en la Tabla 1 y las tres CDR VL del mismo anticuerpo enumerado en la Tabla 2) y comprende una VH que comprende una secuencia al menos 90 % idéntica a la secuencia de VH del mismo anticuerpo en la Tabla 3 y una VL que comprende una secuencia al menos 90 % idéntica a la secuencia de VL del mismo anticuerpo en la

Tabla 4. En determinadas modalidades, un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno descrito en la presente se une a B7-H4 humana, comprende las seis CDR de un anticuerpo enumerado en las Tablas 1 y 2 (es decir, las tres CDR VH del anticuerpo enumerado en la Tabla 1 y las tres CDR VL del mismo anticuerpo enumerado en la Tabla 2) y comprende una VH que comprende una secuencia al menos 95 % idéntica a la secuencia de VH del mismo anticuerpo en la Tabla 3 y una VL que comprende una secuencia al menos 95 % idéntica a la secuencia de VL del mismo anticuerpo en la Tabla 4.

[000158] En determinadas modalidades, un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno descrito en la presente se une a B7-H4 humana, comprende las seis CDR de un anticuerpo enumerado en las Tablas 1 y 2 (es decir, las tres CDR VH del anticuerpo enumerado en la Tabla 1 y las tres CDR VL del mismo anticuerpo enumerado en la Tabla 2) y comprende una VH que comprende una secuencia al menos 96 % idéntica a la secuencia de VH del mismo anticuerpo en la Tabla 3 y una VL que comprende una secuencia al menos 96 % idéntica a la secuencia de VL del mismo anticuerpo en la Tabla 4. En determinadas modalidades, un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno descrito en la presente se une a B7-H4 humana, comprende las seis CDR de un anticuerpo enumerado en las Tablas 1 y 2 (es decir, las tres CDR VH del anticuerpo enumerado en la Tabla 1 y las tres CDR VL del mismo anticuerpo enumerado en la Tabla 2) y comprende una VH que comprende una secuencia al menos 97 % idéntica a la secuencia de VH del mismo anticuerpo en la Tabla 3 y una VL que comprende una secuencia al menos 97 % idéntica a la secuencia de VL del mismo anticuerpo en la Tabla 4. En determinadas modalidades, un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno descrito en la presente se une a B7-H4 humana, comprende las seis CDR de un anticuerpo enumerado en las Tablas 1 y 2 (es decir, las tres CDR VH del anticuerpo enumerado en la Tabla 1 y las tres CDR VL del mismo anticuerpo enumerado en la Tabla 2) y comprende una VH que comprende una secuencia al menos 98 % idéntica a la secuencia de VH del mismo anticuerpo en la Tabla 3 y una VL que comprende una secuencia al menos 98 % idéntica a la secuencia de VL del mismo anticuerpo en la Tabla 4. En determinadas modalidades, un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno descrito en la presente se une a B7-H4 humana, comprende las seis CDR de un anticuerpo enumerado en las Tablas 1 y 2 (es decir, las tres CDR VH del anticuerpo enumerado en la Tabla 1 y las tres CDR VL del mismo anticuerpo enumerado en la Tabla 2) y comprende una VH que comprende una secuencia al menos 99 % idéntica a la secuencia de VH del mismo anticuerpo en la Tabla 3 y una VL que comprende una secuencia al menos 99 % idéntica a la secuencia de VL del mismo anticuerpo en la Tabla 4.

[000159] En determinadas modalidades, un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno descrito en

la presente se une a B7-H4 humana, comprende las seis CDR de un anticuerpo enumerado en las Tablas 1 y 2 (es decir, las tres CDR VH del anticuerpo enumerado en la Tabla 1 y las tres CDR VL del mismo anticuerpo enumerado en la Tabla 2), comprende una VH que comprende una secuencia al menos 80 % idéntica a la secuencia de VH del mismo anticuerpo en la Tabla 3 y una VL que
5 comprende una secuencia al menos 80 % idéntica a la secuencia de VL del mismo anticuerpo en la Tabla 4 y se une a B7-H4 humana, de mono cynomolgus, rata y/o ratón. En determinadas modalidades, un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno descrito en la presente se une a B7-H4 humana, comprende las seis CDR de un anticuerpo enumerado en las Tablas 1 y 2 (es decir, las tres CDR VH del anticuerpo enumerado en la Tabla 1 y las tres CDR VL del mismo anticuerpo enumerado
10 en la Tabla 2), comprende una VH que comprende una secuencia al menos 85 % idéntica a la secuencia de VH del mismo anticuerpo en la Tabla 3 y una VL que comprende una secuencia al menos 85 % idéntica a la secuencia de VL del mismo anticuerpo en la Tabla 4 y se une a B7-H4 humana, de mono cynomolgus, rata y/o ratón.

[000160] En determinadas modalidades, un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno descrito en
15 la presente se une a B7-H4 humana, comprende las seis CDR de un anticuerpo enumerado en las Tablas 1 y 2 (es decir, las tres CDR VH del anticuerpo enumerado en la Tabla 1 y las tres CDR VL del mismo anticuerpo enumerado en la Tabla 2), comprende una VH que comprende una secuencia al menos 90 % idéntica a la secuencia de VH del mismo anticuerpo en la Tabla 3 y una VL que comprende una secuencia al menos 90 % idéntica a la secuencia de VL del mismo anticuerpo en la
20 Tabla 4 y se une a B7-H4 humana, de mono cynomolgus, rata y/o ratón. En determinadas modalidades, un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno descrito en la presente se une a B7-H4 humana, comprende las seis CDR de un anticuerpo enumerado en las Tablas 1 y 2 (es decir, las tres CDR VH del anticuerpo enumerado en la Tabla 1 y las tres CDR VL del mismo anticuerpo enumerado en la Tabla 2), comprende una VH que comprende una secuencia al menos 95 % idéntica a la
25 secuencia de VH del mismo anticuerpo en la Tabla 3 y una VL que comprende una secuencia al menos 95 % idéntica a la secuencia de VL del mismo anticuerpo en la Tabla 4 y se une a B7-H4 humana, de mono cynomolgus, rata y/o ratón.

[000161] En determinadas modalidades, un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno descrito en
la presente se une a B7-H4 humana, comprende las seis CDR de un anticuerpo enumerado en las
30 Tablas 1 y 2 (es decir, las tres CDR VH del anticuerpo enumerado en la Tabla 1 y las tres CDR VL del mismo anticuerpo enumerado en la Tabla 2), comprende una VH que comprende una secuencia al menos 96 % idéntica a la secuencia de VH del mismo anticuerpo en la Tabla 3 y una VL que comprende una secuencia al menos 96 % idéntica a la secuencia de VL del mismo anticuerpo en la

Tabla 4 y se une a B7-H4 humana, de mono cynomolgus, rata y/o ratón. En determinadas modalidades, un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno descrito en la presente se une a B7-H4 humana, comprende las seis CDR de un anticuerpo enumerado en las Tablas 1 y 2 (es decir, las tres CDR VH del anticuerpo enumerado en la Tabla 1 y las tres CDR VL del mismo anticuerpo enumerado en la Tabla 2), comprende una VH que comprende una secuencia al menos 97 % idéntica a la secuencia de VH del mismo anticuerpo en la Tabla 3 y una VL que comprende una secuencia al menos 97 % idéntica a la secuencia de VL del mismo anticuerpo en la Tabla 4 y se une a B7-H4 humana, de mono cynomolgus, rata y/o ratón. En determinadas modalidades, un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno descrito en la presente se une a B7-H4 humana, comprende las seis CDR de un anticuerpo enumerado en las Tablas 1 y 2 (es decir, las tres CDR VH del anticuerpo enumerado en la Tabla 1 y las tres CDR VL del mismo anticuerpo enumerado en la Tabla 2), comprende una VH que comprende una secuencia al menos 98 % idéntica a la secuencia de VH del mismo anticuerpo en la Tabla 3 y una VL que comprende una secuencia al menos 98 % idéntica a la secuencia de VL del mismo anticuerpo en la Tabla 4 y se une a B7-H4 humana, de mono cynomolgus, rata y/o ratón. En determinadas modalidades, un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno descrito en la presente se une a B7-H4 humana, comprende las seis CDR de un anticuerpo enumerado en las Tablas 1 y 2 (es decir, las tres CDR VH del anticuerpo enumerado en la Tabla 1 y las tres CDR VL del mismo anticuerpo enumerado en la Tabla 2), comprende una VH que comprende una secuencia al menos 99 % idéntica a la secuencia de VH del mismo anticuerpo en la Tabla 3 y una VL que comprende una secuencia al menos 99 % idéntica a la secuencia de VL del mismo anticuerpo en la Tabla 4 y se une a B7-H4 humana, de mono cynomolgus, rata y/o ratón.

[000162] En determinadas modalidades, un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno descrito en la presente se une a B7-H4 humana, comprende las seis CDR de un anticuerpo enumerado en las Tablas 1 y 2 (es decir, las tres CDR VH del anticuerpo enumerado en la Tabla 1 y las tres CDR VL del mismo anticuerpo enumerado en la Tabla 2), comprende una VH que comprende una secuencia al menos 80 % idéntica a la secuencia de VH del mismo anticuerpo en la Tabla 3 y una VL que comprende una secuencia al menos 80 % idéntica a la secuencia de VL del mismo anticuerpo en la Tabla 4, aumenta la proliferación de linfocitos T, aumenta la producción de IFN γ y media la actividad de ADCC contra células que expresan B7-H4. En determinadas modalidades, un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno descrito en la presente se une a B7-H4 humana, comprende las seis CDR de un anticuerpo enumerado en las Tablas 1 y 2 (es decir, las tres CDR VH del anticuerpo enumerado en la Tabla 1 y las tres CDR VL del mismo anticuerpo enumerado en la Tabla 2), comprende una VH que comprende una secuencia al menos 85 % idéntica a la secuencia de VH del

mismo anticuerpo en la Tabla 3 y una VL que comprende una secuencia al menos 85 % idéntica a la secuencia de VL del mismo anticuerpo en la Tabla 4, aumenta la proliferación de linfocitos T, aumenta la producción de IFN γ y media la actividad de ADCC contra células que expresan B7-H4.

5 [000163] En determinadas modalidades, un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno descrito en la presente se une a B7-H4 humana, comprende las seis CDR de un anticuerpo enumerado en las Tablas 1 y 2 (es decir, las tres CDR VH del anticuerpo enumerado en la Tabla 1 y las tres CDR VL del mismo anticuerpo enumerado en la Tabla 2), comprende una VH que comprende una secuencia al menos 90 % idéntica a la secuencia de VH del mismo anticuerpo en la Tabla 3 y una VL que comprende una secuencia al menos 90 % idéntica a la secuencia de VL del mismo anticuerpo en la
10 Tabla 4, aumenta la proliferación de linfocitos T, aumenta la producción de IFN γ y/o media la actividad de ADCC contra células que expresan B7-H4. En determinadas modalidades, un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno descrito en la presente se une a B7-H4 humana, comprende las seis CDR de un anticuerpo enumerado en las Tablas 1 y 2 (es decir, las tres CDR VH del anticuerpo enumerado en la Tabla 1 y las tres CDR VL del mismo anticuerpo enumerado en la
15 Tabla 2), comprende una VH que comprende una secuencia al menos 95 % idéntica a la secuencia de VH del mismo anticuerpo en la Tabla 3 y una VL que comprende una secuencia al menos 95 % idéntica a la secuencia de VL del mismo anticuerpo en la Tabla 4, aumenta la proliferación de linfocitos T, aumenta la producción de IFN γ y media la actividad de ADCC contra células que expresan B7-H4.

20 [000164] En determinadas modalidades, un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno descrito en la presente se une a B7-H4 humana, comprende las seis CDR de un anticuerpo enumerado en las Tablas 1 y 2 (es decir, las tres CDR VH del anticuerpo enumerado en la Tabla 1 y las tres CDR VL del mismo anticuerpo enumerado en la Tabla 2), comprende una VH que comprende una secuencia al menos 96 % idéntica a la secuencia de VH del mismo anticuerpo en la Tabla 3 y una VL que
25 comprende una secuencia al menos 96 % idéntica a la secuencia de VL del mismo anticuerpo en la Tabla 4, aumenta la proliferación de linfocitos T, aumenta la producción de IFN γ y media la actividad de ADCC contra células que expresan B7-H4. En determinadas modalidades, un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno descrito en la presente se une a B7-H4 humana, comprende las seis CDR de un anticuerpo enumerado en las Tablas 1 y 2 (es decir, las tres CDR VH del anticuerpo
30 enumerado en la Tabla 1 y las tres CDR VL del mismo anticuerpo enumerado en la Tabla 2), comprende una VH que comprende una secuencia al menos 97 % idéntica a la secuencia de VH del mismo anticuerpo en la Tabla 3 y una VL que comprende una secuencia al menos 97 % idéntica a la secuencia de VL del mismo anticuerpo en la Tabla 4, aumenta la proliferación de linfocitos T,

aumenta la producción de IFN γ y media la actividad de ADCC contra células que expresan B7-H4. En determinadas modalidades, un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno descrito en la presente se une a B7-H4 humana, comprende las seis CDR de un anticuerpo enumerado en las Tablas 1 y 2 (es decir, las tres CDR VH del anticuerpo enumerado en la Tabla 1 y las tres CDR VL del mismo anticuerpo enumerado en la Tabla 2), comprende una VH que comprende una secuencia al menos 98 % idéntica a la secuencia de VH del mismo anticuerpo en la Tabla 3 y una VL que comprende una secuencia al menos 98 % idéntica a la secuencia de VL del mismo anticuerpo en la Tabla 4, aumenta la proliferación de linfocitos T, aumenta la producción de IFN γ y media la actividad de ADCC contra células que expresan B7-H4. En determinadas modalidades, un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno descrito en la presente se une a B7-H4 humana, comprende las seis CDR de un anticuerpo enumerado en las Tablas 1 y 2 (es decir, las tres CDR VH del anticuerpo enumerado en la Tabla 1 y las tres CDR VL del mismo anticuerpo enumerado en la Tabla 2), comprende una VH que comprende una secuencia al menos 99 % idéntica a la secuencia de VH del mismo anticuerpo en la Tabla 3 y una VL que comprende una secuencia al menos 99 % idéntica a la secuencia de VL del mismo anticuerpo en la Tabla 4, aumenta la proliferación de linfocitos T, aumenta la producción de IFN γ y media la actividad de ADCC contra células que expresan B7-H4.

[000165] En determinados aspectos, un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este descrito en la presente puede describirse por su dominio de VL solo, su dominio de VH solo, sus 3 CDR VL solas o sus 3 CDR VH solas. Véase, por ejemplo, Rader C et ál., (1998) PNAS 95: 8910-8915, que se incorpora a la presente mediante esta referencia en su totalidad, que describe la humanización del anticuerpo anti- $\alpha\beta 3$ de ratón mediante la identificación de una cadena ligera o cadena pesada complementaria, respectivamente, a partir de una biblioteca de cadenas ligeras o cadenas pesadas humanas, lo cual da como resultado variantes humanizadas del anticuerpo que tienen afinidades tan altas o más altas que la afinidad del anticuerpo original. Véase, además, Clackson T et ál., (1991) Nature 352: 624-628, que se incorpora a la presente mediante esta referencia en su totalidad, que describen métodos para producir anticuerpos que se unen a un antígeno específico mediante el uso de un dominio de VL (o dominio de VH) específico y la selección a partir de una biblioteca para los dominios variables complementarios. La selección produjo 14 nuevos compañeros para un dominio de VH específico y 13 nuevos compañeros para un dominio de VL específico, que tenían unión fuerte, según se determinó mediante ELISA. Véase, además, Kim SJ & Hong HJ, (2007) J Microbiol 45: 572-577, que se incorpora a la presente mediante esta referencia en su totalidad, que describe métodos para producir anticuerpos que se unen a un antígeno específico mediante el uso de un dominio de VH específico y la selección a partir de una biblioteca (por ejemplo, biblioteca de VL

humana) para dominios de VL complementarios; los dominios de VL seleccionados, a su vez, pueden utilizarse para guiar la selección de dominios de VH complementarios (por ejemplo, humanos) adicionales.

[000166] En determinadas modalidades, las CDR de un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este se pueden determinar de acuerdo con el esquema de numeración de Chothia, que hace referencia a la ubicación de los bucles estructurales de inmunoglobulina (véase, por ejemplo, Chothia C & Lesk AM (1987), J Mol Biol 196: 901-917; Al-Lazikani B et ál., (1997) J Mol Biol 273: 927-948; Chothia C et ál., (1992) J Mol Biol 227: 799-817; Tramontano A et ál., (1990) J Mol Biol 215(1): 175:-82; y patente estadounidense n.º 7,709,226). Típicamente, al utilizar la convención de numeración de Kabat, el bucle de CDR-H1 de Chothia está presente en los aminoácidos de cadena pesada 26 a 32, 33 o 34, el bucle de CDR-H2 de Chothia está presente en los aminoácidos de cadena pesada 52 a 56, y el bucle de CDR-H3 de Chothia está presente en los aminoácidos de cadena pesada 95 a 102, mientras que el bucle de CDR-L1 de Chothia está presente en los aminoácidos de cadena ligera 24 a 34, el bucle de CDR-L2 de Chothia está presente en los aminoácidos de cadena ligera 50 a 56, y el bucle de CDR-L3 de Chothia está presente en los aminoácidos de cadena ligera 89 a 97. El extremo del bucle CDR-H1 de Chothia, cuando se enumera mediante el uso de la convención de numeración de Kabat varía entre H32 y H34 según la longitud del bucle (esto se debe a que el esquema de numeración de Kabat ubica las inserciones en H35A y H35B; si 35A y 35B no están presentes, el bucle finaliza en 32; si solo 35A está presente, el bucle termina en 33; si tanto 35A como 35B están presente, el bucle termina en 34).

[000167] En determinados aspectos, se proporcionan en la presente anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno de estos que se unen específicamente a B7-H4 (por ejemplo, B7-H4 humana) y que comprenden las CDR VH y VL de Chothia de un anticuerpo enumerado en las Tablas 3 y 4. En determinadas modalidades, los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno de estos que se unen de forma específica a B7-H4 (por ejemplo, B7-H4 humana) comprenden una o más CDR, donde las CDR de Chothia y Kabat tienen la misma secuencia de aminoácidos. En determinadas modalidades, se proporcionan en la presente anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno de estos que se unen específicamente a B7-H4 (por ejemplo, B7-H4 humana) y comprenden combinaciones de CDR de Kabat y CDR de Chothia.

[000168] En determinados aspectos, las CDR de un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este se pueden determinar de acuerdo con el sistema de numeración de IMGT, como se describe en Lefranc M-P, (1999) The Immunologist 7: 132-136 y Lefranc M-P et ál., (1999) Nucleic Acids Res 27:

209-212. De acuerdo con el esquema de numeración de IMGT, VH-CDR1 se encuentra en las posiciones 26 a 35, VH-CDR2 se encuentra en las posiciones 51 a 57, VH-CDR3 se encuentra en las posiciones 93 a 102, VL-CDR1 se encuentra en las posiciones 27 a 32, VL-CDR2 se encuentra en las posiciones 50 a 52, y VL-CDR3 se encuentra en las posiciones 89 a 97. En una modalidad en particular, se proporcionan en la presente anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno de estos que se unen específicamente a B7-H4 (por ejemplo, B7-H4 humana) y que comprenden las CDR VH y VL de IMGT de un anticuerpo enumerado en las Tablas 3 y 4, por ejemplo, tal como se describe en Lefranc M-P (1999) supra y Lefranc M-P et ál., (1999) supra).

[000169] En determinados aspectos, las CDR de un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este se pueden determinar de acuerdo con MacCallum RM et ál., (1996) J Mol Biol 262: 732-745. Véase, además, por ejemplo, Martin A. "Protein Sequence and Structure Analysis of Antibody Variable Domains," en Antibody Engineering, Kontermann y Dübel, ed., capítulo 31, p. 422-439, Springer-Verlag, Berlín (2001). En una modalidad en particular, se proporcionan en la presente anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno de estos que se unen específicamente a B7-H4 (por ejemplo, B7-H4 humana) y que comprenden las CDR VH y VL de un anticuerpo enumerado en las Tablas 3 y 4, según se determina mediante el método en MacCallum RM et ál.

[000170] En determinados aspectos, las CDR de un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este se pueden determinar de acuerdo con el esquema de numeración AbM, que se refiere a regiones hipervariables de AbM, que representan un acuerdo entre las CDR de Kabat y los bucles estructurales de Chothia, y son utilizadas por el software de modelado de anticuerpos AbM de Oxford Molecular (Oxford Molecular Group, Inc.). En una modalidad en particular, se proporcionan en la presente anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno de estos que se unen específicamente a B7-H4 (por ejemplo, B7-H4 humana) y que comprenden las CDR VH y VL de un anticuerpo enumerado en las Tablas 3 y 4, según se determina mediante el esquema de numeración AbM.

[000171] En aspectos específicos, se proporcionan en la presente anticuerpos que comprenden una cadena pesada y una cadena ligera. Con respecto a la cadena pesada, en una modalidad específica, la cadena pesada de un anticuerpo descrito en la presente puede ser una cadena pesada alfa (α), delta (δ), épsilon (ϵ), gamma (γ) o mu (μ). En otra modalidad específica, la cadena pesada de un anticuerpo descrito en la presente puede comprender una cadena pesada alfa (α), delta (δ), épsilon (ϵ), gamma (γ) o mu (μ) humana. En una modalidad en particular, un anticuerpo descrito en la presente, que se une inmuno-específicamente a B7-H4 (por ejemplo, B7-H4 humana), comprende una cadena pesada donde la secuencia de aminoácidos del dominio de VH comprende una

secuencia de aminoácidos establecida en la Tabla 3 y donde la región constante de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de una región constante de cadena pesada gamma (γ) humana. En una modalidad específica, un anticuerpo descrito en la presente, que se une específicamente a B7-H4 (por ejemplo, B7-H4 humana), comprende una cadena pesada donde la

5 secuencia de aminoácidos del dominio de VH comprende una secuencia establecida en la Tabla 3 y donde la región constante de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de una cadena pesada humana descrita en la presente o conocida en la técnica. Los ejemplos no taxativos de secuencias de región constante humana se han descrito en la técnica, por ejemplo, véase la patente estadounidense n.º 5,693,780 y Kabat EA et ál., (1991) supra.

10 [000172] Con respecto a la cadena ligera, en una modalidad específica, la cadena ligera de un anticuerpo descrito en la presente es una cadena ligera kappa. La región constante de una cadena ligera kappa humana puede comprender la siguiente secuencia de aminoácidos:

[000173] RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNFFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQD
SKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:405).

15 [000174] La región constante de una cadena ligera kappa humana se puede codificar mediante la siguiente secuencia de nucleótidos:

[000175] CGGACCGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAAT
CTGGAACCTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGG
AAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAG
20 GACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAG
TCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGG
GAGAGTGT (SEQ ID NO:406).

[000176] En otra modalidad específica, la cadena ligera de un anticuerpo descrito en la presente es una cadena ligera lambda. En otra modalidad específica adicional, la cadena ligera de un anticuerpo descrito en la presente es una cadena ligera kappa humana o una cadena ligera lambda humana. En una modalidad en particular, un anticuerpo descrito en la presente, que se une inmunoespecíficamente a un polipéptido B7-H4 (por ejemplo, B7-H4 humana), comprende una cadena ligera donde la secuencia de aminoácidos del dominio de VL comprende una secuencia de aminoácidos establecida en la Tabla 4 y donde la región constante de la cadena ligera comprende la

25 secuencia de aminoácidos de una región constante de cadena ligera kappa humana. En otra modalidad en particular, un anticuerpo descrito en la presente, que se une inmunoespecíficamente a

30

B7-H4 (por ejemplo, B7-H4 humana), comprende una cadena ligera donde la secuencia de aminoácidos del dominio de VL comprende una secuencia de aminoácidos establecida en la Tabla 4 y donde la región constante de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de una región constante de cadena ligera lambda humana. En una modalidad específica, un anticuerpo descrito en la presente, que se une inmuno-específicamente a B7-H4 (por ejemplo, B7-H4 humana), comprende una cadena ligera donde la secuencia de aminoácidos del dominio de VL comprende una secuencia de aminoácidos establecida en la Tabla 4 y donde la región constante de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de una región constante de cadena ligera lambda o kappa humana. Los ejemplos no taxativos de secuencias de región constante humana se han descrito en la técnica, por ejemplo, véase la patente estadounidense n.º 5,693,780 y Kabat EA et ál., (1991) supra.

[000177] En una modalidad específica, un anticuerpo descrito en la presente, que se une inmuno-específicamente a B7-H4 (por ejemplo, B7-H4 humana) comprende un dominio de VH y un dominio de VL que comprende una secuencia de aminoácidos descrita en la presente, y donde las regiones constantes comprenden las secuencias de aminoácidos de las regiones constantes de una molécula de inmunoglobulina IgG, IgE, IgM, IgD, IgA o IgY, o una molécula de inmunoglobulina IgG, IgE, IgM, IgD, IgA o IgY humana. En otra modalidad específica, un anticuerpo descrito en la presente, que se une inmuno-específicamente a B7-H4 (por ejemplo, B7-H4 humana) comprende un dominio de VH y un dominio de VL que comprende una secuencia de aminoácidos descrita en la presente, y donde las regiones constantes comprenden las secuencias de aminoácidos de las regiones constantes de una molécula de inmunoglobulina IgG, IgE, IgM, IgD, IgA o IgY, cualquier clase (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2) o cualquier subclase (por ejemplo, IgG2a e IgG2b) de molécula de inmunoglobulina. En una modalidad en particular, las regiones constantes comprenden las secuencias de aminoácidos de las regiones constantes de una molécula de inmunoglobulina IgG, IgE, IgM, IgD, IgA o IgY humana, cualquier clase (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2) o cualquier subclase (por ejemplo, IgG2a e IgG2b) de molécula de inmunoglobulina.

[000178] La región constante de una cadena pesada de IgG1 humana puede comprender la siguiente secuencia de aminoácidos:

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS
VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL
MISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK
EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG
QPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVMSHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ

ID NO:407).

[000179] La región constante de una cadena pesada de IgG₁ humana se puede codificar mediante la siguiente secuencia de nucleótidos:

GCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGC
 5 ACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGAAC
 TCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACT
 CCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACG
 TGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAAC
 CACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCC
 10 CAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGT
 GAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGC
 CAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGGGTGGTCAGCGTCCTCACCGT
 CCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCA
 GCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACC
 15 CTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGC
 TTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAG
 ACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACA
 AGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCA
 CTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA. (SEQ ID NO:408)

20 [000180] Los ejemplos no taxativos de regiones constantes humanas se han descrito en la técnica, por ejemplo, véase Kabat EA et ál., (1991) *supra*.

[000181] En determinadas modalidades, se introducen una, dos o más mutaciones (por ejemplo, sustituciones de aminoácidos) en la región Fc de un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este descrito en la presente (por ejemplo, dominio CH2 (residuos 231-340 de IgG₁ humana) y/o
 25 dominio CH3 (residuos 341-447 de IgG₁ humana) y/o la región bisagra, con numeración de acuerdo con el sistema de numeración de Kabat (por ejemplo, el índice EU en Kabat)), para modificar una o más propiedades funcionales del anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este, tal como semivida en suero, fijación de complemento, unión al receptor Fc y/o citotoxicidad celular dependiente del antígeno.

30 [000182] En determinadas modalidades, se introducen una, dos o más mutaciones (por ejemplo, sustituciones de aminoácidos) en la región bisagra de la región Fc (dominio CH1), de manera que se

modifique la cantidad de residuos de cisteína en la región bisagra (por ejemplo, aumente o disminuya) como se describe en, por ejemplo, la patente estadounidense n.º 5,677,425. Se puede modificar la cantidad de residuos de cisteína en la región bisagra del dominio CH1 para, por ejemplo, facilitar el montaje de las cadenas ligera y pesada, o para alterar (por ejemplo, aumentar o disminuir) la estabilidad del anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este.

[000183] En algunas modalidades, se introducen una, dos o más mutaciones (por ejemplo, sustituciones de aminoácidos) en la región Fc de un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este descrito en la presente (por ejemplo, dominio CH2 (residuos 231-340 de IgG1 humana) y/o dominio CH3 (residuos 341-447 de IgG1 humana) y/o la región bisagra, con numeración de acuerdo con el sistema de numeración de Kabat (por ejemplo, el índice EU en Kabat)), para aumentar o disminuir la afinidad del anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este para un receptor Fc (por ejemplo, un receptor Fc activado) en la superficie de una célula efectora. Las mutaciones en la región Fc que disminuyen o aumentan la afinidad para un receptor Fc y técnicas para introducir dichas mutaciones en el receptor Fc o fragmento de este son conocidas por un experto en la técnica. Los ejemplos de mutaciones en el receptor Fc que se pueden realizar para modificar la afinidad del anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este para un receptor Fc se describen en, por ejemplo, Smith P et ál., (2012) PNAS 109: 6181-6186, patente estadounidense n.º 6,737,056, y publicación internacional n.º WO 02/060919; WO 98/23289 y WO 97/34631, las cuales se incorporan a la presente mediante esta referencia.

[000184] En una modalidad específica, se introducen una, dos o más mutaciones de aminoácidos (es decir, sustituciones, inserciones o eliminaciones) en un dominio constante de IgG, un fragmento de unión a FcRn de este (preferentemente, un Fc o fragmento de dominio de Fc bisagra) para alterar (por ejemplo, disminuir o aumentar) la semivida del anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este in vivo. Véase, por ejemplo, las publicaciones internacionales n.º WO 02/060919; WO 98/23289 y WO 97/34631; y las patentes estadounidenses n.º 5,869,046, 6,121,022, 6,277,375 y 6,165,745, para ver ejemplos de mutaciones que modificarán (por ejemplo, disminuirán o aumentarán) la semivida de un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este in vivo. En algunas modalidades, se introducen una, dos o más mutaciones de aminoácidos (es decir, sustituciones, inserciones o eliminaciones) en un dominio constante de IgG, un fragmento de unión a FcRn de este (preferentemente, un Fc o fragmento de dominio de Fc bisagra) para disminuir la semivida del anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este in vivo. En otras modalidades, se introducen una, dos o más mutaciones de aminoácidos (es decir, sustituciones, inserciones o eliminaciones) en un dominio constante de IgG, un fragmento de unión a FcRn de este (preferentemente, un Fc o

fragmento de dominio de Fc bisagra) para aumentar la semivida del anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este in vivo. En una modalidad específica, los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno de estos pueden tener una o más mutaciones de aminoácidos (por ejemplo, sustituciones) en el segundo dominio constante (CH2) (residuos 231-340 de IgG1 humana) y/o el tercer dominio constante (CH3) (residuos 341-447 de IgG1 humana), con numeración de acuerdo con el índice EU en Kabat (Kabat EA et ál., (1991) supra). En una modalidad específica, la región constante de la IgG1 comprende una sustitución de metionina (M) a tirosina (Y) en la posición 252, una sustitución de serina (S) a treonina (T) en la posición 254, y una sustitución de treonina (T) a ácido glutámico (E) en la posición 256, numeradas de acuerdo con el índice EU de Kabat. Véase la patente estadounidense n.º 7,658,921, que se incorpora a la presente mediante esta referencia. Se ha demostrado que este tipo de IgG mutante, denominada "mutante de YTE" presenta una semivida cuatro veces mayor en comparación con las versiones de tipo silvestre del mismo anticuerpo (ver, Dall'Acqua WF et ál., (2006) J Biol Chem 281: 23514-24). En determinadas modalidades, un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este comprende un dominio constante de IgG que comprende una, dos, tres o más sustituciones de aminoácidos de residuos de aminoácidos en las posiciones 251-257, 285-290, 308-314, 385-389 y 428-436, numerados de acuerdo con el índice EU de Kabat.

[000185] En una modalidad adicional, se introducen una, dos o más sustituciones de aminoácidos en una región Fc de dominio constante de IgG para modificar las funciones efectoras del anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este. Por ejemplo, uno o más aminoácidos que se seleccionan de los residuos de aminoácidos 234, 235, 236, 237, 297, 318, 320 y 322, numerados de acuerdo con el índice EU de Kabat, se pueden reemplazar con un residuo de aminoácido distinto, de manera que el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este tenga una afinidad modificada con un ligando efector, pero conserve la capacidad de unión al antígeno del anticuerpo original. El ligando efector con respecto al cual se modifica la afinidad puede ser, por ejemplo, un receptor Fc o el componente C1 del complemento. Este enfoque se describe con mayor detalle en las patentes estadounidenses n.º 5,624,821 y 5,648,260. En algunas modalidades, la eliminación o inactivación (a través de mutaciones puntuales u otros medios) de un dominio de región constante pueden reducir la unión del receptor Fc del anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este en circulación y, de esta manera, aumentar la localización del tumor. Véanse, por ejemplo, las patentes estadounidenses n.º 5,585,097 y 8,591,886, para obtener una descripción de mutaciones que eliminan o inactivan el dominio constante y aumentar así la localización del tumor. En determinadas modalidades, se pueden introducir una o más sustituciones de aminoácidos en la región Fc para retirar los posibles sitios de glicosilación en la región Fc, lo que puede reducir la unión al receptor Fc (ver, por ejemplo, Shields

RL et ál., (2001) J Biol Chem 276: 6591-604).

[000186] En determinadas modalidades, uno o más aminoácidos que se seleccionan de los residuos de aminoácidos 329, 331 y 322 en la región constante, numerados de acuerdo con el índice EU de Kabat, se pueden reemplazar con un residuo de aminoácido distinto, de manera que el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este presente unión a C1q modificada y/o citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) menor o inexistente. Este enfoque se describe con mayor detalle en la patente estadounidense n.º 6,194,551 (Idusogie et ál.). En algunas modalidades, uno o más residuos de aminoácidos dentro de las posiciones de aminoácidos 231 a 238 en la región de extremo N del dominio CH2 se modifican para modificar así la capacidad del anticuerpo para fijar el complemento. Este abordaje se describe de manera adicional en la publicación internacional WO 94/29351. En determinadas modalidades, la región Fc se modifica para aumentar la capacidad del anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este para mediar la citotoxicidad celular dependiente del anticuerpo (ADCC) y/o de aumentar la afinidad del anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este con un receptor Fcγ mediante la mutación de uno o más aminoácidos (por ejemplo, mediante la introducción de sustituciones de aminoácidos) en las siguientes posiciones: 238, 239, 248, 249, 252, 254, 255, 256, 258, 265, 267, 268, 269, 270, 272, 276, 278, 280, 283, 285, 286, 289, 290, 292, 293, 294, 295, 296, 298, 301, 303, 305, 307, 309, 312, 315, 320, 322, 324, 326, 327, 328, 329, 330, 331, 333, 334, 335, 337, 338, 340, 360, 373, 376, 378, 382, 388, 389, 398, 414, 416, 419, 430, 434, 435, 437, 438 o 439, numeradas de acuerdo con el índice EU de Kabat. Este abordaje se describe de manera adicional en la publicación internacional WO 00/42072.

[000187] En determinadas modalidades, un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este descrito en la presente comprende el dominio constante de una IgG1 con una mutación (por ejemplo, sustitución) en la posición 267, 328 o una combinación de estas, numeradas de acuerdo con el índice EU de Kabat. En determinadas modalidades, un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este descrito en la presente comprende el dominio constante de una IgG1 con una mutación (por ejemplo, sustitución) seleccionada del grupo que consiste en S267E, L328F y una combinación de estos. En determinadas modalidades, un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este descrito en la presente comprende el dominio constante de una IgG1 con una mutación S267E/L328F (por ejemplo, sustitución). En determinadas modalidades, un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este descrito en la presente que comprende el dominio constante de una IgG1 con una mutación S267E/L328F (por ejemplo, sustitución) tiene una afinidad de unión mayor para FcγRIIA, FcγRIIB, o FcγRIIA y FcγRIIB.

[000188] Se ha informado que los anticuerpos con contenido reducido de fucosa tienen una mayor afinidad para receptores Fc, tal como, por ejemplo, FcγRIIIA. Por consiguiente, en determinadas modalidades, un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este descrito en la presente tiene contenido reducido de fucosa o carece de fucosa (es decir, es “afucosilado”). Dichos anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno de estos pueden producirse usando métodos conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, se pueden expresar en células con deficiencia o que carecen de la capacidad de fucosilarse. En un ejemplo específico, las líneas celulares con una inactivación de ambos alelos de $\alpha 1,6$ -fucosiltransferasa se pueden usar para producir anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno de estos con menor contenido de fucosa. El sistema Potelligent® (Lonza) es un ejemplo de un sistema que se puede usar para producir anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno de estos con menor contenido de fucosa. De manera alternativa, los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno de estos con contenido reducido de fucosa o sin contenido de fucosa pueden producirse, por ejemplo, mediante: (i) cultivo de células en condiciones que eviten la fucosilación; (ii) eliminación postraducciona de la fucosa (por ejemplo, enzima fucosidasa); (iii) adición postraducciona del carbohidrato deseado, por ejemplo, después de la expresión recombinante de una glicoproteína no glicosilada; o (iv) purificación de la glicoproteína de manera que seleccione anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno de estos que no estén fucosilados. Véase, por ejemplo, Longmore GD & Schachter H (1982) Carbohydr Res 100: 365-92 e Imai-Nishiya H et ál., (2007) BMC Biotechnol. 7: 84 por métodos de producción de anticuerpos de estos sin contenido de fucosa o contenido reducido de fucosa. Véase además el Ejemplo 8 de la presente que describe la producción de anticuerpos de B7-H4 afucosilados.

[000189] En algunas modalidades, el anticuerpo de B7-H4 o fragmento de unión al antígeno de este tiene actividad de ADCC mejorada in vitro en comparación con anticuerpos de B7-H4 fucosilados o fragmentos de unión al antígeno de estos que tengan la misma secuencia de aminoácidos. En algunas modalidades, los anticuerpos de B7-H4 afucosilados o fragmentos de unión al antígeno de estos provocan la lisis específica que es al menos 10, al menos 15, al menos 20, al menos 25, al menos 30, al menos 35, al menos 40, al menos 45, al menos 50, al menos 60, al menos 65, al menos 70, o al menos 75 puntos de porcentaje mayor que la lisis específica con anticuerpos de B7-H4 fucosilados.

[000190] En algunas modalidades, el anticuerpo de B7-H4 o fragmento de unión al antígeno de este tiene afinidad mejorada por Fc gamma RIIIA en comparación con anticuerpos de B7-H4 fucosilados o fragmentos de unión al antígeno de estos que tengan la misma secuencia de aminoácidos. En algunas modalidades, los anticuerpos de B7-H4 afucosilados o fragmentos de unión al antígeno de

estos se unen a Fc gamma RIIIA con una afinidad al menos 2 veces, al menos 3 veces, al menos 4 veces, al menos 5 veces, al menos 7 veces, al menos 10 veces, al menos 12 veces, al menos 15 veces, al menos 17 veces, o al menos 20 mayor que la afinidad de anticuerpos de B7-H4 fucosilados o fragmentos de unión al antígeno de estos. En algunas modalidades, la afinidad por Fc gamma RIIIA se determinar mediante el uso de resonancia de plasmones superficiales. En algunas modalidades, Fc gamma RIIIA se selecciona de Fc gamma RIIIA(V158) y Fc gamma RIIIA(F158). En algunas modalidades, Fc gamma RIIIA es Fc gamma RIIIA(V158).

[000191] En algunas modalidades, la presencia de fucosa puede determinarse mediante un método que comprende cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC, por sus siglas en inglés), electroforesis capilar o espectrometría de masas MALDI-TOF.

[000192] En modalidades específicas, un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este (i) comprende las secuencia de CDR de 20502 (por ejemplo, las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO:458-463), las secuencias de VH y VL de 20502 (las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO:464 y 42, respectivamente) o las secuencias de cadena pesada y cadena ligera de 20502 (las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO:469 y 44, respectivamente) y (ii) se encuentra afucosilado.

[000193] En modalidades específicas, una composición comprende anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno de estos (i) comprende las secuencia de CDR de 20502 (por ejemplo, las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO:458-463), las secuencias de VH y VL de 20502 (las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO:464 y 42, respectivamente) o las secuencias de cadena pesada y cadena ligera de 20502 (las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO:469 y 44, respectivamente) y (ii) se encuentran afucosilados, por ejemplo, donde al menos 95 % de los anticuerpos en la composición se encuentran afucosilados o donde la fucosilación es indetectable en la composición.

[000194] En modalidades específicas, un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este (i) comprende las secuencia de CDR de 20502.1 (por ejemplo, las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO:35-40), las secuencias de VH y VL de 20502.1 (las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO:41 y 42, respectivamente) o las secuencias de cadena pesada y cadena ligera de 20502.1 (las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO:43 y 44, respectivamente) y (ii) se encuentra afucosilado.

[000195] En modalidades específicas, una composición comprende anticuerpos o fragmentos de

unión al antígeno de estos (i) comprende las secuencia de CDR de 20502.1 (por ejemplo, las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO:35-40), las secuencias de VH y VL de 20502.1 (las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO:41 y 42, respectivamente) o las secuencias de cadena pesada y cadena ligera de 20502.1 (las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO:43 y 44, respectivamente) y (ii) se encuentran afucosilados, por ejemplo, donde al menos 95 % de los anticuerpos en la composición se encuentran afucosilados o donde la fucosilación es indetectable en la composición.

[000196] En modalidades específicas, un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este (i) comprende las secuencia de CDR de 22213 (por ejemplo, las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO:65-70), las secuencias de VH y VL de 22213 (las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO:71 y 72, respectivamente) o las secuencias de cadena pesada y cadena ligera de 22213 (las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO:73 y 74, respectivamente) y (ii) se encuentra afucosilado.

[000197] En modalidades específicas, una composición comprende anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno de estos (i) comprende las secuencia de CDR de 22213 (por ejemplo, las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO:65-70), las secuencias de VH y VL de 22213 (las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO:71 y 72, respectivamente) o las secuencias de cadena pesada y cadena ligera de 22213 (las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO:73 y 74, respectivamente) y (ii) se encuentran afucosilados, por ejemplo, donde al menos 95 % de los anticuerpos en la composición se encuentran afucosilados o donde la fucosilación es indetectable en la composición.

[000198] Las glicoformas modificadas pueden ser útiles para diversos fines, incluso, de modo no taxativo, para potenciar o reducir la función efectora. Los métodos para generar glicoformas modificadas genéticamente en un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este descrito en la presente incluyen, de modo no taxativo, los descritos en, por ejemplo, Umaña P et ál., (1999) Nat Biotechnol 17: 176-180; Davies J et ál., (2001) Biotechnol Bioeng 74: 288-294; Shields RL et ál., (2002) J Biol Chem 277: 26733-26740; Shinkawa T et ál., (2003) J Biol Chem 278: 3466-3473; Niwa R et ál., (2004) Clin Cancer Res 1: 6248-6255; Presta LG et ál., (2002) Biochem Soc Trans 30: 487-490; Kanda Y et ál., (2007) Glycobiology 17: 104-118; patentes estadounidenses n.º 6,602,684; 6,946,292; y 7,214,775; publicaciones de patente estadounidense n.º US 2007/0248600; 2007/0178551; 2008/0060092; y 2006/0253928; publicaciones internacionales n.º WO 00/61739; WO 01/292246; WO 02/311140; y WO 02/30954; tecnología Potillegent™ (Biowa, Inc. Princeton, N.J.); y

tecnología de modificación de glicosilación GlycoMAb® (Glycart biotechnology AG, Zúrich, Suiza). Véase, además, por ejemplo, Ferrara C et ál., (2006) Biotechnol Bioeng 93: 851-861; publicaciones internacionales n.º WO 07/039818; WO 12/130831; WO 99/054342; WO 03/011878; y WO 04/065540.

5 [000199] En determinadas modalidades, cualquiera de las mutaciones o modificaciones de región constante descritas en la presente se puede introducir en una o ambas regiones constantes de cadena pesada de un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este descrito en la presente que tiene dos regiones constantes de cadena pesada.

10 [000200] En otra modalidad en particular, un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este descrito en la presente, que se une inmuno-específicamente a B7-H4 (por ejemplo, B7-H4 humana), comprende una cadena pesada y una cadena ligera, donde (i) la cadena pesada comprende un dominio de VH que comprende las secuencias de aminoácidos de CDR1 VH, CDR2 VL y CDR3 VL de un anticuerpo enumerado en la Tabla 1 (por ejemplo, SEQ ID NO:458-460, 35-37 o 65-67); (ii) la
15 cadena ligera comprende un dominio de VL que comprende las secuencias de aminoácidos de CDR1 VL, CDR2 VH y CDR3 VH del mismo anticuerpo enumerado en la Tabla 2 (por ejemplo, SEQ ID NO:461-463, 38-40 o 68-70); (iii); y la cadena pesada comprende además un dominio constante de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos del dominio constante de una cadena pesada de IgG1 humana (iv); la cadena ligera comprende además un dominio constante de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos del dominio constante de una cadena ligera
20 kappa humana.

[000201] En otra modalidad en particular, un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este descrito en la presente, que se une inmuno-específicamente a B7-H4 (por ejemplo, B7-H4 humana), comprende una cadena pesada y una cadena ligera, donde (i) la cadena pesada comprende un dominio de VH que comprende la secuencia de aminoácidos de un anticuerpo enumerado en la
25 Tabla 3 (por ejemplo, SEQ ID NO:464, 41 o 71); (ii) la cadena ligera comprende un dominio de VL que comprende la secuencia de aminoácidos del mismo anticuerpo enumerado en la Tabla 4 (por ejemplo, SEQ ID NO:42 o 73); (iii); y la cadena pesada comprende además un dominio constante de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos del dominio constante de una cadena pesada de IgG1 humana (iv); la cadena ligera comprende además un dominio constante de cadena
30 ligera que comprende la secuencia de aminoácidos del dominio constante de una cadena ligera kappa humana.

- [000202] En modalidades específicas, un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este descrito en la presente, que se une inmunoespecíficamente a B7-H4 (por ejemplo, B7-H4 humana) presenta actividad de bloqueo de punto de control de linfocitos T. Los ejemplos de métodos para medir la actividad de bloqueo de punto de control de linfocitos T se proporcionan en la presente en los Ejemplos 7 y 11. En modalidades específicas, un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este descrito en la presente, que se une inmunoespecíficamente a B7-H4 (por ejemplo, B7-H4 humana) aumenta la producción de interferón gamma (IFN γ) en linfocitos T. Los ejemplos de métodos para medir la producción de IFN γ se proporcionan en la presente en los Ejemplos 7 y 11. En modalidades específicas, un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este descrito en la presente, que se une inmunoespecíficamente a B7-H4 (por ejemplo, B7-H4 humana) aumenta la proliferación de linfocitos T. Los ejemplos de métodos para medir la proliferación de linfocitos T se proporcionan en la presente en el Ejemplo 7. En modalidades específicas, un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este descrito en la presente, que se une inmunoespecíficamente a B7-H4 (por ejemplo, B7-H4 humana) aumenta la proliferación de linfocitos T CD4 $^{+}$. Los ejemplos de métodos para medir la proliferación de linfocitos T CD4 $^{+}$ se proporcionan en la presente en el Ejemplo 7. En modalidades específicas, un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este descrito en la presente, que se une inmunoespecíficamente a B7-H4 (por ejemplo, B7-H4 humana) aumenta la proliferación de linfocitos T CD8 $^{+}$. Los ejemplos de métodos para medir la proliferación de linfocitos T CD8 $^{+}$ se proporcionan en la presente en el Ejemplo 7.
- [000203] En modalidades específicas, un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este descrito en la presente, que se une inmunoespecíficamente a B7-H4 (por ejemplo, B7-H4 humana) presenta actividad de citotoxicidad celular dependiente del anticuerpo (ADCC). En modalidades específicas, un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este descrito en la presente, que se une inmunoespecíficamente a B7-H4 (por ejemplo, B7-H4 humana) presenta actividad de citotoxicidad celular dependiente del anticuerpo (ADCC) en las líneas celulares con al menos 300 000 moléculas B7-H4 de la superficie celular (por ejemplo, células SK-BR-3). En modalidades específicas, un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este descrito en la presente, que se une inmunoespecíficamente a B7-H4 (por ejemplo, B7-H4 humana) presenta actividad de citotoxicidad celular dependiente del anticuerpo (ADCC) en las líneas celulares con al menos 100 000 moléculas B7-H4 de la superficie celular (por ejemplo, células HCC 1569). En modalidades específicas, un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este descrito en la presente, que se une inmunoespecíficamente a B7-H4 (por ejemplo, B7-H4 humana) presenta actividad de citotoxicidad celular dependiente del anticuerpo (ADCC) en las líneas celulares con al menos 50 000

moléculas B7-H4 de la superficie celular (por ejemplo, células ZR-75-1). En modalidades específicas, un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este descrito en la presente, que se une inmuno-específicamente a B7-H4 (por ejemplo, B7-H4 humana) presenta actividad de citotoxicidad celular dependiente del anticuerpo (ADCC) en las líneas celulares con al menos 30 000 moléculas B7-H4 de la superficie celular (por ejemplo, células MDA-MB-468). En modalidades específicas, un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este descrito en la presente, que se une inmuno-específicamente a B7-H4 (por ejemplo, B7-H4 humana) presenta actividad de citotoxicidad celular dependiente del anticuerpo (ADCC) en las líneas celulares con al menos 15 000 moléculas B7-H4 de la superficie celular (por ejemplo, células HCC1964). Los ejemplos de métodos para medir la actividad de ADCC se proporcionan en la presente en el Ejemplo 13.

[000204] En modalidades específicas, un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este descrito en la presente, que se une inmuno-específicamente a B7-H4 (por ejemplo, B7-H4 humana), comprende las regiones marco (por ejemplo, regiones marco del dominio de VH y/o dominio de VL) que son regiones marco humanas o derivadas de regiones marco humanas. Los ejemplos no taxativos de regiones marco humanas se han descrito en la técnica, por ejemplo, véase Kabat EA et ál., (1991) supra). En determinadas modalidades, un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este descrito en la presente comprende regiones marco (por ejemplo, regiones marco del dominio de VH y/o dominio de VL) que son regiones marco de primate (por ejemplo, primate no humano) o derivadas de regiones marco de primate (por ejemplo, primate no humano).

[000205] En determinadas modalidades, un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este descrito en la presente, que se une específicamente a B7-H4 (por ejemplo, B7-H4 humana) comprende una, dos o más regiones marco (FR) de VH que tienen las secuencias de aminoácidos descritas en la presente para un anticuerpo establecido en la Tabla 5, supra (por ejemplo, SEQ ID NO: 465, 466, 467 y/o 469; SEQ ID NO:235, 236, 237 y/o 238; o SEQ ID NO:265, 266, 267 y/o 268). En algunas modalidades, un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este descrito en la presente, que se une específicamente a B7-H4 (por ejemplo, B7-H4 humana) comprende una, dos o más regiones marco (FR) de VL que tienen las secuencias de aminoácidos descritas en la presente para un anticuerpo establecido en la Tabla 6, supra (por ejemplo, SEQ ID NO:239, 240, 241 y/o 242 o SEQ ID NO:269, 270, 271 y/o 272). En modalidades específicas, un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este descrito en la presente, que se une específicamente a B7-H4 (por ejemplo, B7-H4 humana) comprende una, dos o más regiones marco de VH que tienen las secuencias de aminoácidos descritas en la presente para el anticuerpo establecido en la Tabla5, supra, y una, dos o más regiones marco de VL que tienen las secuencias de aminoácidos descritas en la presente para

el mismo anticuerpo establecido en la Tabla 6, supra (por ejemplo, (i) SEQ ID NO: 465, 466, 467, y/o 469 y SEQ ID NO:239, 240, 241 y/o 242; (ii) SEQ ID NO:235, 236, 237 y/o 238 y SEQ ID NO:239, 240, 241 y/o 242 o (iii) SEQ ID NO:265, 266, 267, y/o 268 y SEQ ID NO:269, 270, 271, y/o 272).

[000206] En determinadas modalidades, un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este descrito en la presente, que se une específicamente a B7-H4 (por ejemplo, B7-H4 humana), comprende regiones marco (FR) de VH que tienen al menos 70 %, al menos 75%, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 % o al menos 98 % de identidad de secuencia con las regiones marco de VH descritas en la presente en la Tabla 5, supra. En determinadas modalidades, un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este descrito en la presente, que se une específicamente a B7-H4 (por ejemplo, B7-H4 humana), comprende regiones marco (FR) de VL que tienen al menos 70 %, al menos 75%, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 % o al menos 98 % de identidad de secuencia con las regiones marco de VL descritas en la presente en la Tabla 6, supra. En algunas modalidades, un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este descrito en la presente, que se une específicamente a B7-H4 (por ejemplo, B7-H4 humana), comprende regiones marco (FR) de VH que tienen al menos 70 %, al menos 75%, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 % o al menos 98 % de identidad de secuencia con las regiones marco de VH descritas en la presente en la Tabla 5, supra y regiones marco (FR) de VL que tienen al menos 70 %, al menos 75%, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 % o al menos 98 % de identidad de secuencia con las regiones marco de VL descritas en la presente en la Tabla 6, supra.

[000207] En determinadas modalidades, un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este descrito en la presente, que se une inmuno-específicamente a B7-H4 (por ejemplo, B7-H4 humana), comprende un dominio de VH que tienen al menos 70 %, al menos 75%, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 % o al menos 98 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos del dominio de VH de 20502 o 22213 (por ejemplo, SEQ ID NO:464 o 71), donde el anticuerpo comprende CDR VH que son idénticas a las CDR VH de 20502 o 22213 (por ejemplo, SEQ ID NO:458-460 o 65-67).

[000208] En determinadas modalidades, un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este descrito en la presente, que se une inmuno-específicamente a B7-H4 (por ejemplo, B7-H4 humana), comprende un dominio de VL que tienen al menos 70 %, al menos 75%, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 % o al menos 98 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos del dominio de VL de 20502 o 22213 (por ejemplo, SEQ ID NO:42 o 72), donde el

anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este comprende CDR VL que son idénticas a las CDR VL de 20502 o 22213 (por ejemplo, SEQ ID NO:461-463 o 68-70).

5 [000209] En determinadas modalidades, un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este descrito en la presente, que se une inmuno-específicamente a B7-H4 (por ejemplo, B7-H4 humana), comprende: (i) un dominio de VH que tiene al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95%, o al menos 98 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos del dominio de VH de 20502 o 22213 (por ejemplo, SEQ ID NO:464 o 71),; y (ii) un dominio de VL que tiene al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, o al menos 98 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos del dominio de VL de 20502 o 22213 (por ejemplo, SEQ ID NO:42 o 72), donde el anticuerpo comprende CDR VH y CDR VL que son idénticas a las CDR VH y CDR VL de 20502 o 22213 (por ejemplo, SEQ ID NO:458-463 o SEQ ID NO:65-70).

15 [000210] En otro aspecto, se proporcionan en la presente anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno de estos que se unen al mismo epítipo de B7-H4 (por ejemplo, un epítipo de B7-H4 humana) que un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este descrito en la presente (por ejemplo 20502 o 22213).

20 [000211] En determinadas modalidades, un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este descrito en la presente, que se une inmuno-específicamente a B7-H4 (por ejemplo, B7-H4 humana), comprende un dominio de VH que tienen al menos 70 %, al menos 75%, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 % o al menos 98 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos del dominio de VH de 20502.1 o 22213 (por ejemplo, SEQ ID NO:41 o 71), donde el anticuerpo comprende CDR VH que son idénticas a las CDR VH de 20502.1 o 22213 (por ejemplo, SEQ ID NO: 35-37 o 65-67).

25 [000212] En determinadas modalidades, un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este descrito en la presente, que se une inmuno-específicamente a B7-H4 (por ejemplo, B7-H4 humana), comprende un dominio de VL que tienen al menos 70 %, al menos 75%, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 % o al menos 98 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos del dominio de VL de 20502.1 o 22213 (por ejemplo, SEQ ID NO:42 o 72), donde el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este comprende CDR VL que son idénticas a las CDR VL de 20502.1 o 22213 (por ejemplo, SEQ ID NO:38-40 o 68-70).

30 [000213] En determinadas modalidades, un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este

descrito en la presente, que se une inmuno-específicamente a B7-H4 (por ejemplo, B7-H4 humana), comprende: (i) un dominio de VH que tiene al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95%, o al menos 98 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos del dominio de VH de 20502.1 o 22213 (por ejemplo, SEQ ID NO:41 o 71),; y (ii) un dominio de VL que tiene al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, o al menos 98 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos del dominio de VL de 20502.1 o 22213 (por ejemplo, SEQ ID NO:42 o 72), donde el anticuerpo comprende CDR VH y CDR VL que son idénticas a las CDR VH y CDR VL de 20502.1 o 22213 (por ejemplo, SEQ ID NO:35-40 o SEQ ID NO:65-70).

[000214] En otro aspecto, se proporcionan en la presente anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno de estos que se unen al mismo epítipo de B7-H4 (por ejemplo, un epítipo de B7-H4 humana) que un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este descrito en la presente (por ejemplo 20502.1 o 22213).

[000215] Pueden utilizarse ensayos de unión de competición para determinar si dos anticuerpos se unen a epítopos superpuestos. La unión competitiva se puede determinar en un ensayo donde la inmunoglobulina que se está analizando inhibe la unión específica de un anticuerpo de referencia a un antígeno común, tal como B7-H4. Se conocen varios tipos de ensayos de unión competitivos, por ejemplo: radioinmunoensayo (RIA) directo o indirecto de fase sólida, inmunoensayo de enzima (EIA) directo o indirecto de fase sólida, ensayo de competición sándwich (véase Stahli C et ál., (1983) Methods Enzymol 9: 242-253); EIA biotina-avidina directo de fase sólida (véase Kirkland TN et ál., (1986) J Immunol 137: 3614-9); ensayo etiquetado directo de fase sólida, ensayo sándwich etiquetado directo de fase sólida (véase Harlow E & Lane D, (1988) Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press); RIA de etiqueta directa de fase sólida usando etiqueta I-125 (véase Morel GA et ál., (1988) Mol Immunol 25(1): 7-15); EIA biotina-avidina directo de fase sólida (véase Cheung RC et ál., (1990) Virology 176: 546-52); y RIA etiquetado directo. (Moldenhauer G et ál., (1990) Scand J Immunol 32: 77-82). Típicamente, dicho ensayo implica el uso de antígeno purificado (por ejemplo, B7-H4, tal como B7-H4 humana) unido a una superficie sólida o células que tienen cualquiera de estos, una inmunoglobulina de prueba no etiquetada y una inmunoglobulina de referencia etiquetada. La inhibición competitiva se puede medir mediante la determinación de la cantidad de etiqueta unida a la superficie sólida o las células en presencia de la inmunoglobulina de prueba. Generalmente la inmunoglobulina de prueba está presente en exceso. Generalmente, cuando un anticuerpo competitivo está presente en exceso, inhibirá la unión específica de un anticuerpo de referencia a un antígeno común en al menos 50-55 %, 55-60 %, 60-65 %, 65-70 % 70-

- 75 % o más. Se puede configurar un ensayo de unión de competición en una gran cantidad de formatos distintos usando antígeno etiquetado o anticuerpo etiquetado. En una versión común de este ensayo, el antígeno se inmoviliza en una placa de 96 pocillos. Después, la capacidad de los anticuerpos no etiquetados de bloquear la unión de los anticuerpos etiquetados al antígeno se mide usando etiquetas radioactivas o enzimáticas. Por más detalles, véase, por ejemplo, Wagener C et ál., (1983) J Immunol 130: 2308-2315; Wagener C et ál., (1984) J Immunol Methods 68: 269-274; Kuroki M et ál., (1990) Cancer Res 50: 4872-4879; Kuroki M et ál., (1992) Immunol Invest 21: 523-538; Kuroki M et ál., (1992) Hybridoma 11: 391-407 y Antibodies: A Laboratory Manual, Ed Harlow E & Lane D editores supra, pp. 386-389.
- 5 [000216] En una modalidad, un ensayo de competición se realiza mediante el uso de resonancia de plasmones superficiales (BIAcore®), por ejemplo, mediante el abordaje “en tándem” como se describe en Abdiche YN et ál., (2009) Analytical Biochem 386: 172-180, donde el antígeno de B7-H4 se inmoviliza en la superficie del chip, por ejemplo, un chip sensor CM5, y los anticuerpos anti-B7-H4 se hacen pasar entonces sobre el chip. Para determinar si un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este compite con un anticuerpo de B7-H4 descrito en la presente, el anticuerpo anti-B7-H4 se hace pasar primero sobre la superficie del chip para lograr saturación y, después, el anticuerpo competidor potencial se agrega. La unión del anticuerpo competidor o fragmento de unión al antígeno de este puede determinarse entonces y cuantificarse en relación con un control no competitivo.
- 10 [000217] En una modalidad, se utiliza la unión de competición Fortebio Octet (como se describe en el Ejemplo 2 más adelante) para determinar que un anticuerpo de B7-H4 o fragmento de unión al antígeno de este inhibe de forma competitiva la unión de otro anticuerpo de B7-H4 o fragmento de unión al antígeno de este a B7-H4.
- 15 [000218] En otro aspecto, se proporcionan en la presente anticuerpos que inhiben de forma competitiva (por ejemplo, de una manera dependiente de la dosis) la unión de un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este descrito en la presente (por ejemplo, 20502, 20502.1 o 22213) con B7-H4 (por ejemplo, B7-H4 humana), según se determina mediante el uso de ensayos conocidos para un experto en la técnica o descrito en la presente (por ejemplo, ensayos competitivos de ELISA, o ensayo de resonancia de plasmones superficiales o matriz de suspensión).
- 20 [000219] En aspectos específicos, se proporciona en la presente un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este que inhibe de forma competitiva (por ejemplo, de una manera dependiente de la
- 25
- 30

dosis) la unión a B7-H4 (por ejemplo, B7-H4 humana) de un anticuerpo que comprende un dominio de VH que tiene la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO:464, y un dominio de VL que tiene la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO:42.

5 [000220] En aspectos específicos, se proporciona en la presente un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este que inhibe de forma competitiva (por ejemplo, de una manera dependiente de la dosis) la unión a B7-H4 (por ejemplo, B7-H4 humana) de un anticuerpo que comprende un dominio de VH que tiene la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO:41, y un dominio de VL que tiene la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO:42.

10 [000221] En aspectos específicos, se proporciona en la presente un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este que inhibe de forma competitiva (por ejemplo, de una manera dependiente de la dosis) la unión a B7-H4 (por ejemplo, B7-H4 humana) de un anticuerpo que comprende un dominio de VH que tiene la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO:71, y un dominio de VL que tiene la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO:72.

15 [000222] En aspectos específicos, se proporciona en la presente un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este que inhibe de forma competitiva (por ejemplo, en una manera dependiente de la dosis) la unión a B7-H4 (por ejemplo, B7-H4 humana) de un anticuerpo que comprende (i) un dominio de VH que comprende una CDR1 VH, CDR2 VH y CDR3 VH que tiene las secuencias de aminoácidos de las CDR VH enumeradas en la Tabla 1; y (ii) un dominio de VL que comprende una CDR1 VL, CDR2 VL y CDR3 VL que tiene las secuencias de aminoácidos de las CDR enumeradas en la Tabla 2.

20 [000223] En aspectos específicos, se proporciona en la presente un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este que se une inmuno-específicamente al mismo epítipo de B7-H4 (por ejemplo, B7-H4 humana) que 20502, 20502.1 o 22213.

25 [000224] En otra modalidad específica, un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este descrito en la presente se une inmuno-específicamente al mismo epítipo de B7-H4 (por ejemplo, B7-H4 humana) que un anticuerpo que comprende (i) un dominio de VH que comprende una CDR1 VH, CDR2 VH y CDR3 VH que tiene las secuencias de aminoácidos de las CDR enumeradas en la Tabla 1; y (ii) un dominio de VL que comprende una CDR1 VL, CDR2 VL y CDR3 VL que tiene las secuencias de aminoácidos de las CDR enumeradas en la Tabla 2.

30 [000225] En un aspecto específico, un fragmento de unión al antígeno tal como se describe en la

presente, que se une inmunoespecíficamente a B7-H4 (por ejemplo, B7-H4 humana), se selecciona del grupo que consiste en Fab, Fab', F(ab')₂ y scFv, donde el Fab, Fab', F(ab')₂ o scFv comprende una secuencia de región variable de cadena pesada y una secuencia de región variable de cadena ligera de un anticuerpo anti-B7-H4 o fragmento de unión al antígeno de este tal como se describe en la presente. Un Fab, Fab', F(ab')₂ o scFv se puede producir mediante cualquier técnica conocida para los expertos en la técnica, incluso, de modo no taxativo, los que se discuten en la Sección 5.3, infra. En determinadas modalidades, Fab, Fab', F(ab')₂ o scFv comprende además un resto que extiende la semivida del anticuerpo in vivo. El resto también se denomina "resto que extiende la semivida". Se puede utilizar cualquier resto conocido para los expertos en la técnica para extender la semivida in vivo de un Fab, Fab', F(ab')₂ o scFv. Por ejemplo, el resto que extiende la semivida puede incluir una región Fc, un polímero, una albúmina o un compuesto o proteína de unión a albúmina. El polímero puede incluir un polialquileno, polialquilenilo, polioxilalquileno, polisacárido, polietilenglicol, polipropilenglicol, alcohol polivinílico, metoxipolietilenglicol, lactosa, amilosa, dextrano, glicógeno o derivado de estos natural o sintético, sustituido opcionalmente de cadena recta o ramificada. Los sustituyentes pueden incluir uno o más grupos hidroxilo, metilo o metoxi. En determinadas modalidades, Fab, Fab', F(ab')₂ o scFv se pueden modificar mediante la adición de uno o más aminoácidos del extremo C para unirse al resto que extiende la semivida. En determinadas modalidades, el resto que extiende la semivida es polietilenglicol o albúmina sérica humana. En determinadas modalidades, el Fab, Fab', F(ab')₂ o scFv se fusiona a una región Fc.

[000226] Un anticuerpo anti-B7-H4 o fragmento de unión al antígeno de este puede fusionarse o conjugarse (por ejemplo, unirse de forma covalente o no covalente) a una sustancia o etiqueta detectable. Los ejemplos de sustancias o etiquetas detectables incluyen las etiquetas de enzima, tales como oxidasa de glucosa, radioisótopos, tales como yoduro (¹²⁵I, ¹²¹I), carbono (¹⁴C), azufre (³⁵S), tritio (³H), indio (¹²¹In) y tecnecio (⁹⁹Tc); etiquetas luminiscentes, tales como luminol, y etiquetas fluorescentes, tales como fluoresceína y rodamina, y biotina. Dichos anticuerpos marcados o fragmentos de unión al antígeno de estos pueden utilizarse para detectar la proteína B7-H4 (por ejemplo, B7-H4 humana). Véase, por ejemplo, la Sección 5.5.2, infra.

[000227] Producción de anticuerpos

[000228] Los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno de estos que se unen inmunoespecíficamente a B7-H4 (por ejemplo, B7-H4 humana) se pueden producir mediante cualquier método conocido en la técnica para la síntesis de anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno de estos, por ejemplo, mediante síntesis química o mediante técnicas de expresión

recombinante. Los métodos descritos en la presente emplean, a menos que se indique lo contrario, técnicas convencionales en biología molecular, microbiología, análisis genético, ADN recombinante, química orgánica, bioquímica, PCR, síntesis y modificación de oligonucleótidos, hibridación de ácido nucleico y ámbitos relacionados dentro del conocimiento de la técnica. Estas técnicas se describen, por ejemplo, en las referencias mencionadas en la presente y se explican en profundidad en la bibliografía. Véase, por ejemplo, Sambrook J et ál., (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY; Ausubel FM et ál., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons (1987 y actualizaciones anuales); *Current Protocols in Immunology*, John Wiley & Sons (1987 y actualizaciones anuales) Gait (ed.) (1984) *Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach*, IRL Press; Eckstein (ed.) (1991) *Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach*, IRL Press; Birren B et ál., (eds.) (1999) *Genome Analysis: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press.

[000229] En un determinado aspecto, en la presente se proporciona un método para producir un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este que se une de forma específica a B7-H4 (por ejemplo, B7-H4 humana) que comprende cultivar una célula o célula hospedadora descrita en la presente. En un aspecto determinado, en la presente se proporciona un método para producir un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este que se une inmuno-específicamente a B7-H4 (por ejemplo, B7-H4 humana) que comprende expresar (por ejemplo, expresar de forma recombinante) el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este mediante el uso de una célula o célula hospedadora descrita en la presente (por ejemplo, una célula o célula hospedadora que comprende polinucleótidos que codifican un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este descrito en la presente). En una modalidad particular, la célula es una célula aislada. En una modalidad particular, los polinucleótidos exógenos se han introducido en la célula. En una modalidad particular, el método comprende además la etapa de purificar el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este obtenido a partir de la célula o célula hospedadora.

[000230] Los métodos para producir anticuerpos policlonales son conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Capítulo 11 en: *Short Protocols in Molecular Biology*, (2002) 5a Ed., Ausubel FM et ál., eds., John Wiley and Sons, Nueva York).

[000231] Los anticuerpos monoclonales o fragmentos de unión al antígeno de estos se pueden preparar utilizando una amplia variedad de técnicas conocidas en la práctica incluyendo el uso de tecnologías de hibridoma, recombinantes y de expresión de fagos, tecnologías de expresión basadas en levadura o una combinación de estos. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales o fragmentos

de unión al antígeno de estos se pueden producir utilizando métodos de hibridoma, que incluyen aquellos conocidos en la técnica y descritos, por ejemplo, en Harlow E & Lane D, *Antibodies: A Laboratory Manual*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2.^a ed. 1988); Hammerling GJ et ál., in: *Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas* 563 681 (Elsevier, N.Y., 1981), o como se describe en Kohler G & Milstein C (1975) *Nature* 256: 495. Los ejemplos de métodos de expresión basados en levadura que pueden emplearse para seleccionar y generar los anticuerpos descritos en la presente incluyen, por ejemplo, los descritos en WO2009/036379A2; WO2010/105256; y WO2012/009568, cada uno de los cuales se incorpora a la presente mediante esta referencia en su totalidad.

[000232] En modalidades específicas, un anticuerpo monoclonal o fragmento de unión al antígeno es un anticuerpo monoclonal o fragmento de unión al antígeno producido mediante una célula clonal (por ejemplo, hibridoma o célula hospedadora que produce un anticuerpo recombinante o fragmento de unión al antígeno), donde el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno se une inmuno-específicamente a B7-H4 (por ejemplo, B7-H4 humana) según se determina, por ejemplo, mediante ELISA u otros ensayos de unión al antígeno conocidos en la técnica o en los Ejemplos que se proporcionan en la presente. En modalidades en particular, un anticuerpo monoclonal o fragmento de unión al antígeno de este puede ser un anticuerpo quimérico o humanizado, o un fragmento de unión al antígeno de este. En determinadas modalidades, un anticuerpo monoclonal o fragmento de unión al antígeno de este puede ser un fragmento Fab o un fragmento F(ab')₂. Los anticuerpos monoclonales o fragmentos de unión al antígeno de estos descritos en la presente, por ejemplo, pueden producirse mediante el método de hibridoma, como se describe en Kohler G & Milstein C (1975) *Nature* 256: 495, o, por ejemplo, pueden aislarse a partir de bibliotecas de fagos mediante el uso de las técnicas que se describen en la presente, por ejemplo. Otros métodos para la preparación de líneas celulares clonales y de anticuerpos monoclonales y fragmentos de unión al antígeno de estos expresados mediante estas son conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, el Capítulo 11 en: *Short Protocols in Molecular Biology*, (2002) 5a Ed., Ausubel FM et ál., supra).

[000233] Los fragmentos de unión al antígeno de anticuerpos descritos en la presente pueden generarse mediante cualquier procedimiento conocido para los expertos en la técnica. Por ejemplo, los fragmentos Fab y F(ab')₂ descritos en la presente se pueden producir mediante escisión proteolítica de moléculas de inmunoglobulina, utilizando enzimas, tal como papaína (para producir fragmentos Fab) o pepsina (para producir fragmentos F(ab')₂). Un fragmento Fab corresponde a uno de los dos brazos idénticos de una molécula de anticuerpo tetramérico y contiene la cadena ligera completa emparejada con los dominios VH y CH1 de la cadena pesada. Un fragmento F(ab')₂ contiene los dos brazos de unión al antígeno de una molécula de anticuerpo tetramérico unida

mediante enlaces disulfuro en la región bisagra.

[000234] Además, los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno de estos descritos en la presente también se pueden generar mediante el uso de varios métodos de expresión de fagos y/o de expresión basada en levadura conocidos en la técnica. En los procedimientos de expresión de fagos, las proteínas se expresan en la superficie de partículas de fagos que portan las secuencias de polinucleótidos que las codifican. En particular, las secuencias de ADN que codifican los dominios VH y VL se amplifican a partir de bibliotecas de ADNc de animales (por ejemplo, bibliotecas de ADNc humano o murino de tejidos afectados). El ADN que codifica los dominios VH y VL se recombina junto con un enlazador scFv mediante PCR y se clona en un vector fagémido. El vector se electropora en *E. coli* y el *E. coli* se infecta con un fago auxiliar. El fago utilizado en estos métodos es comúnmente un fago filamentoso que incluye fd y M13 y los dominios VH y VL usualmente se fusionan recombinantemente con el gen III o gen VIII del fago. El fago que expresa un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este que se une al antígeno particular se puede seleccionar o identificar con un antígeno, por ejemplo, utilizando un antígeno etiquetado o antígeno unido o capturado a una superficie sólida o una perla. Los ejemplos de métodos de visualización de fagos que se pueden usar para producir los anticuerpos o fragmentos descritos en la presente incluyen los descritos en Brinkman U et ál., (1995) *J Immunol Methods* 182: 41-50; Ames RS et ál., (1995) *J Immunol Methods* 184: 177-186; Kettleborough CA et ál., (1994) *Eur J Immunol* 24: 952-958; Persic L et ál., (1997) *Gene* 187: 9-18; Burton DR & Barbas CF (1994) *Advan Immunol* 57: 191-280; solicitud PCT n.º PCT/GB91/001134; publicación internacional n.º WO 90/02809, WO 91/10737, WO 92/01047, WO 92/18619, WO 93/1 1236, WO 95/15982, WO 95/20401 y WO 97/13844; y las patentes estadounidenses n.º 5,698,426, 5,223,409, 5,403,484, 5,580,717, 5,427,908, 5,750,753, 5,821,047, 5,571,698, 5,427,908, 5,516,637, 5,780,225, 5,658,727, 5,733,743 y 5,969,108.

[000235] Un anticuerpo humanizado o fragmento de unión al antígeno de este se puede seleccionar a partir de cualquier clase de inmunoglobulinas, incluso IgM, IgG, IgD, IgA e IgE, y cualquier isotipo, incluso IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4.

1.2.1 Polinucleótidos

[000236] En determinados aspectos, se proporcionan en la presente polinucleótidos que comprenden una secuencia de nucleótidos que codifican un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este descrito en la presente o un dominio de este (por ejemplo, región variable de cadena ligera y/o región variable de cadena pesada) que se une inmuno-específicamente a un antígeno de B7-H4 (por

ejemplo, B7-H4 humana), y vectores, por ejemplo, vectores que comprenden dichos polinucleótidos para la expresión recombinante en células hospedadoras (por ejemplo, células de mamífero y *E. coli*).

[000237] En aspectos particulares, se proporcionan en la presente polinucleótidos que comprenden 5 secuencias de nucleótidos que codifican anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno de estos, que se unen inmuno-específicamente a un polinucleótido B7-H4 (por ejemplo, B7-H4 humana) y comprende una secuencia de aminoácidos tal como se describe en la presente, así como anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno que compiten con dichos anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno para unirse a un polipéptido B7-H4 (por ejemplo, de una manera dependiente de la dosis), o 10 que se unen al mismo epítipo que dichos anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno.

[000238] También se proporciona en la presente un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que comprende una secuencia que se selecciona del grupo que consiste en las SEQ ID NO:11, 12, 21, 22, 31, 32, 41, 464, 42, 51, 52, 61, 62, 71, 72, 81, 82, 91, 92, 101, 102, 111, 112, 121, 122, 131, 132, 141, 142, 151, 152, 161, 162, 171, 172, 181, 182, 191, 15 192, 201 y 202. En algunas modalidades, un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este comprende el polipéptido que se une inmuno-específicamente a B7-H4.

[000239] También se proporciona en la presente un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que comprende una secuencia que se selecciona del grupo que consiste en las SEQ ID NO:13, 14, 23, 24, 33, 34, 43, 469, 44, 53, 54, 63, 64, 73, 74, 83, 84, 93, 20 94, 103, 104, 113, 114, 123, 124, 133, 134, 143, 144, 153, 154, 163, 164, 173, 174, 183, 184, 193, 194, 203 y 204. En algunas modalidades, un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este comprende el polipéptido que se une inmuno-específicamente a B7-H4.

[000240] También se proporcionan en la presente polinucleótidos que comprenden una secuencia de nucleótidos que codifica una cadena pesada variable que se muestra en la Tabla 9, por ejemplo, 25 donde un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este que comprende la cadena pesada variable codificada se une a B7-H4.

Tabla 9: Secuencias de polinucleótidos que codifica la cadena pesada variable

Anticuerpo	Secuencia de polinucleótidos que codifica la cadena pesada variable (SEQ ID NO)
------------	---

15461	CAGCTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCCAGGACTGGTGAAGCCTT CGGAGACCCTGTCCCTCACCTGCACTGTCTCTGGTGGCTCCATC AGCAGTAGTAGTTACTACTGGGGCTGGATCCGCCAGCCCCCAGG GAAGGGGCTGGAGTGGATTGGGAACATCTATTATAGTGGGAGCA CCTACTACAACCCGTCCCTCAAGAGTCGAGTCACCATATCCGTAG ACACGTCCAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGTTCTGTGACC GCCGCAGACACGGCGGTGTACTACTGCGCCAGAGAAGGATCTTA CCCCAATTGGTTTGATCCATGGGGACAGGGTACATTGGTCACCG TCTCCTCA (SEQ ID NO:213)
20500	CAGCTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCCAGGACTGGTGAAGCCTT CGGAGACCCTGTCCCTCACCTGCACTGTCTCTGGTGGCTCCATC AAGAGTGGTAGTCACTACTGGGGCTGGATCCGCCAGCCCCCAG GGAAGGGGCTGGAGTGGATTGGGAACATCTATTATAGTGGGAGC ACCTACTACAACCCGTCCCTCAGGAGTCGAGTCACCATATCCGTA GACACGTCCAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGTTCTGTGAC CGCCGCAGACACGGCGGTGTACTACTGCGCCAGGGAAGGATCT TACCCCAATTGGTTTGATCCATGGGGACAGGGTACATTGGTCACC GTCTCCTCA (SEQ ID NO:223)
20501	CAGCTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCCAGGACTGGTGAAGCCTT CGGAGACCCTGTCCCTCACCTGCACTGTCTCTGGTGGCTCCATC AAGAGTGGTAGTCACTACTGGGGCTGGATCCGCCAGCCCCCAG GGAAGGGGCTGGAGTGGATTGGGAACATCTATTATAGTGGGAGC ACCTACTACAACCCGTCCCTCAAGAGTCGAGTCACCATATCCGTA GACACGTCCAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGTTCTGTGAC CGCCGCAGACACGGCGGTGTACTACTGCGCCAGAGAAGGATCTT ACCCCAATTGGTTGGATCCATGGGGACAGGGTACATTGGTCACC GTCTCCTCA (SEQ ID NO:233)
20502	CAGCTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCCAGGACTGGTGAAGCCTT CGGAGACCCTGTCCCTCACCTGCACTGTCTCTGGTGGCTCCATC AAAAGTGGTAGTTACTACTGGGGCTGGATCCGCCAGCCCCCAGG GAAGGGGCTGGAGTGGATTGGGAACATCTATTATAGTGGGAGCA

	CCTACTACAACCCGTCCCTCAGAAGTCGAGTCACCATATCCGTAG ACACGTCCAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGTTCTGTGACC GCCGCAGACACGGCGGTGTACTACTGCGCCAGAGAAGGATCTTA CCCCAATCAGTTTGATCCATGGGGACAGGGTACATTGGTCACCG TCTCCTCA (SEQ ID NO:470)
20502.1	CAGCTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCCAGGACTGGTGAAGCCTT CGGAGACCCTGTCCCTCACCTGCACTGTCTCTGGTGGCTCCATC AAGAGTGGTAGTTACTACTGGGGCTGGATCCGCCAGCCCCCAGG GAAGGGGCTGGAGTGGATTGGGAACATCTATTATAGTGGGAGCA CCTACTACAACCCGTCCCTCAAGAGTCGAGTCACCATATCCGTAG ACACGTCCAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGTTCTGTGACC GCCGCAGACACGGCGGTGTACTACTGCGCCAGAGAAGGATCTTA CCCCAATCAGTTTGATCCATGGGGACAGGGTATATTGGTCACCGT CTCCTCA (SEQ ID NO:243)
22208	CAGCTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCCAGGACTGGTGAAGCCTT CGGAGACCCTGTCCCTCACCTGCACTGTCTCTGGTGGCTCCATC AAGAGTGGTAGTCACTACTGGGGCTGGATCCGCCAGCCCCCAG GGAAGGGGCTGGAGTGGATTGGGAACATCTATTATAGTGGGAGC ACCTACTACAACCCGTCCCTCAAGAGTCGAGTCACCATGTCCGTA GACACGTCCAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGTTCTGTGAC CGCCGCAGACACGGCGGTGTACTACTGCGCCAGAGAAGGATCTT ACCCAATTGGTTTGATCCATGGGGACAGGGTACATTGGTCACC GTCTCCTCA (SEQ ID NO:253)
15462	CAGCTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCCAGGACTGGTGAAGCCTT CGGAGACCCTGTCCCTCACCTGCACTGTCTCTGGTGGCTCCATC AGCAGTAGTAGTTACTACTGGGGCTGGATCCGCCAGCCCCCAGG GAAGGGGCTGGAGTGGATTGGGAACATCTATTATAGTGGGAGCA CCTACTACAACCCGTCCCTCAAGAGTCGAGTCACCATATCCGTAG ACACGTCCAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGTTCTGTGACC GCCGCAGACACGGCGGTGTACTACTGCGCCAGAGAAGGATCTTA CACAACCGTGTTAAACGTATGGGGTCAGGGTACAATGGTCACCG TCTCCTCA (SEQ ID NO:263)

22213	CAGCTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCCAGGACTGGTGAAGCCTT CGGAGACCCTGTCCCTCACCTGCACTGTCTCTGGTGGCTCCATC GGGAGGGGGAGTTACTACTGGGGCTGGATCCGCCAGCCCCCAG GGAAGGGGCTGGAGTGGATTGGGAACATCTATTATAGTGGGAGC ACCTACTACAACCCGTCCCTCAAGAGTCGAGTCACCATATCCGTA GACACGTCCAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGTTCTGTGAC CGCCGCAGACACGGCGGTGTACTACTGCGCCAGAGAAGGATCTT ACACAACCGTGTTAAACGTATGGGGTCAGGGTACAATGGTCACC GTCTCCTCA (SEQ ID NO:273)
15465	CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCCAGGACTGGTGAAGCCTT CACAGACCCTGTCCCTCACCTGTACTGTCTCTGGTGGCTCCATCA GCAGTGGTGGTTACTACTGGAGCTGGATCCGCCAGCACCCAGG GAAGGGCCTGGAGTGGATTGGGAACATCTATTACAGTGGGAGCA CCTACTACAACCCGTCCCTCAAGAGTCGAGTTACCATATCAGTAG ACACGTCTAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGTTCTGTGACCG CCGCAGACACGGCGGTGTACTACTGCGCCAGAGAATCTAGCACC ATATCTGCCGACTTCGACCTATGGGGGAGAGGTACCTTGGTCAC CGTCTCCTCA (SEQ ID NO:283)
20506	CAGCTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCCAGGACTGGTGAAGCCTT CGGAGACCCTGTCCCTCACCTGTACTGCCTCTGGTGGCTCCATC AGCCATGGTGGGTACTACTGGAGCTGGATCCGCCAGCACCCAG GGAAGGGCCTGGAGTGGATTGGGAACATCTATTACAGTGGGAGC ACCTACTACAATCCGTCCCTCAAGAGTCGAGTTACCATGTCAGTA GACACGTCTAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGTTCTGTGACC GCCGCAGACACGGCGGTGTACTACTGCGCCAGAGAATCTAGCAC CATATCTGCCGACTTCGACCTATGGGGGAGAGGTACCTTGGTCA CCGTCTCCTCA (SEQ ID NO:293)
15483	CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCCAGGACTGGTGAAGCCTT CACAGACCCTGTCCCTCACCTGTACTGTCTCTGGTGGCTCCATCA GCAGTGGTGGTTACTACTGGAGCTGGATCCGCCAGCACCCAGG GAAGGGCCTGGAGTGGATTGGGAACATCTATTACAGTGGGAGCA

	CCTACTACAACCCGTCCCTCAAGAGTCGAGTTACCATATCAGTAG ACACGTCTAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGTTCTGTGACCG CCGCAGACACGGCGGTGTACTACTGCGCCAGAGGGTTGAGCAC CATAGACGAGGCATTTCGACCCATGGGGACAGGGTACATTGGTCA CCGTCTCCTCA (SEQ ID NO:303)
20513	CAGCTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCCAGGACTGGTGAAGCCTT CGGAGACCCTGTCCCTCACCTGCACTGTCTCTGGTGGCTCCATC AGCGATGGTAGTTACTACTGGAGCTGGATCCGCCAGCACCCAGG GAAGGGCCTGGAGTGGATTGGGAACATCTATTACAGTGGGAGCA CCTACTACAACCCGTCCCTCAGGAGTCGAGTTACCATGTCAGTAG ACACGTCTAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGTTCTGTGACCG CCGCAGACACGGCGGTGTACTACTGCGCCAGAGGGTTGAGCAC CATAGACGAGGCATTTCGACCCATGGGGACAGGGTACATTGGTCA CCGTCTCCTCA (SEQ ID NO:313)
22216	CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCCAGGACTGGTGAAGCCTT CACAGACCCTGTCCCTCACCTGTACTGTCTCTGGTGGCTCCATCA GCGATGGTAGTTACTACTGGAGCTGGATCCGCCAGCACCCAGGG AAGGGCCTGGAGTGGATTGGGAACATCTATTACAGTGGGAGCAC CTACTACAACCCGTCCCTCAGGAGTCGAGTTACCATGTCAGTAGA CACGTCTAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGTTCTGTGACCGC CGCAGACACGGCGGTGTACTACTGCGCCAGAGGGTTGAGCACC ATAGACGAGGCATTTCGACCCATGGGGACAGGGTACATTGGTCAC CGTCTCCTCA (SEQ ID NO:323)
15489	CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCCAGGACTGGTGAAGCCTT CGGAGACCCTGTCCCTCACCTGCACTGTCTCTGGTGGCTCCATC AGTAGTTACTACTGGAGCTGGATCCGGCAGCCCCCAGGGAAGG GACTGGAGTGGATTGGGTATATCTATAGTAGTGGGAGCACCAAC TACAACCCCTCCCTCAAGAGTCGAGTCACCATATCAGTAGACACG TCCAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGTTCTGTGACCGCCGC AGACACGGCGGTGTACTACTGCGCCAGAGGCTCTGGACAGTATG CAGCTCCTGATTATGGAATGGACGTATGGGGCCAGGGAACAAC GTCACCGTCTCCTCA (SEQ ID NO:333)

20516	CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCCAGGACTGGTGAAGCCTT CGGAGACCCTGTCCCTCACCTGCACTGTCTCTGGTGGCTCCATC ATTAGTTACTACTGGGGGTGGATCCGGCAGCCCCCAGGGAAGG GACTGGAGTGGATTGGGTATATCTATTCTAGTGGGAGCACCTCGT ACAACCCCTCCCTCAAGAGTCGAGTCACCATATCAGTAGACACGT CCAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGTTCTGTGACCGCCGCA GACACGGCGGTGTACTACTGCGCCAGAGGCTCTGGACTGTATGC AGCTCCTGATTATGGACTTGACGTATGGGGTCAGGGAACAACCTG TCACCGTCTCCTCA (SEQ ID NO:343)
15472	GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTG GGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTT AGCAGCTATGCCATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGG GGCTGGAGTGGGTCTCAACCATTAGTGGTAGTGGTGGTAGCACA TACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCAGAGA CAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGC CGAGGACACGGCGGTGTACTACTGCGCCAGAGGTGCCGGACAC TACGACCTCGTCGGACGATACTGGGGACAGGGTACATTGGTCAC CGTCTCCTCA (SEQ ID NO:353)
15503	GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTG GGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTT AGCAGCTATGCCATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGG GGCTGGAGTGGGTCTCAGCTATTAGTGGTAGTGGTGGTAGCACA TACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCAGAGA CAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGC CGAGGACACGGCGGTGTACTACTGCGCCAGAGTGGGATTCAGA GCATTAACTACTGGGGACAGGGTACAACCTGTCACCGTCTCCTCA (SEQ ID NO:363)
15495	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTG GGTCCTCGGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGAGGCACCTTC AGCAGCTATGCTATCAGCTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGG GCTTGAGTGGATGGGAGGGATCATCCCTATCTTTGGTACAGCAA

	GCTACGCACAGAAGTTCCAGGGCAGAGTCACGATTACCGCGGAC GAATCCACGAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATC TGAGGACACGGCGGTGTACTACTGCGCAAGACAGCAATACGACG GTAGACGATACTTCGGCCTATGGGGGAGAGGTACCTTGGTCACC GTCTCCTCA (SEQ ID NO:373)
15478	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTG GGTCCTCGGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGAGGCACCTTC AGCAGCTATGCTATCAGCTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGG GCTTGAGTGGATGGGAGGGATCATCCCTATCTTTGGTACAGCAA ACTACGCACAGAAGTTCCAGGGCAGAGTCACGATTACCGCGGAC GAATCCACGAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATC TGAGGACACGGCGGTGTACTACTGCGCCAGAGGTGGGCCTTGG TTTGATCCATGGGGACAGGGTACATTGGTCACCGTCTCCTCA (SEQ ID NO:383)
15441	GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTG GGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTT AGCAGCTATGCCATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGG GGCTGGAGTGGGTCTCAGCTATTAGTGGTAGTGGTGGTAGCACA TCCTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCAGAGA CAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGC CGAGGACACGGCGGTGTACTACTGCGCCAAGCCTTCTTTGGCAA CAATGTTAGCCTTCGATATCTGGGGTCAGGGTACAATGGTCACC GTCTCCTCA (SEQ ID NO:393)
20496	CAGCTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCCAGGACTGGTGAAGCCTT CGGAGACCCTGTCCCTCACCTGCACTGTCTCTGGTGGCTCCATC AGCAGTAGTGTTTACTACTGGAGTTGGATCCGCCAGCCCCCAGG GAAGGGGTTGGAGTGGATTGGGAGTATCCTGGTGAGTGGGAGC ACCTACTACAACCCGTCCCTCAAGAGTCGAGTCACCATATCCGTA GACACGTCCAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGTTCTGTGAC CGCCGCAGACACGGCGGTGTACTACTGCGCCAGAGCTGTATCCT TCTTAGACGTATGGGGTCAGGGTACAATGGTCATCGTCTCCTCA (SEQ ID NO:403)

[000241] También se proporcionan en la presente polinucleótidos que comprenden una secuencia de nucleótidos que codifica una cadena ligera variable que se muestra en la Tabla 10, por ejemplo, donde un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este que comprende la cadena ligera variable codificada se une a B7-H4.

5

Tabla 10: Secuencias de polinucleótidos que codifica la cadena ligera variable

Anticuerpo	Secuencia de polinucleótidos que codifica la cadena ligera variable (SEQ ID NO)
15461	GAAATAGTGATGACGCAGTCTCCAGCCACCCTGTCTGTGTCTCCAGGGGAAAG AGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCAACTTAGCCTGGT ACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCATCCACC AGGGCCACTGGTATCCCAGCCAGGTTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGAGT TCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGTCTGAAGATTTTGCAGTTTATTACTGTC AGCAGTACCACTCCTTCCCTTTCACTTTTGGCGGAGGGACCAAGGTTGAGATC AAA (SEQ ID NO:214)
20500	GAAATAGTGATGACGCAGTCTCCAGCCACCCTGTCTGTGTCTCCAGGGGAAAG AGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCAACTTAGCCTGGT ACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCATCCACC AGGGCCACTGGTATCCCAGCCAGGTTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGAGT TCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGTCTGAAGATTTTGCAGTTTATTACTGTC AGCAGTACCACTCCTTCCCTTTCACTTTTGGCGGAGGGACCAAGGTTGAGATC AAA (SEQ ID NO:224)
20501	GAAATAGTGATGACGCAGTCTCCAGCCACCCTGTCTGTGTCTCCAGGGGAAAG AGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCAACTTAGCCTGGT ACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCATCCACC AGGGCCACTGGTATCCCAGCCAGGTTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGAGT TCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGTCTGAAGATTTTGCAGTTTATTACTGTC AGCAGTACCACTCCTTCCCTTTCACTTTTGGCGGAGGGACCAAGGTTGAGATC AAA (SEQ ID NO:234)
20502 y	GAAATAGTGATGACGCAGTCTCCAGCCACCCTGTCTGTGTCTCCAGGGGAAAG

20502.1	AGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCAACTTAGCCTGGT ACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCATCCACC AGGGCCACTGGTATCCCAGCCAGGTTCAAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGAGT TCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGTCTGAAGATTTTGCAGTTTATTACTGTC AGCAGTACCACTCCTTCCCTTTCACTTTTGGCGGAGGGACCAAGGTTGAGATC AAA (SEQ ID NO:244)
22208	GAAATAGTGATGACGCAGTCTCCAGCCACCCTGTCTGTGTCTCCAGGGGAAAG AGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGTCCGTTAGCACCAACTTAGCCTGGT ACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGACGCATCCGC CAGGGTCACTGGTATCCCAGCCAGGTTCAAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGAG TTCCTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGTCTGAAGATTTTGCAGTTTATTACTGT CAGCAGTACCACTCCTTCCCTTTCACTTTTGGCGGAGGGACCAAGGTTGAGAT CAAA (SEQ ID NO:254)
15462	GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAG AGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCAGCTACTTAGCCT GGTACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCATC CAGCAGGGCCACTGGCATCCCAGACAGGTTCAAGTGGCAGTGGGTCTGGGACA GACTTCACTCTCACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTTGCAGTGTATTAC TGTCAGCAGGCCGCCAGTTACCCTCTCACTTTTGGCGGAGGGACCAAGGTTG AGATCAAA (SEQ ID NO:264)
22213	GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAG AGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTGCCAGCAGCCACTTAGCC TGGTACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGACGCAGT CAGCAGGGCCACTGGCATCCCAGACAGGTTCAAGTGGCAGTGGGTCTGGGACA GACTTCACTCTCACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTTGCAGTGTATTAC TGTCAGCAGGCCGCCAGTTACCCTCTCACTTTTGGCGGAGGGACCAAGGTTG AGATCAAA (SEQ ID NO:274)
15465	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCTTCCGTGTCTGCATCTGTAGGAGACAG AGTACCATCACTTGTGCGGGCAGTCAGGGTATTAGCAGGTGGTTAGCCTGGT ATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTATGCTGCATCCAGT TTGCAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTCAAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGATTT

	CACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGCAACTTATTACTGTCA GCAGGCACACACCTTCCCTTACACTTTTGGCGGAGGGACCAAGGTTGAGATCA AA (SEQ ID NO:284)
20506	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCTTCCGTGTCTGCATCTGTAGGAGACAG AGTCACCATCACTTGTCGGGCGAGTCAGGGTATTAGCAGGTGGTTAGCCTGGT ATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTATGCTGCATCCAGT TTGCAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTCAAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGATTT CACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGCAACTTATTACTGTCA GCAGGCACACACCTTCCCTTACACTTTTGGCGGAGGGACCAAGGTTGAGATCA AA (SEQ ID NO:294)
15483	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCTTCCACCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAG AGTCACCATCACTTGCCGGGCGCAGTCAGAGTATTAGTAGCTGGTTGGCCTGGT ATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTATAAAGCCTCCAGT TTGAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTCAAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGAAT TCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGATGATTTTGCAACTTATTACTGCC AGCAGGACAACAGTTACCCTTACACTTTTGGCGGAGGGACCAAGGTTGAGATC AAA (SEQ ID NO:304)
20513	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCTTCCACCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAG AGTCACCATCACTTGCCGGGCGCAGTCAGAGTATTAGTAGCTGGTTGGCCTGGT ATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTATAAAGCCTCCAGT TTGAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTCAAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGAAT TCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGATGATTTTGCAACTTATTACTGCC AGCAGGACAACAGTTACCCTTACACTTTTGGCGGAGGGACCAAGGTTGAGATC AAA (SEQ ID NO:314)
22216	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCTTCCACCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAG AGTCACCATCACTTGCCGGGCGCAGTAAAAGTATTAGTTCCTGGTTGGCCTGGT ATCAGCAGAAACCAGGAAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTATGAAGCCTCCTCC TTGCACAGTGGGGTCCCATCAAGGTTCAAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGAAT TCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGATGATTTTGCAACTTATTACTGCC AGCAGGACAACAGTTACCCTTACACTTTTGGCGGAGGGACCAAGGTTGAGATC AAA (SEQ ID NO:324)

15489	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCTTCCACCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAG AGTCACCATCACTTGCCGGGCCAGTCAGAGTATTAGTAGCTGGTTGGCCTGGT ATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTATAAAGCCTCCAGT TTGGAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTCAAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGAAT TCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGATGATTTTGCAACTTATTACTGCC AGCAGGACAATAGCTTCCCTTTCACTTTTGGCGGAGGGACCAAGGTTGAGATC AAA (SEQ ID NO:334)
20516	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCTTCCACCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAG AGTCACCATCACTTGCCGGGCCAGTCAGAGTATTAGTAGCTGGTTGGCCTGGT ATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTATAAAGCCTCCAGT TTGGAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTCAAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGAAT TCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGATGATTTTGCAACTTATTACTGCC AGCAGGACAATAGCTTCCCTTTCACTTTTGGCGGAGGGACCAAGGTTGAGATC AAA (SEQ ID NO:344)
15472	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAG AGTCACCATCACTTGCCGGGCAAGTCAGAGCATTAGCAGCTATTTAAATTGGTA TCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTATGCTGCATCCAGTT TGCAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTCAAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTT ACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTGCAACTTACTACTGTCAG CAACTATACAGTCTCCCTCCTACTTTTGGCGGAGGGACCAAGGTTGAGATCAA A (SEQ ID NO:354)
15503	GACATCCAGTTGACCCAGTCTCCATCTTCCGTGTCTGCATCTGTAGGAGACAG AGTCACCATCACTTGTCGGGCGAGTCAGGATATTAGCAGCTGGTTAGCCTGGT ATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTATGCTGCATCCAGT TTGCAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTCAAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGATTT CACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGCAACTTATTACTGTCA GCAGGCAACCAGTTACCCTCCTTGGACTTTTGGCGGAGGGACCAAGGTTGAG ATCAAA (SEQ ID NO:364)
15495	GAAATAGTGATGACGCAGTCTCCAGCCACCCTGTCTGTGTCTCCAGGGGAAAG AGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCAACTTAGCCTGGT

	ACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATAGCGCATCCACC AGGGCCACTGGTATCCCAGCCAGGTTCAAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGAGT TCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGTCTGAAGATTTTGCAGTTTATTACTGTC AGCAGGTCAACGTCTGGCCTCCTACTTTTGGCGGAGGGACCAAGGTTGAGAT CAAA (SEQ ID NO:374)
15478	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCTTCCACCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAG AGTCACCATCACTTGCCGGGGCCAGTCAGAGTATTAGTAGCTGGTTGGCCTGGT ATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTATAAAGCCTCCAGT TTGGAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTCAAGGTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGAAT TCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGATGATTTTGCAACTTATTACTGCC AGCAGTACAATAGCTACCCTCCTTTCACTTTTGGCGGAGGGACCAAGGTTGAG ATCAAA (SEQ ID NO:384)
15441	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCTTCCACCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAG AGTCACCATCACTTGCCGGGGCCAGTCAGAGTATTAGTAGCTGGTTGGCCTGGT ATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTATGATGCCTCCAGT TTGGAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTCAAGGTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGAAT TCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGATGATTTTGCAACTTATTACTGCC AGCAGTCCAAAAGTTACCCTAGGACTTTTGGCGGAGGGACCAAGGTTGAGATC AAA (SEQ ID NO:394)
20496	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAG AGTCACCATCACTTGCCGGGGCAAGTCAGAGCATTAGCAGCTATTTAAATTGGTA TCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTATGGTGCATCCAGTT TGCAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTCAAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTC ACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTGCACCTTACTACTGTCAG CAAAGCTACGACCCCCCTTGGACTTTTGGCGGAGGGACCAAGGTTGAGATCAA A (SEQ ID NO:404)

[000242] También se proporcionan en la presente polinucleótidos que comprenden la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO:213, 214, 223, 224, 233, 234, 243, 470, 244, 253, 254, 263, 264, 273, 274, 283, 284, 293, 294, 303, 304, 313, 314, 323, 324, 333, 334, 343, 344, 353, 354, 363, 364, 373, 374, 383, 384, 393, 394, 403 o 404. También se proporcionan en la presente polinucleótidos que

comprenden (i) la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO:213, 214, 223, 224, 233, 234, 243, 470, 244, 253, 254, 263, 264, 273, 274, 283, 284, 293, 294, 303, 304, 313, 314, 323, 324, 333, 334, 343, 344, 353, 354, 363, 364, 373, 374, 383, 384, 393, 394, 403 o 404 y (ii) la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO:408 o 406.

5 [000243] También se proporcionan en la presente polinucleótidos que comprenden una secuencia de nucleótidos que codifica la SEQ ID NO:11, 12, 21, 22, 31, 32, 41, 464, 42, 51, 52, 61, 62, 71, 72, 81, 82, 91, 92, 101, 102, 111, 112, 121, 122, 131, 132, 141, 142, 151, 152, 161, 162, 171, 172, 181, 182, 191, 192, 201 o 202 y es al menos alrededor de 80 %, 85 % o 90 % idéntica a la SEQ ID NO:213, 214, 223, 224, 233, 234, 243, 470, 244, 253, 254, 263, 264, 273, 274, 283, 284, 293, 294, 303, 304, 313, 314, 323, 324, 333, 334, 343, 344, 353, 354, 363, 364, 373, 374, 383, 384, 393, 394, 403 o 404, respectivamente.

10 [000244] También se proporcionan en la presente polinucleótidos que comprenden una secuencia de nucleótidos que codifica la SEQ ID NO:11, 12, 21, 22, 31, 32, 41, 464, 42, 51, 52, 61, 62, 71, 72, 81, 82, 91, 92, 101, 102, 111, 112, 121, 122, 131, 132, 141, 142, 151, 152, 161, 162, 171, 172, 181, 182, 191, 192, 201 o 202 y es al menos alrededor de 95 % idéntica a la SEQ ID NO:213, 214, 223, 224, 233, 234, 243, 470, 244, 253, 254, 263, 264, 273, 274, 283, 284, 293, 294, 303, 304, 313, 314, 323, 324, 333, 334, 343, 344, 353, 354, 363, 364, 373, 374, 383, 384, 393, 394, 403 o 404, respectivamente.

15 [000245] También se proporcionan en la presente polinucleótidos que comprenden una secuencia de nucleótidos que codifica la SEQ ID NO:11, 12, 21, 22, 31, 32, 41, 464, 42, 51, 52, 61, 62, 71, 72, 81, 82, 91, 92, 101, 102, 111, 112, 121, 122, 131, 132, 141, 142, 151, 152, 161, 162, 171, 172, 181, 182, 191, 192, 201 o 202 y es al menos alrededor de 96 % idéntica a la SEQ ID NO:213, 214, 223, 224, 233, 234, 243, 470, 244, 253, 254, 263, 264, 273, 274, 283, 284, 293, 294, 303, 304, 313, 314, 323, 324, 333, 334, 343, 344, 353, 354, 363, 364, 373, 374, 383, 384, 393, 394, 403 o 404, respectivamente.

20 [000246] También se proporcionan en la presente polinucleótidos que comprenden una secuencia de nucleótidos que codifica la SEQ ID NO:11, 12, 21, 22, 31, 32, 41, 464, 42, 51, 52, 61, 62, 71, 72, 81, 82, 91, 92, 101, 102, 111, 112, 121, 122, 131, 132, 141, 142, 151, 152, 161, 162, 171, 172, 181, 182, 191, 192, 201 o 202 y es al menos alrededor de 97 % idéntica a la SEQ ID NO:213, 214, 223, 224, 233, 234, 243, 470, 244, 253, 254, 263, 264, 273, 274, 283, 284, 293, 294, 303, 304, 313, 314, 323, 324, 333, 334, 343, 344, 353, 354, 363, 364, 373, 374, 383, 384, 393, 394, 403 o 404,

respectivamente.

[000247] También se proporcionan en la presente polinucleótidos que comprenden una secuencia de nucleótidos que codifica la SEQ ID NO:11, 12, 21, 22, 31, 32, 41, 464, 42, 51, 52, 61, 62, 71, 72, 81, 82, 91, 92, 101, 102, 111, 112, 121, 122, 131, 132, 141, 142, 151, 152, 161, 162, 171, 172, 181, 182, 191, 192, 201 o 202 y es al menos alrededor de 98 % idéntica a la SEQ ID NO:213, 214, 223, 224, 233, 234, 243, 470, 244, 253, 254, 263, 264, 273, 274, 283, 284, 293, 294, 303, 304, 313, 314, 323, 324, 333, 334, 343, 344, 353, 354, 363, 364, 373, 374, 383, 384, 393, 394, 403 o 404, respectivamente.

[000248] También se proporcionan en la presente polinucleótidos que comprenden una secuencia de nucleótidos que codifica la SEQ ID NO:11, 12, 21, 22, 31, 32, 41, 464, 42, 51, 52, 61, 62, 71, 72, 81, 82, 91, 92, 101, 102, 111, 112, 121, 122, 131, 132, 141, 142, 151, 152, 161, 162, 171, 172, 181, 182, 191, 192, 201 o 202 y es al menos alrededor de 99 % idéntica a la SEQ ID NO:213, 214, 223, 224, 233, 234, 243, 470, 244, 253, 254, 263, 264, 273, 274, 283, 284, 293, 294, 303, 304, 313, 314, 323, 324, 333, 334, 343, 344, 353, 354, 363, 364, 373, 374, 383, 384, 393, 394, 403 o 404, respectivamente.

[000249] En determinados aspectos, en la presente se proporcionan polinucleótidos que comprenden una secuencia de nucleótidos que codifican la cadena ligera o la cadena pesada de un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno descrito en la presente. Los polinucleótidos pueden comprender las secuencias que nucleótidos que comprenden una cadena pesada que comprende las CDR y FR VH de los anticuerpos descritos en la presente (véanse, por ejemplo, las Tablas 1 y 5). Los polinucleótidos pueden comprender las secuencias que nucleótidos que comprenden una cadena ligera que comprende las CDR y FR VL de los anticuerpos descritos en la presente (véanse, por ejemplo, las Tablas 2 y 6).

[000250] En modalidades específicas, un polinucleótido descrito en la presente codifica un dominio de VH que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO:464. En modalidades específicas, un polinucleótido descrito en la presente codifica un dominio de VL que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO:42.

[000251] En modalidades específicas, un polinucleótido descrito en la presente codifica un dominio de VH que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO:41. En modalidades específicas, un polinucleótido descrito en la presente codifica un dominio de VL que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO:42.

[000252] En modalidades específicas, un polinucleótido descrito en la presente codifica un dominio de VH que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO:71. En modalidades específicas, un polinucleótido descrito en la presente codifica un dominio de VL que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO:72.

5 [000253] En modalidades particulares, se proporcionan en la presente polinucleótidos que comprenden una secuencia de nucleótidos que codifica un anticuerpo anti-B7-H4 que comprende tres CDR de cadena VH, por ejemplo, que contiene CDR1 VH, CDR2 VH, CDR3 VL VH de cualquiera de los anticuerpos descritos en la presente (por ejemplo, véase la Tabla 1). En modalidades específicas, se proporcionan en la presente polinucleótidos que comprenden tres CDR de cadena VL,
10 por ejemplo, que contiene CDR1 VL, CDR2 VL y CDR3 VL de cualquiera de los anticuerpos descritos en la presente (por ejemplo, véase la Tabla 2). En modalidades específicas, se proporcionan en la presente polinucleótidos que comprenden una secuencia de nucleótidos que codifica un anticuerpo anti-B7-H4 que comprende tres CDR de cadena VH, por ejemplo, que contiene CDR1 VH, CDR2 VH y CDR3 VH de cualquiera de los anticuerpos descritos en la presente (por ejemplo, véase la Tabla 1)
15 y tres CDR de cadena VL, por ejemplo, que contiene CDR1 VL, CDR2 VL y CD3 VL de cualquiera de los anticuerpos descritos en la presente (por ejemplo, véase la Tabla 2).

[000254] En modalidades particulares, se proporcionan en la presente polinucleótidos que comprenden una secuencia de nucleótidos que codifica un anticuerpo anti-B7-H4 o un fragmento de unión al antígeno de este o un fragmento de este que comprende un dominio de VH, por ejemplo,
20 que contiene FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4, que comprende una secuencia de aminoácidos descrita en la presente (por ejemplo, véase las Tablas 1 y 5, por ejemplo, las CDR VH y FR VH de un anticuerpo particular identificado por nombre en las tablas). En modalidades específicas, se proporcionan en la presente polinucleótidos que comprenden una secuencia de nucleótidos que codifica un anticuerpo anti-B7-H4 o un fragmento de unión al antígeno de este o un
25 fragmento de este que comprende un dominio de VL, por ejemplo, que contiene FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4, que comprende una secuencia de aminoácidos descrita en la presente (por ejemplo, véase las Tablas 2 y 6, por ejemplo, las CDR VL y FR VL de un anticuerpo particular identificado por nombre en las Tablas).

[000255] En determinadas modalidades, un polinucleótido descrito en la presente comprende una
30 secuencia de nucleótidos que codifica una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos descrita en la presente (por ejemplo, SEQ ID NO:464, 41 o 71), donde un anticuerpo que contiene la región variable de cadena pesada se une inespecíficamente a B7-H4

(por ejemplo, B7-H4 humana). En una modalidad determinada, un polinucleótido descrito en la presente comprende una secuencia que codifica una región variable de cadena pesada que se proporciona en la presente (por ejemplo, la parte que codifica la región variable de la SEQ ID NO:470, 243 o 273), donde un anticuerpo que contiene la región variable de cadena pesada se une inmunoespecíficamente a B7-H4 (por ejemplo, B7-H4 humana).

[000256] En determinadas modalidades, un polinucleótido descrito en la presente comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos descrita en la presente (por ejemplo, SEQ ID NO:42 o 72), donde un anticuerpo que contiene la región variable de cadena ligera se une inmunoespecíficamente a B7-H4 (por ejemplo, B7-H4 humana). En una modalidad determinada, un polinucleótido descrito en la presente comprende una secuencia que codifica una región variable de cadena ligera que se proporciona en la presente (por ejemplo, la parte que codifica la región variable de la SEQ ID NO:244 o 274), donde un anticuerpo que contiene la región variable de cadena pesada se une inmunoespecíficamente a B7-H4 (por ejemplo, B7-H4 humana).

[000257] En una modalidad particular, un polinucleótido o combinación de polinucleótidos que se proporciona en la presente comprende una secuencia de nucleótidos o combinación de secuencias de nucleótidos que codifica un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este que se une inmunoespecíficamente a B7-H4 (por ejemplo, B7-H4 humana), donde el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este comprende una cadena pesada, donde la cadena pesada comprende un dominio variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos establecida en la Tabla 3 (por ejemplo, SEQ ID NO:464, 41 o 71) y una región constante que comprende la secuencia de aminoácidos de una región constante de cadena pesada gamma (γ) humana.

[000258] En una modalidad particular, un polinucleótido o combinación de polinucleótidos que se proporciona en la presente comprende una secuencia de nucleótidos o combinación de secuencias de nucleótidos que codifica un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este que se une inmunoespecíficamente a B7-H4 (por ejemplo, B7-H4 humana), donde el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este comprende una cadena ligera, donde la cadena ligera comprende un dominio variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos establecida en la Tabla 4 (por ejemplo, SEQ ID NO:42 o 72) y una región constante que comprende la secuencia de aminoácidos de una región constante de cadena ligera lambda humana.

[000259] En una modalidad particular, un polinucleótido o combinación de polinucleótidos que se

proporciona en la presente comprende una secuencia de nucleótidos o combinación de secuencias de nucleótidos que codifica un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este que se une inmunoespecíficamente a B7-H4 (por ejemplo, B7-H4 humana), donde el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este comprende una cadena pesada, donde la cadena pesada comprende (i) un dominio variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos establecida en la Tabla 3 (por ejemplo, SEQ ID NO:464, 41 o 71) y una región constante que comprende la secuencia de aminoácidos de una región constante de cadena pesada gamma (γ) humana y (ii) una cadena ligera, donde la cadena ligera comprende un dominio variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos establecida en la Tabla 4 (por ejemplo, SEQ ID NO:42 o 72) y una región constante que comprende la secuencia de aminoácidos de una región constante de cadena ligera lambda humana.

[000260] En una modalidad, se proporciona en la presente una combinación de polinucleótidos que comprende un polinucleótido que comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO:470 y un polinucleótido que comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO:244.

[000261] En una modalidad, se proporciona en la presente una combinación de polinucleótidos que comprende un polinucleótido que comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO:243 y un polinucleótido que comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO:244.

[000262] En una modalidad, se proporciona en la presente una combinación de polinucleótidos que comprende un polinucleótido que comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO:273 y un polinucleótido que comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO:274.

[000263] En una modalidad específica, se proporcionan en la presente polinucleótidos que comprenden una secuencia de nucleótidos que codifica un anticuerpo anti-B7-H4 o un fragmento de unión al antígeno de este o un dominio de este, denominado en la presente, por ejemplo, en las Tablas 1-8-

[000264] También se proporcionan en la presente polinucleótidos que codifican un anticuerpo anti-B7-H4 o fragmento de unión al antígeno de este descrito en la presente que se optimizan, por ejemplo, mediante optimización por codones/ARN, reemplazo con secuencias de señales heterólogas y eliminación de elementos de inestabilidad de ARNm. Los métodos para generar ácidos nucleicos optimizados que codifican un anticuerpo anti-B7-H4 o fragmento de unión al antígeno de este o un dominio de este (por ejemplo, cadena pesada, cadena ligera, dominio de VH o dominio de VL) para la expresión recombinante mediante la introducción de cambios de codones (por ejemplo,

un cambio de codones que codifica el mismo aminoácido debido a la degeneración del código genético) y/o eliminación de regiones inhibitoras en el ARNm se pueden llevar a cabo al adaptar los métodos de optimización descritos, por ejemplo, en las patentes estadounidenses n.º 5,965,726; 6,174,666; 6,291,664; 6,414,132; y 6,794,498, de forma acorde.

5 [000265] Un polinucleótido que codifica un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este descrito en la presente o un dominio de este se puede generar a partir de un ácido nucleico de una fuente adecuada (por ejemplo, un hibridoma) usando métodos conocidos en la técnica (por ejemplo, PCR y otros métodos de clonación molecular). Por ejemplo, la amplificación por PCR usando cebadores sintéticos hibridables con extremos 3' y 5' de una secuencia conocida se puede realizar
10 usando ADN genómico obtenido de células de hibridoma que producen el anticuerpo de interés. Dichos métodos de amplificación por PCR se pueden usar para obtener ácidos nucleicos que comprenden la secuencia que codifica la cadena ligera y/o cadena pesada de un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este. Dichos métodos de amplificación por PCR se pueden usar para obtener ácidos nucleicos que comprenden la secuencia que codifica la región de cadena ligera
15 variable y/o región de cadena pesada variable de un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este. Los ácidos nucleicos amplificados se pueden clonar en vectores para la expresión en células hospedadoras y para la clonación adicional, por ejemplo, para generar anticuerpos quiméricos y humanizados o fragmentos de unión al antígeno de estos.

[000266] Los polinucleótidos que se proporcionan en la presente pueden ser, por ejemplo, en forma
20 de ARN o en forma de ADN. El ADN incluye ADNc, ADN genómico y ADN sintético, y el ADN puede ser de cadena doble o de cadena simple. Si es de cadena simple, el ADN puede ser la cadena codificante o la cadena no codificante (antisentido). En determinadas modalidades, el polinucleótido es un ADNc o un ADN que carece de uno o más intrones endógenos. En determinadas modalidades, un polinucleótido es un polinucleótido de origen no natural. En determinadas modalidades, un
25 polinucleótido se produce de forma recombinante. En determinadas modalidades, los polinucleótidos están aislados. En determinadas modalidades, los polinucleótidos son sustancialmente puros. En determinadas modalidades, un polinucleótido se purifica a partir de componentes naturales.

1.2.2 Células y vectores

30 [000267] En determinados aspectos, en la presente se proporcionan vectores (por ejemplo, vectores de expresión) que comprenden polinucleótidos que comprenden secuencias de nucleótidos que

codifican anticuerpos anti-B7-H4 y fragmentos de unión al antígeno de estos o un dominio de este para la expresión recombinante en células hospedadoras, preferentemente en células de mamífero. También se proporcionan en la presente células, por ejemplo, células hospedadoras, que comprenden dichos vectores para la expresión recombinante de anticuerpos anti-B7-H4 o fragmentos de unión al antígeno de estos descritos en la presente (por ejemplo, anticuerpos humanos o humanizados o fragmentos de unión al antígeno de estos). En un aspecto particular, en la presente se proporcionan métodos para producir un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este descrito en la presente, que comprenden expresar dicho anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este en una célula hospedadora.

5 [000268] En determinadas modalidades, la expresión recombinante de un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este o dominio de este descrito en la presente (por ejemplo, una cadena pesada o ligera descrita en la presente) que se une específicamente a B7-H4 (por ejemplo, B7-H4 humana) implica la construcción de un vector de expresión que contiene un polinucleótido que codifica el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este o dominio de este. Una vez que el

10 polinucleótido que codifica un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este o dominio de este (por ejemplo, dominio variable de cadena pesada o ligera) descrito en la presente se ha obtenido, el vector para la producción del anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este puede producirse mediante tecnología de ADN recombinante mediante el uso de procedimientos conocidos en la técnica. Por lo tanto, se describen en la presente métodos para preparar una proteína mediante la

15 expresión de un polinucleótido que contiene un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este o dominio de este (por ejemplo, cadena ligera o cadena pesada) que codifica una secuencia de nucleótidos. Se pueden utilizar métodos conocidos por los expertos en la técnica para construir vectores de expresión que contienen secuencias de codificación de anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este o dominio de este (por ejemplo, cadena pesada o cadena ligera) y señales de control de transcripción y traducción adecuadas. Estos métodos incluyen, por ejemplo, técnicas de

20 ADN recombinante in vitro, técnicas sintéticas y recombinación genética in vivo. También se proporcionan vectores replicables que comprenden una secuencia de nucleótidos que codifica un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este descrito en la presente, una cadena pesada o ligera, un dominio variable de cadena pesada o ligera, o una CDR de cadena pesada o ligera, unidos de forma operativa a un promotor. Dichos vectores, por ejemplo, pueden incluir la secuencia de

25 nucleótidos que codifica la región constante del anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este (véase, por ejemplo, la publicación internacional n.º WO 86/05807 y WO 89/01036; y la patente estadounidense n.º 5,122,464), y los dominios variables del anticuerpo o fragmento de unión al

30

antígeno de este pueden clonarse en dicho vector para la expresión de la cadena pesada entera, la cadena ligera entera o ambas cadenas pesada y ligera enteras.

[000269] Un vector de expresión puede transferirse a una célula (por ejemplo, célula hospedadora) mediante técnicas convencionales y las células resultantes pueden cultivar entonces mediante técnicas convencionales para producir un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno descrito en la presente (por ejemplo, un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este que comprende las seis CDR, la VH, la VL, la VH y la VL, la cadena pesada, la cadena ligera o la cadena ligera y pesada de 20502, 20502.1 o 22213) o un dominio de este (por ejemplo, la VH, la VL, la VH y la VL, la cadena pesada o la cadena ligera de 20502, 20502.1 o 22213). Por lo tanto, se proporcionan en la presente células hospedadoras que contienen un polinucleótido que codifica un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno descrito en la presente (por ejemplo, un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este que comprende las seis CDR, la VH, la VL, la VH y la VL, la cadena pesada, la cadena ligera o la cadena ligera y pesada de 20502, 20502.1 o 22213) o un dominio de este (por ejemplo, la VH, la VL, la VH y la VL, la cadena pesada o la cadena ligera de 20502, 20502.1 o 22213), unido de forma operativa a un promotor para la expresión de dichas secuencias en la célula hospedadora. En determinadas modalidades, para la expresión de anticuerpos de cadena doble o fragmentos de unión al antígeno de estos, los vectores que codifican cadenas pesadas y ligeras de forma individual pueden expresarse de forma conjunta en la célula hospedadora para la expresión de la inmunoglobulina completa, tal como se detalla a continuación. En determinadas modalidades, una célula hospedadora contiene un vector que comprende un polinucleótido que codifica tanto la cadena pesada como la cadena ligera de un anticuerpo descrito en la presente (por ejemplo, la cadena pesada y ligera de 20502, 20502.1 o 22213) o un dominio de este (por ejemplo, la VH y la VL de 20502, 20502.1 o 22213). En modalidades específicas, una célula hospedadora contiene dos vectores distintos, un primer vector que comprende un polinucleótido que codifica una cadena pesada o una región variable de cadena pesada de un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este descrito en la presente, y un segundo vector que comprende un polinucleótido que codifica una cadena ligera o una región variable de cadena ligera de un anticuerpo descrito en la presente (por ejemplo, un anticuerpo que comprende las seis CDR de 20502, 20502.1 o 22213) o un dominio de este. En otras modalidades, una primera célula hospedadora comprende un primer vector que comprende un polinucleótido que codifica una cadena pesada o una región variable de cadena pesada de un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este descrito en la presente, y una segunda célula hospedadora comprende un segundo vector que comprende un polinucleótido que codifica una cadena ligera o una región variable de cadena ligera de un anticuerpo o fragmento de

unión al antígeno de este descrito en la presente (por ejemplo, un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este que comprende las seis CDR de 20502, 20502.1 o 22213). En modalidades específicas, una región variable de cadena pesada/cadena ligera expresada por una célula asociada con una región variable de cadena ligera/cadena pesada de una segunda célula forma un anticuerpo anti-B7-H4 o un fragmento de unión al antígeno de este descrito en la presente (por ejemplo, anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este que comprende las seis CDR de 20502, 20502.1 o 22213). En determinadas modalidades, en la presente se proporciona una población de células hospedadoras que comprenden dicha primera célula hospedadora y dicha segunda célula hospedadora.

5

10

[000270] En una modalidad particular, se proporciona en la presente una población de vectores que comprende un polinucleótido que codifica una cadena ligera/región variable de cadena ligera de un anticuerpo anti-B7-H4 o fragmento de unión al antígeno de este descrito en la presente, y un segundo vector que comprende un polinucleótido que codifica una cadena pesada/región variable de cadena pesada de un anticuerpo anti-B7-H4 o fragmento de unión al antígeno de este descrito en la presente (por ejemplo, un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este que comprende las CDR de 20502, 20502.1 o 22213). De manera alternativa, se puede utilizar un único vector que codifica, y puede expresar, polipéptidos tanto de cadena pesada como ligera.

15

20

25

30

[000271] Se puede utilizar una variedad de sistemas de vector de expresión hospedador para expresar anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno de estos descritos en la presente (por ejemplo, un anticuerpos o fragmento de unión al antígeno de este que comprende las CDR de 20502, 20502.1 o 22213) (véase, por ejemplo, la patente estadounidense n.º 5,807,715). Dichos sistemas de expresión de hospedadores representan vehículos mediante los cuales las secuencias de codificación de interés se pueden producir y posteriormente purificar, pero también representan células que pueden, cuando se las transforma o transfecta con las secuencias de codificación de nucleótido adecuadas, expresar un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este descrito en la presente in situ. Estos incluyen, de modo no taxativo, microorganismos tales como bacterias (por ejemplo, *E. coli* y *B. subtilis*) transformadas con ADN bacteriófago recombinante, vectores de expresión de ADN plásmido o ADN cósmido que contienen secuencias de codificación de anticuerpos; levadura (por ejemplo, *Saccharomyces Pichia*) transformada con vectores de expresión de levadura recombinante que contienen secuencias de codificación de anticuerpos; sistema de células de insecto infectados con vectores de expresión de virus recombinante (por ejemplo, baculovirus) que contienen secuencias de codificación de anticuerpos; sistemas de células vegetales (por ejemplo, algas verdes tales como *Chlamydomonas reinhardtii*) infectados con vectores de

expresión de virus recombinante (por ejemplo virus del mosaico del coliflor, CaMV; virus del mosaico del tabaco, TMV) o transformados con vectores de expresión de plásmido recombinante (por ejemplo, plásmido Ti) que contienen secuencias de codificación de anticuerpos; o sistemas de células de mamífero (por ejemplo, COS (por ejemplo, COS1 o COS), células CHO, BHK, MDCK, HEK 293, NS0, PER.C6, VERO, CRL7030, HsS78Bst, HeLa y NIH 3T3, HEK-293T, HepG2, SP210, R1.1, B-W, L-M, BSC1, BSC40, YB/20 y BMT10) que contienen construcciones de expresión recombinante que contienen promotores derivados del genoma de células de mamífero (por ejemplo, promotor de metalotioneína) o de virus de mamífero (por ejemplo, el promotor tardío de adenovirus; el promotor del virus vaccinia 7.5K). En una modalidad específica, las células para la expresión de anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno de esos descritos en la presente (por ejemplo, un anticuerpos o fragmento de unión al antígeno de este que comprende las CDR de 20502, 20502.1 o 22213) son células CHO, por ejemplo, células CHO del CHO GS System™ (Lonza). En una modalidad particular, las células para expresar anticuerpos descritos en la presente son células humanas, por ejemplo, líneas celulares humanas. En una modalidad específica, un vector de expresión de mamífero es pOptiVEC™ o pcDNA3.3. En una modalidad particular, las células bacterianas tales como *Escherichia coli*, o células eucariotas (por ejemplo, células de mamífero), especialmente para la expresión de molécula de anticuerpo recombinante completa, se usan para la expresión de una molécula de anticuerpo recombinante. Por ejemplo, las células de mamífero, tales como las células de ovario de hámster chino (CHO), junto con un vector tal como el elemento de promotor génico temprano intermedio mayor del citomegalovirus humano, son un sistema de expresión eficaz para los anticuerpos (Foecking MK & Hofstetter H (1986) *Gene* 45: 101-105; y Cockett MI et ál., (1990) *Biotechnology* 8: 662-667). En determinadas modalidades, los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno de estos descritos en la presente se producen mediante células CHO o células NS0.

[000272] Adicionalmente, se puede elegir una cepa de célula hospedadora que module la expresión de las secuencias insertadas o que modifique y procese el producto génico en la forma específica deseada. Estas modificaciones (por ejemplo, glicosilación) y procesamientos (por ejemplo, escisión) de productos de proteína pueden contribuir con la función de la proteína. A tales efectos, se pueden utilizar células hospedadoras eucariotas que poseen la maquinaria celular para el correcto procesamiento de la transcripción, glicosilación y fosforilación principales del producto génico. Dichas células hospedadoras de mamífero incluyen, de modo no taxativo, células CHO, VERO, BHK, Hela, MDCK, HEK 293, NIH 3T3, W138, BT483, Hs578T, HTB2, BT20 y T47D, NS0 (una línea celular de mieloma murino que no produce de forma endógena ninguna cadena de inmunoglobulina),

CRL7O3O, COS (por ejemplo, COS1 o COS), PER.C6, VERO, HsS78Bst, HEK-293T, HepG2, SP210, R1.1, B-W, L-M, BSC1, BSC40, YB/20, BMT10 and HsS78Bst. En determinadas modalidades, los anticuerpos anti-B7-H4 descritos en la presente (por ejemplo, un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este que comprende las CDR de 20502, 20502.1 o 22213) se producen en células de mamífero, tales como células CHO.

[000273] En determinadas modalidades, los anticuerpos anti-B7-H4 descritos en la presente (por ejemplo, un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este que comprende las CDR de 20502, 20502.1 o 22213) se producen en células de mamífero, tales como células CHOK1SV Potelligent®.

[000274] En algunas modalidades, se proporcionan células hospedadoras que comprenden ácido nucleico que codifica un anticuerpo anti-B7-H4 o un fragmento de unión al antígeno de este descrito en la presente, donde la célula hospedadora carece de un gen de alfa-1,6-fucosiltransferasa (FUT8) funcional. En algunas modalidades, la célula hospedadora es una célula CHO.

[000275] Una vez que se produjo mediante expresión recombinante un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este descrito en la presente, se puede purificar mediante cualquier método conocido en la técnica para la purificación de una molécula de inmunoglobulina, por ejemplo, mediante cromatografía (por ejemplo, intercambio de iones, afinidad, en particular mediante afinidad para el antígeno específico después de Proteína A y cromatografía en columna por tamaño), centrifugación, solubilidad diferencial o mediante cualquier otra técnica estándar para la purificación de proteínas. Además, los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno de estos descritos en la presente se pueden fusionar con secuencias de polipéptidos heterólogas descritas en la presente o conocidas de otro modo en la técnica, para facilitar la purificación.

[000276] En modalidades específicas, un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este está aislado o purificado. En general, un anticuerpo aislado o fragmento de unión al antígeno de este es aquel que se encuentra sustancialmente libre de otros anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno de estos con diferentes especificidades que la del anticuerpo aislado o fragmento de unión al antígeno de este. Por ejemplo, en una modalidad particular, una preparación de un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este descrito en la presente carece sustancialmente de material celular y/o precursores químicos.

1.3 Composiciones farmacéuticas

[000277] En la presente se proporcionan composiciones que comprenden un anticuerpo o fragmento

de unión al antígeno de este descrito en la presente que tiene el grado deseado de pureza en un portador, excipiente o estabilizante fisiológicamente aceptable (Remington's Pharmaceutical Sciences (1990) Mack Publishing Co., Easton, PA). Dichos portadores, excipientes o estabilizantes aceptables no son tóxicos para los receptores en las dosis y concentraciones usadas.

5 [000278] En diversas modalidades, las composiciones que comprenden un anticuerpo anti-B7-H4 o un fragmento de unión al antígeno de este se proporcionan en formulaciones con un portador farmacéuticamente aceptable (véase, por ejemplo Gennaro, Remington: The Science and Practice of Pharmacy with Facts and Comparisons: Drugfacts Plus, 20.a ed. (2003); Ansel et ál., Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, 7.^a ed., Lippencott Williams y Wilkins (2004); Kibbe et ál.,
10 Handbook of Pharmaceutical Excipients, 3.^a ed., Pharmaceutical Press (2000)).

[000279] Las composiciones farmacéuticas descritas en la presente pueden ser útiles para bloquear la actividad inhibidora de B7-H4 contra linfocitos T y/o en el agotamiento dependiente de ADCC de células que expresan B7-H4. Las composiciones farmacéuticas descritas en la presente pueden ser útiles en el tratamiento de una afección, tal como el cáncer. Los ejemplos de cáncer que pueden ser
15 tratados de acuerdo con los métodos descritos en la presente incluyen, de modo no taxativo, cáncer de mama (por ejemplo, cáncer de mama triple negativo, carcinoma ductal), carcinoma de endometrio, cáncer de ovario y cáncer de pulmón no microcítico (por ejemplo, carcinoma de células escamosas), cáncer de páncreas, cáncer de tiroides, cáncer renal (por ejemplo, carcinoma de células renales) y cáncer de vejiga (por ejemplo, carcinoma de células uroteliales). Un cáncer de pulmón no microcítico
20 puede ser, por ejemplo, un adenocarcinoma. Los ejemplos adicionales de cáncer que puede ser tratado de acuerdo con los métodos descritos en la presente incluyen, de modo no taxativo, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de pulmón microcítico, cáncer gástrico, melanoma y colangiocarcinoma. En una modalidad, el cáncer de ovario es adenocarcinoma seroso. En una modalidad, el cáncer de mama es adenocarcinoma ductal.

25 [000280] Las composiciones farmacéuticas descritas en la presente son, en una modalidad, para uso en un medicamento. Las composiciones farmacéuticas descritas en la presente son, en una modalidad, para uso como diagnóstico, por ejemplo, para detectar la presencia de B7-H4 en una muestra obtenida de un paciente (por ejemplo, un paciente humano).

[000281] Las composiciones que se utilizarán para la administración in vivo pueden ser estériles.
30 Esto se logra fácilmente mediante filtración a través de, por ejemplo, membranas de filtración estériles.

- [000282] En algunas modalidades, se proporcionan composiciones farmacéuticas, donde la composición farmacéutica comprende anticuerpos anti-B7-H4 o fragmentos de unión al antígeno de estos descrito en la presente y un portador farmacéuticamente aceptable. En algunas modalidades, se proporcionan composiciones farmacéuticas, donde la composición farmacéutica comprende anticuerpos anti-B7-H4 afucosilados o fragmentos de unión al antígeno de estos descrito en la presente y un portador farmacéuticamente aceptable. En modalidades específicas, dicha composición farmacéutica comprende anticuerpos anti-B7-H4 afucosilados o fragmentos de unión al antígeno de estos, por ejemplo, donde al menos 80 % de los anticuerpos en la composición se encuentran afucosilados. En modalidades específicas, dicha composición farmacéutica comprende anticuerpos anti-B7-H4 afucosilados o fragmentos de unión al antígeno de estos, por ejemplo, donde al menos 85 % de los anticuerpos en la composición se encuentran afucosilados. En modalidades específicas, dicha composición farmacéutica comprende anticuerpos anti-B7-H4 afucosilados o fragmentos de unión al antígeno de estos, por ejemplo, donde al menos 90 % de los anticuerpos en la composición se encuentran afucosilados. En modalidades específicas, dicha composición farmacéutica comprende anticuerpos anti-B7-H4 afucosilados o fragmentos de unión al antígeno de estos, por ejemplo, donde al menos 95 % de los anticuerpos en la composición se encuentran afucosilados. En modalidades específicas, dicha composición farmacéutica comprende anticuerpos anti-B7-H4 afucosilados o fragmentos de unión al antígeno de estos, por ejemplo, donde al menos 96 % de los anticuerpos en la composición se encuentran afucosilados. En modalidades específicas, dicha composición farmacéutica comprende anticuerpos anti-B7-H4 afucosilados o fragmentos de unión al antígeno de estos, por ejemplo, donde al menos 97 % de los anticuerpos en la composición se encuentran afucosilados. En modalidades específicas, dicha composición farmacéutica comprende anticuerpos anti-B7-H4 afucosilados o fragmentos de unión al antígeno de estos, por ejemplo, donde al menos 98 % de los anticuerpos en la composición se encuentran afucosilados. En modalidades específicas, dicha composición farmacéutica comprende anticuerpos anti-B7-H4 afucosilados o fragmentos de unión al antígeno de estos, por ejemplo, donde al menos 99 % de los anticuerpos en la composición se encuentran afucosilados. En modalidades específicas, dicha composición farmacéutica comprende anticuerpos anti-B7-H4 afucosilados o fragmentos de unión al antígeno de estos, donde la fucosa es indetectable en la composición.
- [000283] En algunas modalidades, una composición farmacéutica comprende (i) un anticuerpo aislado o fragmento de unión al antígeno de este que se une específicamente a B7-H4 humana, que comprende las secuencias de la región determinante de la complementariedad (CDR) 1 de región variable de cadena pesada (VH), CDR2 VH, CDR3 VH y CDR1, CDR2 y CDR3 de región variable de

cadena ligera (VL) de las SEQ ID NO:458-463, respectivamente, (b) una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:464 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:42, o (c) una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:469 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:44, y (ii) un excipiente farmacéuticamente aceptable.

[000284] También se proporciona en la presente una composición farmacéutica que comprende (i) anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno de estos que se unen específicamente a B7-H4 humana y comprenden secuencias de región determinante de la complementariedad (CDR) 1 de región variable de cadena pesada (VH), CDR2 VH, CDR3 VH y CDR1, CDR2 y CDR3 de región variable de cadena ligera (VL) de las SEQ ID NO:458-463, respectivamente y (ii) un excipiente farmacéuticamente aceptable, donde al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % de los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno de estos en la composición están afucosilados. En una modalidad, (i) el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:464 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:42 o (ii) el anticuerpo comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:469 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:44.

[000285] En algunas modalidades, una composición farmacéutica comprende (i) un anticuerpo aislado o fragmento de unión al antígeno de este que se une específicamente a B7-H4 humana, que comprende las secuencias de la región determinante de la complementariedad (CDR) 1 de región variable de cadena pesada (VH), CDR2 VH, CDR3 VH y CDR1, CDR2 y CDR3 de región variable de cadena ligera (VL) de las SEQ ID NO:35-40, respectivamente, (b) una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:41 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:42, o (c) una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:43 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:44, y (ii) un excipiente farmacéuticamente aceptable.

[000286] También se proporciona en la presente una composición farmacéutica que comprende (i) anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno de estos que se unen específicamente a B7-H4 humana y comprenden secuencias de región determinante de la complementariedad (CDR) 1 de

región variable de cadena pesada (VH), CDR2 VH, CDR3 VH y CDR1, CDR2 y CDR3 de región variable de cadena ligera (VL) de las SEQ ID NO:35-40, respectivamente y (ii) un excipiente farmacéuticamente aceptable, donde al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % de los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno de estos en la composición están afucosilados. En una modalidad, (i) el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:41 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:42 o (ii) el anticuerpo comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:43 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:44.

[000287] En algunas modalidades, una composición farmacéutica comprende (i) un anticuerpo aislado o fragmento de unión al antígeno de este que se une específicamente a B7-H4 humana, que comprende las secuencias de la región determinante de la complementariedad (CDR) 1 de región variable de cadena pesada (VH), CDR2 VH, CDR3 VH y CDR1, CDR2 y CDR3 de región variable de cadena ligera (VL) de las SEQ ID NO:65-70, respectivamente, (b) una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:71 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:72, o (c) una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:73 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:74, y (ii) un excipiente farmacéuticamente aceptable.

[000288] También se proporciona en la presente una composición farmacéutica que comprende (i) anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno de estos que se unen específicamente a B7-H4 humana y comprenden secuencias de región determinante de la complementariedad (CDR) 1 de región variable de cadena pesada (VH), CDR2 VH, CDR3 VH y CDR1, CDR2 y CDR3 de región variable de cadena ligera (VL) de las SEQ ID NO:65-70, respectivamente y (ii) un excipiente farmacéuticamente aceptable, donde al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % de los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno de estos en la composición están afucosilados. En una modalidad, (i) el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:71 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:72 o (ii) el anticuerpo comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:73 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:74.

1.4 Usos y métodos

1.4.1 Usos y métodos terapéuticos

[000289] En un aspecto, se presentan en la presente métodos para modular una o más funciones inmunitarias en un sujeto, que comprenden administrarle a un sujeto que lo necesite un anticuerpo anti-B7-H4 o fragmento de unión al antígeno de este descrito en la presente, o una composición farmacéutica de este, tal como se describió anteriormente y en la presente.

[000290] En otra modalidad, un anticuerpo anti-B7-H4 o fragmento de unión al antígeno de este, o una composición farmacéutica, se administra a un paciente (por ejemplo, un paciente humano) para aumentar la proliferación de linfocitos T, linfocitos T CD4+ o linfocitos T CD8+ en el paciente. En otra modalidad, un anticuerpo anti-B7-H4 o fragmento de unión al antígeno de este, o una composición farmacéutica, se administra a un paciente (por ejemplo, un paciente humano) para aumentar la producción de interferón gamma (IFN γ) en el paciente. En otra modalidad, un anticuerpo anti-B7-H4 o fragmento de unión al antígeno de este, o una composición farmacéutica, se administra a un paciente (por ejemplo, un paciente humano) para bloquear la actividad inhibidora de B7-H4 contra linfocitos T en el paciente. En otra modalidad, un anticuerpo anti-B7-H4 o fragmento de unión al antígeno de este, o una composición farmacéutica, se administra a un paciente (por ejemplo, un paciente humano) para agotar las células cancerosas que expresan B7-H4 en el paciente. En otra modalidad, el anticuerpo anti-B7-H4 o fragmento de unión al antígeno de este, o composición farmacéutica, se administra para lograr dos o más de los efectos anteriores.

[000291] En una modalidad determinada, se proporcionan en la presente métodos para tratar un cáncer, por ejemplo, un cáncer que expresa B7-H4. El método de tratamiento del cáncer puede comprender administrar un anticuerpo anti-B7-H4 o fragmento de unión al antígeno de este que se proporciona en la presente o una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo anti-B7-H4 o un fragmento de unión al antígeno de este que se proporciona en la presente a un paciente (por ejemplo, un paciente humano) que lo necesite.

[000292] En una modalidad determinada, se proporcionan en la presente métodos para tratar un cáncer que se selecciona del grupo que consiste en cáncer de mama (por ejemplo, cáncer de mama triple negativo, carcinoma ductal), carcinoma de endometrio, cáncer de ovario, cáncer de pulmón no microcítico (por ejemplo, carcinoma de células escamosas), cáncer de páncreas, cáncer de tiroides,

cáncer renal (por ejemplo, carcinoma de células renales) y cáncer de vejiga (por ejemplo, carcinoma de células uroteliales). En una modalidad determinada, se proporcionan en la presente métodos para tratar un cáncer de pulmón no microcítico que es un adenocarcinoma. En una modalidad determinada, se proporcionan en la presente métodos para tratar un cáncer que se selecciona del grupo que consiste en: cáncer de cabeza y cuello, cáncer de pulmón microcítico, cáncer gástrico, melanoma y colangiocarcinoma. En una modalidad, el cáncer de ovario es adenocarcinoma seroso. En una modalidad, el cáncer de mama es adenocarcinoma ductal. En algunas modalidades, dichos métodos comprenden administrar un anticuerpo anti-B7-H4 o fragmento de unión al antígeno de este que se proporciona en la presente o una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo anti-B7-H4 o un fragmento de unión al antígeno de este que se proporciona en la presente a un paciente (por ejemplo, un paciente humano) que lo necesite. En algunas modalidades, el cáncer es un cáncer que expresa B7-H4.

[000293] En una modalidad determinada, se proporciona en la presente un método para tratar un cáncer que es responde de forma inadecuada a un inhibidor de PD-1/PD-L1. Un cáncer que responde de manera inadecuada al inhibidor de PD-1/PD-L1 puede haber respondido anteriormente a un inhibidor de PD-1/PD-L1, pero puede haber comenzado a presentar una menor respuesta al inhibidor de PD-1/PD-L1, o el cáncer puede no haber respondido nunca al inhibidor de PD-1/PD-L1. La respuesta inadecuada a un inhibidor de PD-1/PD-L1 significa que los aspectos del cáncer que se esperaba que mejoraran después de una dosis estándar del inhibidor de PD-1/PD-L1 no mejoran y/o la mejora solamente se produce si se administra una dosis mayor que la estándar. En algunas modalidades, un sujeto con un cáncer que responde de manera inadecuada a un inhibidor de PD-1/PD-L1 ha experimentado, o experimenta, una respuesta inadecuada al inhibidor de PD-1/PD-L1 después de recibir una dosis estándar durante al menos dos semanas, al menos tres semanas, al menos cuatro semanas, al menos seis semanas o al menos doce semanas. Una dosis “estándar” es determinada por un profesional médico y puede depender de la edad, el peso y la historia clínica del sujeto, la gravedad de la enfermedad, la frecuencia de la administración de dosis, etc. En algunas modalidades, un sujeto con cáncer que responde de manera inadecuada a un inhibidor de PD-1/PD-L1 ha experimentado, o experimenta, una respuesta inadecuada a un anticuerpo anti-PD-1 y/o un anticuerpo anti-PD-L1. En algunas modalidades, un sujeto con cáncer que responde de manera inadecuada a un inhibidor de PD-1/PD-L1 ha experimentado, o experimenta, una respuesta inadecuada a AMP-224. En algunas modalidades, un sujeto con cáncer que responde de manera inadecuada a un inhibidor de PD-1/PD-L1 ha experimentado, o experimenta, una respuesta inadecuada a un inhibidor de PD-1/PD-L1 seleccionado de entre nivolumab, pembrolizumab y

atezolizumab.

[000294] En una modalidad determinada, se proporciona en la presente un método para tratar un cáncer que expresa un nivel bajo de PD-L1. En algunas modalidades, un cáncer que expresa un "nivel bajo de PD-L1" o expresa "PD-L1 a un nivel bajo", denota que el nivel de PD-L1 está por debajo del nivel de expresión para un cáncer que es indicado para el tratamiento con un antagonista de PD-1 o PD-L1 en donde los pacientes se seleccionan para el tratamiento basándose en los niveles de expresión de PD-L1. En algunas modalidades, un "nivel bajo de PD-L1" es aquel en el que menos de 1 % de las células en el tumor presentan tinción de membrana. En algunas modalidades, un "nivel bajo" con respecto a PD-L1 es menos que 1 % de tinción, por ejemplo, 0,9, 0,8, 0,7, 0,6, 0,5, 0,4, 0,3, 0,2, 0,1 % o 0 % de las células del tumor se tiñen. En algunas modalidades, es posible medir los niveles de expresión de PD-L1 mediante IHC cromogénica o IHC de inmunofluorescencia (calificación Aqua). En determinadas modalidades, la tinción con PD-L1 de 5 % o menos (incluso tumor y/o células inmunitarias) puede indicar que la muestra expresa un "nivel bajo de PD-L1". En determinadas modalidades, la tinción con PD-L1 de 10 % o menos (incluso tumor y/o células inmunitarias) puede indicar que la muestra expresa un "nivel bajo de PD-L1". A menos que se indique lo contrario en la presente, un umbral del 5 % se utiliza en la presente (es decir, 5 % o menos indica un "nivel bajo de PD-L1").

[000295] En otra modalidad, un anticuerpo anti-B7-H4 o fragmento de unión al antígeno de este, o una composición farmacéutica, se administra a un paciente (por ejemplo, un paciente humano) diagnosticado con cáncer para aumentar la proliferación de linfocitos T, linfocitos T CD4+ o linfocitos T CD8+ en el paciente. En otra modalidad, un anticuerpo anti-B7-H4 o fragmento de unión al antígeno de este, o una composición farmacéutica, se administra a un paciente (por ejemplo, un paciente humano) diagnosticado con cáncer para aumentar la producción de interferón gamma (IFN γ) en el paciente. En otra modalidad, un anticuerpo anti-B7-H4 o fragmento de unión al antígeno de este, o una composición farmacéutica, se administra a un paciente (por ejemplo, un paciente humano) diagnosticado con cáncer para bloquear la actividad inhibidora de B7-H4 contra linfocitos T en el paciente. En otra modalidad, un anticuerpo anti-B7-H4 o fragmento de unión al antígeno de este, o una composición farmacéutica, se administra a un paciente (por ejemplo, un paciente humano) diagnosticado con cáncer para agotar las células cancerosas que expresan B7-H4 en el paciente.

[000296] En modalidades adicionales, un anticuerpo anti-B7-H4 o fragmento de unión al antígeno de este, o composición farmacéutica, se administra a un paciente tal como se proporciona en la

presente, y, además, en composición farmacéutica con un agente terapéutico adicional, por ejemplo, un agente quimioterapéutico o un agente estimulante inmunitario, tal como un inhibidor de punto de control de linfocitos T.

[000297] En un ejemplo de modalidad, el agente terapéutico adicional es un antagonista de PD-1, tal como un anticuerpo antagonista de PD-1. Los anticuerpos de PD-1 adecuados incluyen, por ejemplo, OPDIVO (nivolumab), KEYTRUDA (pembrolizumab) o MEDI-0680 (AMP-514; WO2012/145493). Los anticuerpos de PD-1 adecuados también incluyen, por ejemplo, camrelizumab (SHR-1210), tislelizumab (BGB-A317) o spartalizumab (NPVPDR001, NVS240118, PDR001). El agente terapéutico adicional puede incluir además pidilizumab (CT-011). Una proteína recombinante compuesta por el dominio extracelular de PD-L2 (B7-DC) fusionado con la parte Fc de IgG1, denominada AMP-224, también puede utilizarse para antagonizar el receptor de PD-1.

[000298] En otro ejemplo de modalidad, el agente terapéutico adicional es un antagonista de PD-L1, tal como un anticuerpo antagonista de PD-L1. Los anticuerpos de PD-L1 adecuados incluyen, por ejemplo, TECENTRIQ (atezolizumab), durvalumab (MEDI4736), BMS-936559 (WO2007/005874), MSB0010718C (WO2013/79174) o rHigM12B7.

[000299] En otro ejemplo de modalidad, el agente terapéutico adicional es un agonista de GTR, tal como un anticuerpo de GTR agonista. Los anticuerpos de GTR adecuados incluyen, por ejemplo, TRX-518 (WO06/105021, WO09/009116), MK-4166 (WO11/028683) o un anticuerpo de GTR que se describe en WO2015/031667. En otra modalidad, el agente terapéutico adicional es un anticuerpo de GTR, descrito en WO2017/015623. En una molécula particular, el anticuerpo de GTR se selecciona de: a) un anticuerpo que comprende un dominio de unión a GTR (GTR-BD) que comprende una CDR1 que comprende la secuencia de la SEQ ID NO:411, una CDR2 que comprende la secuencia de la SEQ ID NO:412, y una CDR3 que comprende la secuencia de la SEQ ID NO:413; b) un anticuerpo que comprende un GTR-BD que comprende la secuencia de la SEQ ID NO:414; c) una molécula tetravalente que comprende dos copias de un polipéptido que tiene la estructura (GTR-BD)-Enlazador-(GTR-BD)-Enlazador-Bisagra-Fc, donde (i) donde el GTR-BD comprende una CDR1 que comprende la secuencia de la SEQ ID NO:411, una CDR2 que comprende la secuencia de la SEQ ID NO:412, y una CDR3 que comprende la secuencia de la SEQ ID NO:413, (ii) el Enlazador es un polipéptido, (iii) la Bisagra es un polipéptido que deriva de una región bisagra de inmunoglobulina y (iv) el Fc es un polipéptido Fc de inmunoglobulina; d) una molécula tetravalente que comprende dos copias de un polipéptido que tiene la estructura (GTR-BD)-Enlazador-(GTR-BD)-Enlazador-Bisagra-Fc, donde (i) el GTR-BD comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:414, (ii) el

Enlazador es un polipéptido, (iii) la Bisagra es un polipéptido que deriva de una región bisagra de inmunoglobulina y (iv) el Fc es un polipéptido Fc de inmunoglobulina; y e) una molécula tetravalente que comprende dos copias de un polipéptido que comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 415. En cualquiera de las modalidades anteriores de una molécula tetravalente, una Bisagra puede comprender la secuencia de la SEQ ID NO:416, 417 o 418. En cualquiera de las modalidades anteriores de una molécula tetravalente, un Enlazador puede comprender una secuencia de aminoácidos seleccionada de GG, GGG y SEQ ID NO:419-425. En determinadas modalidades, la Bisagra comprende la SEQ ID NO:417 y el Enlazador comprende cualquiera de las SEQ ID NO:419-423.

5

10

[000300] En otro ejemplo de modalidad, el agente terapéutico es un dominio extracelular CD80 (ECD (por sus siglas en inglés) CD80), por ejemplo, SEQ ID NO:426; o una molécula de fusión ECD CD80 que comprende ECD CD80 y un compañero de fusión, tal como se describe en WO2017/079117. En determinadas modalidades, la molécula de fusión ECD CD80 es una proteína de fusión ECD CD80-Fc. En una modalidad específica, la proteína de fusión ECD CD80-Fc comprende la secuencia de la SEQ ID NO:427 o 428.

15

20

25

[000301] En otro ejemplo de modalidad adicional, el agente terapéutico adicional es un anticuerpo anti-CSF1R descrito en US8,182,813, US8,206,715, US8,263,079, US8,513,199 o US9,221,910. En una molécula particular, el anticuerpo de anti-CSF1R se selecciona de: a) un anticuerpo que comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de la SEQ ID NO:429 y una cadena ligera que comprende la secuencia de la SEQ ID NO:430; b) un anticuerpo que comprende una cadena pesada que comprende una región determinante de la complementariedad 1 (CDR1) de cadena pesada (HC) que comprende la secuencia de la SEQ ID NO:431, una CDR2 HC que comprende la secuencia de la SEQ ID NO:432, y una CDR3 HC que comprende la secuencia de la SEQ ID NO:433, y una cadena ligera que comprende una CDR1 de cadena ligera (LC) que comprende la secuencia de la SEQ ID NO:434, una CDR2 LC que comprende la secuencia de la SEQ ID NO:435, y una CDR3 LC que comprende la secuencia de la SEQ ID NO:436; y c) un anticuerpo que comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de la SEQ ID NO:437 y una cadena ligera que comprende la secuencia de la SEQ ID NO:438.

30

[000302] Generalmente, el paciente es un ser humano, pero también se pueden tratar mamíferos no humanos incluido mamíferos transgénicos.

[000303] En algunas modalidades, la presente invención se refiere a un anticuerpo o fragmento de

unión al antígeno de este o composición farmacéutica que se proporciona en la presente para su uso como un medicamento. En algunos aspectos, la presente invención se refiere a un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este o composición farmacéutica que se proporciona en la presente para su uso en un método para el tratamiento del cáncer. En algunos aspectos, la presente invención se refiere a un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este o composición farmacéutica que se proporciona en la presente, para su uso en un método para el tratamiento de cáncer en un sujeto, que comprende administrarle al sujeto una cantidad eficaz de un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este o una composición farmacéutica que se proporciona en la presente.

10 **1.4.1.1 Vías de administración y dosificación**

[000304] Un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este o composición descrita en la presente puede administrarse a un sujeto mediante una variedad de vías, tal como parenteral, subcutánea, intravenosa, intradérmica, transdérmica, intranasal, intratumoral y administración a un ganglio linfático que drena un tumor. En una modalidad, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este o composición se administra por vía intravenosa.

[000305] La cantidad de un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este o composición que será eficaz en el tratamiento de una afección dependerá de la naturaleza de la enfermedad. La dosis precisa que debe emplearse en una composición también dependerá de la vía de administración y la gravedad de la enfermedad.

20 **1.4.2 Usos para detección y diagnóstico**

[000306] Un anticuerpo anti-B7-H4 o fragmento de unión al antígeno de este descrito en la presente también (véase, por ejemplo, la Sección 5.2) se puede usar para evaluar los niveles de proteína B7-H4 humana en una muestra biológica mediante el uso de métodos clásicos conocidos por los expertos en la técnica, que incluyen inmunoensayos, tales como el ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA, por sus siglas en inglés), inmunoprecipitación o inmunotransferencia Western. Las etiquetas de ensayo de anticuerpo adecuadas son conocidas en la técnica e incluyen las etiquetas de enzima, tales como oxidasa de glucosa, radioisótopos, tales como yoduro (¹²⁵I, ¹²¹I), carbono (¹⁴C), azufre (³⁵S), tritio (³H), indio (¹²¹In) y tecnecio (⁹⁹Tc); etiquetas luminiscentes, tales como luminol, y etiquetas fluorescentes, tales como fluoresceína y rodamina, y biotina. Dichas etiquetas se pueden usar para marcar un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este descrito en la presente. De manera alternativa, un segundo anticuerpo o fragmento

de unión al antígeno de este que reconoce un anticuerpo anti-B7-H4 o fragmento de unión al antígeno de este descrito en la presente puede marcarse y utilizarse en combinación con un anticuerpo anti-B7-H4 o fragmento de unión al antígeno de este para detectar los niveles de proteína B7-H4.

5 [000307] Se pretende que el análisis del nivel de expresión de proteína B7-H4 incluya medir o calcular de forma cualitativa o cuantitativa el nivel de una proteína B7-H4 en una primera muestra biológica de forma directa (por ejemplo, al determinar o calcular el nivel absoluto de proteína) o de forma relativa (por ejemplo, al comparar con el nivel de proteína asociada a la enfermedad en una segunda muestra biológica). El nivel de expresión de polipéptido B7-H4 en la primera muestra
10 biológica se puede medir o calcular y comparar con un nivel de proteína B7-H4 estándar, donde el estándar se toma de una segunda muestra biológica obtenida de un individuo que no presenta el trastorno o que se determina promediando los niveles de una población de individuos que no presentan el trastorno. Como se reconocerá en la técnica, una vez que se conoce el nivel de polipéptido B7-H4 "estándar", se puede usar reiteradamente como estándar para comparación.

15 [000308] Como se usa en la presente, la expresión "muestra biológica" se refiere a cualquier muestra biológica obtenida de un sujeto, línea celular, tejido u otra fuente de células que expresen potencialmente B7-H4. Los métodos para obtener biopsias de tejido y fluidos corporales de animales (por ejemplo, seres humanos) son conocidos en la técnica. Las muestras biológicas incluyen células de sangre mononuclear periférica. Una muestra biológica puede ser una muestra de sangre, en la
20 cual se las células tumorales en circulación (o "CTC", por sus siglas en inglés) pueden expresar B7-H4 y ser detectadas.

[000309] Se puede usar un anticuerpo anti-B7-H4 descrito en la presente para aplicaciones de pronóstico, diagnóstico, control y análisis, que incluyen las aplicaciones in vitro e in vivo conocidas y estándar para el experto en la técnica y que se basan en la presente descripción. Se pueden usar
25 ensayos de pronóstico, diagnóstico, control y análisis y kits para la evaluación in vitro del estado del sistema inmunitario y/o la respuesta inmunitaria para predecir, diagnosticar y controlar a los efectos de evaluar las muestras de los pacientes que incluyen los que se sabe que padecen o se sospecha que padecen una disfunción del sistema inmunitario o cáncer. Este tipo de control y evaluación de pronóstico y diagnóstico ya está siendo implementado mediante el uso de anticuerpos contra la
30 proteína HER2 en cáncer de mama (HerceptTest™, Dako) donde el ensayo también se utiliza para evaluar a los pacientes para la terapia con anticuerpos usando Herceptin®. Las aplicaciones in vivo incluyen terapia celular dirigida y modulación del sistema inmunitario y radioimagenología de las

respuestas inmunitarias.

[000310] Los anticuerpos anti-B7-H4 y fragmentos de unión al antígeno de estos descritos en la presente pueden portar una etiqueta funcional o detectable. Cuando se utilizan etiquetas fluorescentes, se puede usar el análisis de selección de células activadas por fluorescencia (FACS, por sus siglas en inglés) y microscopio, o una combinación de ambos procedimientos metodológicos conocidos en la técnica para identificar y cuantificar los miembros de unión específicos. Los anticuerpos anti-B7-H4 o fragmentos de unión al antígeno de estos descritos en la presente pueden portar una etiqueta fluorescente. Los ejemplos de etiquetas fluorescentes incluyen, por ejemplo, sondas reactivas y conjugadas, por ejemplo, Aminocoumarina, Fluoresceína y rojo de Texas, tintes Alexa Fluor, tintes Cy y tintes DyLight. Un anticuerpo anti-B7-H4 puede portar una etiqueta radiactiva, tales como los isótopos ^3H , ^{14}C , ^{32}P , ^{35}S , ^{36}Cl , ^{51}Cr , ^{57}Co , ^{58}Co , ^{59}Fe , ^{67}Cu , ^{90}Y , ^{99}Tc , ^{111}In , ^{117}Lu , ^{121}I , ^{124}I , ^{125}I , ^{131}I , ^{198}Au , ^{211}At , ^{213}Bi , ^{225}Ac y ^{186}Re . Cuando se usan etiquetas radioactivas, los procedimientos de conteo actualmente disponibles conocidos en la técnica se pueden utilizar para identificar y cuantificar la unión específica de anticuerpo anti-B7-H4 o fragmento de unión al antígeno de este a B7-H4 (por ejemplo, B7-H4 humana). En el caso en que la etiqueta sea una enzima, la detección se puede lograr mediante cualquiera de las técnicas colorimétricas, espectrofotométricas, fluoroespectrofotométricas, amperométricas o gasométricas utilizadas actualmente conocidas en la técnica. Esto se puede lograr al poner en contacto una muestra o una muestra de control con un anticuerpo anti-B7-H4 o fragmento de unión al antígeno de este en condiciones que permitan la formación de un complejo entre el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este y B7-H4. Cualquier complejo formado entre el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este y B7-H4 se detectan y comparan en la muestra y el control. En vista de la unión específico de los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno de estos descritos en la presente para B7-H4, los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno de estos pueden utilizarse para detectar especialmente la expresión de B7-H4 en la superficie de las células. Los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno de estos descritos en la presente también pueden utilizarse para purificar B7-H4 por medio de purificación por inmunoadinidad.

[000311] También se incluye en la presente un sistema de ensayo que puede prepararse en la forma de un kit de prueba para el análisis cuantitativo de la extensión de la presencia, por ejemplo, de B7-H4. El sistema o kit de prueba puede comprender un componente marcado, por ejemplo, un anticuerpo marcado o fragmento de unión al antígeno de este, y uno o más reactivos inmunoquímicos adicionales. Véase, por ejemplo, la Sección 5.6 más adelante por más kits.

[000312] En aspecto, los métodos para detectar B7-H4 en una muestra in vitro comprenden poner en contacto dicha muestra con un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este que se proporciona en la presente. En algunos aspectos, se proporciona en la presente el uso de un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este que se proporciona en la presente, para la detección in vitro de B7-H4 en una muestra. En un aspecto, se proporciona en la presente un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este o una composición farmacéutica que se proporciona en la presente para su uso en la detección de B7-H4 en un sujeto o una muestra obtenida del sujeto. En un aspecto, se proporciona en la presente un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este o una composición farmacéutica que se proporciona en la presente para su uso como diagnóstico. En una modalidad preferida, el anticuerpo comprende una etiqueta detectable. En una modalidad preferida, B7-H4 es B7-H4 humana. En una modalidad preferida, el sujeto es un ser humano.

1.5 Kits

[000313] Se proporcionan en la presente kits que comprenden uno o más anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno de estos descritos en la presente o conjugados de estos. En una modalidad específica, en la presente se proporciona un paquete o kit farmacéutico que comprende uno o más recipientes rellenos con uno o más de los ingredientes de las composiciones farmacéuticas descritas en la presente, tales como uno o más anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno de estos que se proporcionan en la presente. En asociación con dicho o dichos recipientes se puede incluir una nota de la forma prescrita por un organismo gubernamental que regule la fabricación, el uso o la venta de productos farmacéuticos o biológicos, que refleje la aprobación por parte del organismo con respecto a la fabricación, el uso o la venta para administración a seres humanos.

[000314] Además, se proporcionan en la presente kits que se pueden usar en métodos de diagnóstico. En una modalidad, un kit comprende un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este descrito en la presente, preferentemente un anticuerpo purificado o fragmento de unión al antígeno de este, en uno o más recipientes. En una modalidad específica, los kits descritos en la presente contienen un antígeno de B7-H4 (por ejemplo, B7-H4 humana) que puede utilizarse como control. En otra modalidad específica, los kits descritos en la presente comprenden un anticuerpo de control o fragmento de unión al antígeno de este que no reacciona con un antígeno de B7-H4. En otra modalidad específica, los kits descritos en la presente contienen uno o más elementos para

detectar la unión de un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este a un antígeno de B7-H4 (por ejemplo, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este puede estar conjugado con un sustrato detectable, tal como un compuesto fluorescente, un sustrato enzimático, un compuesto radiactivo o un compuesto luminiscente, o un segundo anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este que reconozca el primer anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este puede conjugarse con un sustrato detectable). En modalidades específicas, un kit que se proporciona en la presente puede incluir un antígeno de B7-H4 producido por medios recombinantes o sintetizado por medios químicos. El antígeno de B7-H4 que se proporciona en el kit también se puede unir a un soporte sólido. En una modalidad más específica, el medio de detección del kit descrito anteriormente incluye un soporte sólido al cual se une un antígeno de B7-H4. Dicho kit puede incluir además un anticuerpo marcado con reportero no unido anti-humano o un fragmento de unión al antígeno de este o un anticuerpo anti-ratón/rata o un fragmento de unión al antígeno de este. En esta modalidad, la unión del anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este al antígeno de B7-H4 puede detectarse mediante la unión de dicho anticuerpo marcado con reportero o fragmento de unión al antígeno de este.

[000315] Los siguientes ejemplos se ofrecen a modo de ilustración y no a modo de limitación.

EJEMPLOS

[000316] Los ejemplos en esta Sección (es decir, Sección 6) se proporcionan a modo ilustrativo y no taxativo.

Ejemplo 1: Evaluación de la prevalencia de la expresión de B7-H4 en múltiples indicaciones

[000317] El anticuerpo monoclonal de ratón B7-H4 A57.1 (n.º de catálogo de ATCC PTA-5180) se utilizó para detectar la presencia de B7-H4 en muestras de archivo, una mezcla de secciones enteras y micromatrices tumorales. Las muestras se trataron con el anticuerpo primario y se detectaron mediante el uso de un sistema de detección de polímero unido a DAB (Ventana Medical Systems).

[000318] Se detectó fácilmente B7-H4 en la membrana y el citosol en tejidos tumorales recogidos de una variedad de pacientes con cáncer, incluso carcinoma ductal invasivo, cáncer de mama triple negativo, cáncer de ovario, cáncer de pulmón no microcítico y cáncer de endometrio. (Figura 1). Además, la frecuencia de expresión también fue elevada en las indicaciones enumeradas en la Tabla 11.

Tabla 11: Detección de B7-H4 en tumores

Tipo de tumor	N.º total	N.º de positivos	Porcentaje positivo
Cáncer de mama triple negativo	74	58	78 %
Carcinoma ductal invasivo	51	38	74,50 %
Carcinoma de endometrio	77	54	70 %
Cáncer de ovario	141	85	60 %
Cáncer de pulmón no microcítico (escamoso)	47	19	40 %

[000319] B7-H4 se expresa en otros cánceres, tal como cáncer renal (por ejemplo, carcinoma de células renales), cáncer de vejiga (por ejemplo, carcinoma de células uroteliales), cáncer de páncreas y cáncer de tiroides. Véase, por ejemplo, Zhu, J., et ál., Asian Pacific J. Cancer Prev. 14: 3011-3015 (2011), Krambeck A, et ál., PNAS 103: 10391-10396 (2006), Fan, M. et ál., Int. J. Clin. Exp. Pathol. 7: 6768-6775 (2014), Xu, H., et ál., Oncology Letters 11: 1841-1846 (2016), y Liu, W., et ál., Oncology Letters 8: 2527-2534 (2014)).

[000320] En un experimento posterior, se evaluó la prevalencia de B7-H4 en tipos tumorales mediante inmunohistoquímica (IHC) (Figura 1B). Los siguientes tipos de tumor y etapas de la enfermedad se evaluaron: endometrio, carcinoma ductal invasivo (IDC, por sus siglas en inglés) de mama, de mama triple negativo (TN), de mama triple negativo (etapa tardía), cáncer de ovario, cáncer de vejiga (etapa temprana), cáncer de pulmón no microcítico (sq (escamoso), etapa temprana), cáncer de pulmón no microcítico (sq, etapa tardía), cáncer de cabeza y cuello, de vejiga (etapa tardía), cáncer de pulmón microcítico, colangiocarcinoma, cáncer de pulmón no microcítico (ad (adenocarcinoma)), cáncer de tiroides, cáncer de páncreas, cáncer gástrico, melanoma, glioblastoma o glioblastoma multiforme (GBM), y carcinoma de células de Merkel. La expresión de proteína de superficie B7-H4 en células tumorales se evaluó en muestras tumorales obtenidas de diversos tipos de tumores y etapas de enfermedad cuando fue posible (etapa tardía (I/II), etapa tardía (III/IV)). La intensidad de IHC con el anticuerpo A57.1 se puntuó por categoría 0 a 3, y a las muestras se les atribuyó un puntaje de IHC único mediante la intensidad más elevada observada en un mínimo de

10 % de las células tumorales por sección entera. Se evaluó un total de 50 a 100 muestras por tipo de tumor.

Ejemplo 2: Generación de anticuerpos novedosos contra B7-H4 humana

[000321] Se aislaron anticuerpos específicos de B7-H4 a partir de bibliotecas de anticuerpos sin
5 tratamiento de IgG1 humana de longitud completa mediante el uso de un sistema de expresión de
levadura in vitro. Las bibliotecas se diseñan para imitar el sistema inmunitario; no contienen pares
predefinidos de cadena pesada y ligera. Las bibliotecas se someten a múltiples rondas de
estrategias de selección positiva y negativa mediante el uso de la proteína B7-H4 para enriquecerse
para IgG que tenía reactividad cruzada con el B7-H4 humana, de mono cynomolgus y murina
10 objetivo. Después de cuatro rondas de selección, la IgG resultante se secuenció y se produjeron y
evaluaron anticuerpos únicos tanto para unión ávida como monomérica con el ectodominio de B7-H4
recombinante, para la clasificación de epítomos y para la unión celular específica del objetivo.

[000322] Se proporciona a continuación una descripción más detallada de la selección, maduración
de afinidad y métodos analíticos utilizados para generar y caracterizar los anticuerpos de B7-H4

Materiales y métodos

[000323] Se biotinilaron los antígenos mediante el uso del kit EZ-Link Sulfo-NHS-Biotinylation de
Pierce. Se obtuvieron F(ab')₂ de cabra anti-humano kappa-FITC (LC-FITC), ExtrAvidin-PE (EA-PE) y
Estreptavidina-AF633 (SA-633) de Southern Biotech, Sigma y Molecular Probes, respectivamente. Se
obtuvieron columnas de separación MACS LC y microperlas de estreptavidina de Miltenyi Biotec. IgG
20 anti humana de cabra-PE (PE humano) se obtuvo de Southern Biotech.

Descubrimiento sin tratamiento

[000324] Se propagaron ocho bibliotecas de levadura sintética humana sin tratamiento, cada uno con
una diversidad de ~10⁹, según se describió previamente (véase, Y. Xu et ál., Addressing
polyspecificity of antibodies selected from an in vitro yeast presentation system: a FACS-based, high-
25 throughput selection and analytical tool. PEDS 26.10, 663-70 (2013); WO2009036379;
WO2010105256; y WO2012009568.) Para las primeras dos rondas de selección, se realizó una
técnica de clasificación de perlas magnéticas mediante el uso del sistema Miltenyi MACS, según se
describió previamente (véase Siegel et ál., High efficiency recovery and epitope-specific sorting of an
scFv yeast display library." J Immunol Methods 286(1-2), 141-153 (2004).) Brevemente, las células
30 de levadura (~10¹⁰ células/biblioteca) se incubaron con 10 ml de antígeno de fusión Fc biotinilado 10

nM durante 30 minutos a 30 °C en amortiguador de lavado (solución salina amortiguada con fosfato (PBS, por sus siglas en inglés)/albúmina de suero bovino (BSA, por sus siglas en inglés) al 0,1 %). Después de lavar una vez con 40 ml de amortiguador de lavado en agua fría, el sedimento celular se volvió a suspender en 20 mL de amortiguador de lavado, y se agregaron microperlas de estreptavidina (500 µl) a la levadura y se incubó durante 15 minutos a 4 °C. A continuación, la levadura se granuló, se volvió a suspender en 20 mL de amortiguador de lavado y se cargó en una columna LS de Miltenyi. Después de cargar los 20 mL, la columna se lavó 3 veces con 3 ml de amortiguador de lavado. Después, la columna se removi6 del campo magnético y la levadura se eluyó con 5 mL de medio de cultivo y después se cultivó durante la noche. Se llevaron a cabo las siguientes rondas de selección mediante el uso de citometría de flujo. Se sedimentaron aproximadamente 2×10^7 de levadura, se lavaron tres veces con amortiguador de lavado y se incubaron a 30 °C ya sea con concentraciones en descenso de antígeno de fusión Fc biotinilado (10 a 1 nM) en condiciones de equilibrio, antígenos de fusión Fc biotinilados 10 nM de diferentes especies para obtener reactividad cruzada de especies, o con un reactivo de agotamiento con poliespecificidad (PSR, por sus siglas en inglés) para eliminar los anticuerpos no específicos de la selección. Para el agotamiento PSR, se incubaron las bibliotecas con una dilución 1:10 de reactivo PSR biotinilado según se describió previamente (véase, Y. Xu et ál., addressing polyspecificity of antibodies selected from an in vitro yeast presentation system: a FACS-based, high-throughput selection and analytical tool. PEDS 26.10, 663-70 (2013)). Después la levadura se lavó dos veces con amortiguador de lavado y se tiñó con LC-FITC (diluido 1:100) y ya sea SA-633 (diluido 1:500) o EAPE (diluido 1:50), reactivos secundarios, durante 15 minutos a 4 °C. Después de lavar dos veces con amortiguador de lavado, los sedimentos celulares se volvieron a suspender en 0,3 mL de amortiguador de lavado y se transfirieron a tubos de clasificación con tapón con filtro. La clasificación se llevó a cabo con un clasificador FACS ARIA (BD Biosciences) y se determinaron compuertas de clasificación para seleccionar los anticuerpos con las características deseadas. Las rondas de selección se repitieron hasta obtener una población con todas las características deseadas. Después de la ronda final de clasificación, la levadura se colocó en placas y se eligieron colonias individuales para su caracterización.

Optimización de anticuerpos

[000325] La optimización de los anticuerpos se realizó por medio del método de aleatorización de lote de cadena ligera y después mediante la introducción de diversidades en las regiones variables de cadena ligera y cadena pesada, tal como se describe a continuación. Se utilizó una combinación de algunos de estos abordajes para cada anticuerpo.

[000326] Aleatorización de lote de cadena ligera: Se extrajeron plásmidos de cadena pesada del producto de selección sin tratamiento de la levadura por medio de toma con ruptura, se propagaron en *E. coli* y se purificaron posteriormente de esta y se transformaron en una biblioteca de cadena ligera con una diversidad de 5×10^6 . Se realizaron selecciones con una ronda de MACS y cuatro rondas de MACS mediante el uso de las mismas condiciones que el descubrimiento sin tratamiento.

[000327] Selección de CDRH1 y CDRH2: La CDRH3 de un anticuerpo individual se combinó con una biblioteca prehecha con variantes de CDRH1 y CDRH2 con una diversidad de 1×10^8 y se realizaron las selecciones con una ronda de MACS y cuatro rondas de FACS, tal como se describe en el descubrimiento sin tratamiento. Para cada ronda de FACS las bibliotecas se exploraron para detectar unión PSR, reactividad cruzada de especies y presión de afinidad, y se realizó una clasificación para obtener una población con las características deseadas. Para estas selecciones, se aplicaron presiones de afinidad mediante el uso de concentraciones descendentes de antígeno HIS-B7-H4 biotinilado (100 a 1 nM) en condiciones de equilibrio a 30 °C.

[000328] Selección de VH Mut: La región variable de cadena pesada (VH) se mutagenizó por medio de PCR susceptible a error. La biblioteca entonces se creó mediante la transformación de esta VH mutagenizada y el vector de expresión de cadena pesada en levadura que ya contenía el plásmido de cadena ligera del original. Se realizaron las selecciones de forma similar a los ciclos anteriores mediante el uso de clasificación por FACS durante dos rondas. Para cada ronda de FACS las bibliotecas se exploraron para detectar unión PSR y presión de afinidad, y se realizó una clasificación para obtener una población con las características deseadas. Las presiones de afinidad para estas selecciones se realizaron de la forma descrita anteriormente en la selección de CDRH1 y CDRH2.

[000329] Selección de CDRL1 y CDRL2: La CDRL3 de un anticuerpo individual se combinó con una biblioteca prehecha con variantes de CDRL1 y CDRL2 con una diversidad de 5×10^5 y se realizaron de forma similar a los ciclos anteriores mediante el uso de clasificación por FACS durante tres rondas. Para cada ronda de FACS las bibliotecas se exploraron para detectar unión PSR y presión de afinidad, y se realizó una clasificación para obtener una población con las características deseadas. Las presiones de afinidad para estas selecciones se realizaron de la forma descrita anteriormente en la selección de CDRH1 y CDRH2.

Producción y purificación de anticuerpos

[000330] Los clones de levadura se cultivaron hasta saturación y después se indujeron durante 48 horas a 30 °C con agitación. Después de la inducción, se sedimentaron las células de levadura y los

sobrenadantes se cultivaron para su purificación. Las IgG se purificaron con una columna de Proteína A y se eluyeron con ácido acético, pH 2,0. Los fragmentos Fab se generaron mediante digestión de papaína y se purificaron en KappaSelect (GE Healthcare LifeSciences).

Mediciones de K_D de ForteBio:

5 [000331] Se realizaron medición de afinidad de ForteBio en un Octet RED384 generalmente de la forma que se describió previamente (véase Estep et ál., High throughput solution-based measurement of antibody-antigen affinity and epitope binning. *Mabs* 5(2), 270-278 (2013)). Brevemente, se llevaron a cabo medidas de afinidad de ForteBio mediante la carga en línea de las IgG a los sensores AHQ. Los sensores se equilibraron fuera de línea en amortiguador de ensayo
10 durante 30 minutos y después se controlaron en línea durante 60 segundos para el establecimiento de una referencia. Los sensores con las IgG cargadas se expusieron a antígeno 100 nM durante 3 minutos y después se transfirieron a un amortiguador de ensayo durante 3 minutos para medir su disociación. Para la evaluación de afinidad monovalente se utilizaron en su lugar IgG. Para esta evaluación se cargó el antígeno de fusión Fc biotinilado en línea en los sensores AHQ. Los sensores
15 se equilibraron fuera de línea en amortiguador de ensayo durante 30 minutos y después se controlaron en línea durante 60 segundos para el establecimiento de una referencia. Los sensores con antígeno cargado se expusieron a Fab100 nM durante 3 minutos y después se transfirieron a un amortiguador de ensayo durante 3 minutos para medir su disociación. Se analizó toda la cinética con el modelo de unión 1:1.

Clasificación de epítomos/bloqueo de ligandos ForteBio

[000332] Se realizó la clasificación de epítomos/bloqueo de ligandos mediante el uso de un ensayo de bloqueo cruzado con formato sándwich estándar. Se cargó IgG antiobjetivo de control en los sensores de AHQ y se bloquearon los sitios de unión a Fc no ocupados en el sensor con un anticuerpo de IgG1 humana irrelevante. Entonces, se expusieron los sensores a antígeno diana
25 100 nM, seguido de un segundo anticuerpo antiobjetivo o ligando. La unión adicional del segundo anticuerpo o ligando después de la asociación del antígeno indica un epítomo no ocupado (no competidor) y la ausencia de unión indica el bloqueo del epítomo (competidor o bloqueo de ligando).

[000333] Se utilizaron cuatro anticuerpos no competitivos (“anticuerpos de clasificación” 1, 2, 3 y 4) para identificar cuatro partes distintas del ectodominio de B7-H4 mediante SPR. Todos los anticuerpos generados durante esta campaña se evaluaron entonces para detectar la unión
30 competitiva de estos cuatro anticuerpos de clasificación al ectodominio de B7-H4. Si un anticuerpo

de B7-H4 competía con uno de los cuatro anticuerpos de clasificación (por ejemplo, anticuerpo de clasificación 1), se determinó que el anticuerpo de B7-H4 se encontraba en ese GRUPO (por ejemplo, GRUPO 1). Si un anticuerpo de B7-H4 competía con dos de los cuatro anticuerpos de clasificación (por ejemplo, anticuerpos de clasificación 2 y 3), se determinó que el anticuerpo de B7-H4 se encontraba en ambos GRUPOS (por ejemplo, GRUPO 2/3).

[000334] Los anticuerpos de IgG caían en al menos cuatro grupos de clasificación, con > 90 % de los anticuerpos unidos a B7-H4 humana/de cyno o ratón con una respuesta de afinidad que oscilaba entre >0,1 nM y <100 nM. De los aglutinantes de proteína recombinante, aproximadamente 75 % también se unían a B7-H4 en células.

10 **Análisis de unión celular**

[000335] Se lavaron 100 000 células que sobreexpresan el antígeno con amortiguador de lavado y se incubaron con 100 µl de IgG 100 nM durante 5 minutos a temperatura ambiente. Las células se lavaron entonces dos veces con amortiguador de lavado y se incubaron con 100 µl de IgGPE anti-humana 1:100 durante 15 minutos en hielo. Se lavaron entonces las células dos veces con amortiguador de lavado y se analizaron en un analizador FACS Canto II (BD Biosciences).

Ensayo de unión PSR

[000336] El ensayo PSR se realizó como se describió previamente (véase Xu Y, et ál. (2013) Addressing polyspecificity of antibodies selected from an in vitro yeast presentation system: A FACS-based, high-throughput selection and analytical tool. *Protein Eng Des Sel* **26(10)**:663–670). A grandes rasgos, se prepararon proteínas de membrana soluble a partir de células CHO. La fracción de membrana enriquecida se biotiniló mediante el uso de NHS-LCBiotina (Pierce, Thermo Fisher). Este reactivo de poliespecificidad se incubó con IgG-levadura de expresión, seguida por lavado. Después se agregó a la mezcla una mezcla de etiquetado secundario (Extravidina-R-PE, LC-FITC anti-humana y yoduro de propidio). Se analizaron las muestras en un analizador FACSCanto II (BD Biosciences) mediante el uso de un inyector de muestras HTS. Los datos de citometría de flujo se analizaron para la intensidad de fluorescencia promedio (MFI, por sus siglas en inglés) en el canal R-PE para evaluar la unión no específica. Los valores de MFI se normalizaron de 0 a 1 basándose en tres anticuerpos de referencia que presentaban valores de MFI PSR bajos, medios y altos.

Fluorimetría de barrido dinámico

[000337] Se agregaron 10 µL de 20x naranja Sypro a 20 µL de 0,2-1mg/mL de solución Fab o mAb.

Se utilizó un instrumento RT-PCR (BioRad CFX96 RT PCR) para elevar la temperatura de la placa de muestra de 40 a 95 C con un incremento de 0,5 C, con 2 minutos de equilibrio a cada temperatura. Se utilizó el valor negativo de la primera derivada para los datos sin procesar para extraer Tm.

AC-SINS

- 5 [000338] El ensayo AC-SINS se realizó de la forma descrita previamente (véase Lui Y, et ál., (2014) High-throughput screening for developability during early-stage antibody discovery using self-interaction nanoparticle spectroscopy. *MAbs* **6(2)**:483–492). A grandes rasgos, se recubrieron nanopartículas de oro (Ted Pella Inc.) con 80 % de IgG Fc de cabra anti-humana de captura (Jackson ImmunoResearch) y 20 % con anticuerpo policlonal no específico de cabra (Jackson ImmunoResearch). Se incubaron entonces los anticuerpos de interés con las partículas durante 2
10 horas y el desplazamiento de longitud de onda se midió mediante el uso de Molecular Devices SpectraMax M2 con el software SoftMax Pro6. Los clones de autointeracción mostraron un desplazamiento de longitud de onda mayor que se alejó de la muestra de PBS.

15 Ejemplo 3: Caracterizado estructural de anticuerpos monoclonales humanos contra B7-H4

- [000339] Los anticuerpos de B7-H4 son el isotipo de kappa/IgG1 humana. Las regiones variables de cadena pesada (VH) comprendían alelos de VH1, VH3 y VH4 de genes de línea germinal, y la ligera variable (VL) de alelos de genes de la línea germinal que incluían Vk1 y Vk3. Algunos subconjuntos de los anticuerpos comparten una identidad elevada dentro de las regiones de CDR respectivas de la
20 VH y VL que pueden oscilar entre 72-100 %. Los anticuerpos que comparten el mismo alelo de línea germinal tienen una identidad elevada en sus regiones marco (FR) de VH y VL que oscila entre 88-100 %. Las secuencias de anticuerpos de B7-H4 se proporcionan en las Tablas 1-10.

Ejemplo 4: Caracterización de la unión de anticuerpo monoclonal a la proteína B7-H4

- 25 [000340] Las afinidades de unión de anticuerpos anti-B7-H4 al dominio extracelular (ECD) de B7-H4 se determinó mediante interferometría de biocapa (BLI, por sus siglas en inglés). Los ensayos de afinidad ForteBio se describen en mayor detalle en el Ejemplo 2. Brevemente, la proteína recombinante humana B7-H4-huIgG1 (SEQ ID NO:409) se inmovilizó en puntas de Proteína A, seguida por hIgG1 de isotipo de control para saturar cualquier sitio de unión restante en la punta de

captura. Los anticuerpos anti-B7-H4 se evaluaron entonces para verificar la unión. Además, también se evaluó la unión del anticuerpo con B7-H4 de mono cynomolgus (SEQ ID NO: 2) y ratón (SEQ ID NO: 3) mediante el uso del mismo protocolo. Los resultados se resumen en la Tabla 12.

B7-H4-hulgG1:

5 MASLGQILFWSIISIIILAGAIALIIGFGISGRHSITVTTVASAGNIGEDGILSCTFEPDIKLSDIVIQWLKEG
VLGLVHEFKEGKDELSEQDEMFRGRTAVFADQVIVGNASRLKLVQLTDAGTYKCYIITSKGKGNANL
EYKTGAFSMPEVNVNDYNASSETLRCEAPRWFPQPTVVWASQVDQGANFSEVSNTSFELNSENVTM
KVVSVLYNVTINNTYSCMIENDIAKATGDIKVTSEIKRRSHLQLLSKASGSEPKSSDKTHTCPPCPA
10 PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS
TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLT
CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL
HNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:409)

Tabla 12: Unión del anticuerpo de B7-H4 al dominio extracelular mediante interferometría de biocapa

15

		B7-H4 humana			B7-H4 de mono cynomolgus			B7-H4 de ratón		
Anticuerpo	GRUPO	K_D (M)	k_{on} (1/Ms)	k_{off} (1/s)	K_D (M)	k_{on} (1/Ms)	k_{off} (1/s)	K_D (M)	k_{on} (1/Ms)	k_{off} (1/s)
15441	2	7,15E-09	1,22E+06	8,72E-03	5,46E-08	1,33E+06	7,27E-02	NB	-	-
15461	2/3	6,29E-08	3,81E+05	2,40E-02	6,21E-08	4,34E+05	2,70E-02	5,57E-08	3,05E+05	1,70E-02
15462	2/3	PF	-	-	6,65E-08	6,72E+05	4,47E-02	8,31E-08	4,59E+05	3,81E-02

15465	2/3	5,13E-08	4,84E+05	2,48E-02	5,11E-08	5,44E+05	2,78E-02	8,96E-08	2,96E+05	2,65E-02
15472	4	7,11E-09	7,00E+05	4,97E-03	7,80E-09	7,46E+05	5,82E-03	3,80E-08	4,22E+05	1,60E-02
15478	4	3,25E-08	4,77E+05	1,55E-02	3,11E-08	5,44E+05	1,69E-02	NB	-	-
15483	2/3	PF	-	-	1,08E-07	3,80E+05	4,09E-02	2,63E-07	2,65E+05	6,95E-02
15489	2/3	6,37E-08	3,66E+05	2,33E-02	7,21E-08	3,98E+05	2,87E-02	2,01E-07	2,93E+05	5,90E-02
15495	2	9,44E-09	2,89E+06	2,72E-02	5,17E-09	3,25E+06	1,68E-02	NB	-	-
15503	2	1,04E-08	1,96E+06	2,05E-02	6,32E-09	1,82E+06	1,15E-02	NB	-	-
20496	otro	8,05E-10	6,89E+05	5,55E-04	7,21E-10	7,90E+05	5,69E-04	2,46E-08	6,92E+05	1,71E-02
20500	3	5,97E-09	3,91E+05	2,33E-03	5,47E-09	4,18E+05	2,29E-03	8,25E-09	4,08E+05	3,36E-03
20501	3	2,56E-09	9,80E+05	2,51E-03	2,42E-09	1,02E+06	2,46E-03	3,35E-09	1,12E+06	3,75E-03
20502	3	1,20E-09	9,36E+05	1,15E-03	1,20E-09	9,62E+05	1,12E-03	3,40E-09	6,32E+05	2,13E-03

20502.1	3	3,07E-09	4,87E+05	1,50E-03	2,64E-09	5,28E+05	1,39E-03	3,99E-09	5,20E+05	2,07E-03
20506	3	1,69E-09	4,41E+05	7,46E-04	1,48E-09	4,58E+05	6,78E-04	3,53E-09	4,66E+05	1,64E-03
20513	3	3,98E-09	4,53E+05	1,80E-03	3,67E-09	4,91E+05	1,80E-03	4,57E-09	5,17E+05	2,36E-03
20516	3	1,80E-08	4,10E+05	7,38E-03	1,76E-08	4,45E+05	7,83E-03	4,14E-08	3,98E+05	1,65E-02
22208	3	5,67E-09	1,84E+05	1,04E-03	5,44E-09	1,99E+05	1,08E-03	1,67E-08	9,95E+04	1,67E-03
22213	3	1,44E-08	4,96E+04	7,13E-04	7,48E-09	6,44E+04	4,82E-04	1,37E-08	4,03E+04	5,52E-04
22216	3	1,47E-09	2,45E+05	3,59E-04	1,47E-09	2,45E+05	3,59E-04	1,47E-09	2,45E+05	3,59E-04

[000341] Además, se determinaron las afinidades de unión de los anticuerpos anti-B7-H4 seleccionados con el dominio del extremo N de B7-H4 humana (B7-H4 IgV-hulgG1; SEQ ID NO:410) mediante resonancia de plasmones superficiales (SPR, por sus siglas en inglés). Brevemente, se inmovilizó el anticuerpo Fab anti-humano en un chip de SPR derivado por carboxilo y se capturaron anticuerpos anti-B7-H4 en la superficie resultante a 5 ug/ml durante 30 segundos. Se hizo fluir entonces B7-H4 IgV-hulgG1 a diversas concentraciones (0 nM, 3,7 nM, 11,1 nM, 33,3 nM, 100 nM y 300 nM) sobre la superficie y se dejó que se uniera a los anticuerpos anti-B7-H4 durante la fase de asociación, seguida por un lavado con amortiguador durante la fase de disociación. Los datos se ajustaron mediante el uso de un modelo de unión 1:1 y los resultados se resumen en la Tabla 13.

B7-H4 IgV-hulgG1:

MASLGQILFWSIISIIILAGAIALIIGFGISGRHSITVTTVASAGNIGEDGILSCTFEPDIKLSDIVIQWLKEG
VLGLVHEFKEGKDELSEQDEMFRGRTAVFADQVIVGNASRLKNVQLTDAGTYKCYIITSKGKGNANL
EYKTGAFSGSEPKSSDKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE
5 VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA
KGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGGSFLL
YSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:410)

Tabla 13: Unión de anticuerpo anti-B7-H4 al dominio del extremo N mediante resonancia de plasmones superficiales

		B7-H4 humana		
Anticuerpo	GRUPO	K _D (M)	k _{on} (1/Ms)	k _{off} (1/s)
15461	2/3	3,04E-08	1,71E+05	5,19E-03
15462	2/3	1,69E-08	2,95E+05	4,98E-03
15465	2/3	1,73E-08	2,41E+05	4,17E-03
15483	2/3	1,84E-08	2,41E+05	4,43E-03
15489	2/3	2,37E-08	1,64E+05	3,89E-03
20502	3	2,03E-09	1,78E+05	3,61E-04

[000342] Por lo tanto, múltiples ensayos demuestran que los anticuerpos se unen a B7-H4.

Ejemplo 5: Mapeo de epítomos

[000343] Se determinaron los grupos de unión al anticuerpo anti-B7-H4 mediante interferometría de biocapa (BLI). Los ensayos de mapeo de epítomos se describen en mayor detalle en el Ejemplo 2. Brevemente, se capturo un primer anticuerpo anti-B7-H4 en puntas de proteína A, seguido por un anticuerpo hulgG1 de control para saturar adicionalmente los sitios de unión en las puntas. A continuación, las puntas del sensor se expusieron al antígeno (B7-H4-hulgG1) (SEQ ID NO:409) seguido por el segundo anticuerpo anti-B7-H4, que entonces se evaluó para verificar la unión. Se determinaron los grupos de epítomos mediante la comparación de la unión después de utilizar un anticuerpo no B7-H4 como el primer anticuerpo. Los resultados se resumen en la Tabla 12.

10 **Ejemplo 6: Caracterización de la unión de anticuerpo monoclonal a B7-H4 expresada en la superficie de células**

[000344] Se transfectaron líneas celulares HEK293T para que expresaran B7-H4 humana, de mono cynomolgus, ratón o rata de longitud completa. Además, se utilizó la línea celular de cáncer de mama SK-BR-3 que expresa B7-H4 humana endógena para evaluar la capacidad de los anticuerpos de unirse a B7-H4 expresada en la superficie celular. 1×10^5 de líneas celulares HEK293T originales o HEK293T transfectadas se incubaron con 100 nM de anticuerpos de B7-H4. Después de la incubación, las células se sedimentaron, lavaron e incubaron con un anticuerpo de etiquetado secundario, y las muestras se adquirieron en un citómetro de flujo. Se calculó la proporción de unión sobre la línea celular original (FOP) de la siguiente manera: Células HKE293T transfectadas MFI/células HEK293T MFI originales. Un valor de FOP mayor que 10 se consideró que indicaba unión específica.

[000345] Para evaluar la potencia de unión celular a los anticuerpos de B7-H4, 1×10^5 células SK-BR-3 o células 293 transfectadas para que expresaran B7-H4 de mono cynomolgus, ratón o rata se incubaron con dosis de titulación de los anticuerpos de B7-H4. Después de la incubación, las células se sedimentaron, lavaron e incubaron con un anticuerpo de etiquetado secundario, y las muestras se adquirieron en un citómetro de flujo. Los datos se analizaron mediante el uso del software FlowJo y se graficó MFI en función de la concentración de anticuerpo. La potencia de unión celular EC50 se calculó mediante el uso de ajuste de curva por regresión no lineal (GraphPad Prism).

[000346] Todos los anticuerpos de B7-H4 presentaron unión a las células HEK293T que expresaban B7-H4 humana, B7-H4 de mono cynomolgus o B7-H4 de ratón. Los anticuerpos también presentaron una potente unión dependiente de la dosis a células SK-BR-3 que expresaban de forma endógena

B7-H4 humana en la superficie celular o líneas celulares HEK293T transfectadas para expresar B7-H4 de mono cynomolgus, ratón o rata en la superficie celular. Estos datos demuestran que la mayoría de los anticuerpos de B7-H4 tienen reactividad cruzada completa con B7-H4 de mono cynomolgus, ratón y rata (Figuras 2A y 2B, Tabla 14).

5 [000347] **Tabla 14: Unión del anticuerpo de B7-H4 a B7-H4 en la superficie celular**

Anticuerpo	GRUPO	293- huB7- H4 (FOP)	293- cynoB7- H4 (FOP)	293- moB7- H4 (FOP)	SK- BR-3 (EC50; nM)	293- cynoB7- H4 (EC50; nM)	293- ratónB7- H4 (EC50; nM)	293- rataB7- H4 (EC50; nM)
15441	2	67	9	3	34,29	ND	ND	ND
15461	2/3	333	610	887	5,66	6,77	6,37	1,67
15462	2/3	530	416	456	4,55	5,29	5,40	1,13
15465	2/3	626	1324	690	2,13	4,90	5,34	1,47
15472	4	580	1279	685	8,86	-	-	-
15478	4	518	1130	125	PF	-	-	-
15483	2/3	805	1012	1402	14,81	17,4	8,82	1,87
15489	2/3	612	1118	674	31,73	13,7	17,5	4,55
15495	2	619	524	6	61,2	-	-	-
15503	2	289	877	5	PF	-	-	-
20496	otro	179	758	604	7,60	7,91	6,70	ND
20500	3	182	630	478	1,54	3,38	4,00	1,14
20501	3	205	728	546	1,90	3,89	4,67	1,15

20502.1	3	200	683	559	2,50	4,94	5,57	1,26
---------	---	-----	-----	-----	------	------	------	------

Ejemplo 7: Caracterización de actividad de bloqueo de punto de control de linfocitos T del anticuerpo monoclonal

[000348] Para caracterizar la actividad de bloqueo de punto de control de linfocitos T de los anticuerpos de B7-H4, se enriquecieron linfocitos T humanos primarios a partir de células mononucleares de sangre periférica (PBMC, por sus siglas en inglés) mediante el uso del kit de enriquecimiento de linfocitos T EasySep™ basándose en las instrucciones del fabricante. Los linfocitos T enriquecidos se incubaron a 2×10^5 células/mL con Dynabeads anti-CD3/anti-CD28, a una proporción de una perla por célula, a 37 °C. Seis días después, las perlas se retiraron de forma magnética, y los linfocitos T se lavaron e incubaron a 1×10^6 células/mL con 10 U/mL de IL-2 a 37 °C. Cuatro días después, los linfocitos T se lavaron e incubaron a 1×10^6 células/mL junto con células que expresan antígenos artificiales (aAPC) a 2×10^6 células/mL a 37° C en presencia de 10 ug/mL de antígeno o una titulación de dosis de anticuerpo. Las aAPC son una línea celular HEK293T que se transfectó para coexpresar un formiato scFV de OKT3 de clon de CD3 anti-humano y B7-H4 humana de longitud completa en la superficie celular. Las aAPC se trataron con mitomicina C durante una hora a 37 °C y después se lavaron cuidadosamente antes de agregarlas al cocultivo de linfocitos T. 72 horas después del cocultivo de linfocitos T, las aAPC y anticuerpos de B7-H4, se centrifugaron las placas, los sobrenadantes se recogieron y se evaluaron para verificar la producción de IFN γ mediante ELISA y las células se recogieron y tiñeron para evaluar la proliferación mediante FACS (específicamente, las células en cada pocillo se incubaron con anticuerpos contra CD4 y CD8). Las células entonces se lavaron, fijaron, permeabilizaron e incubaron con el reactivo Edu-Click de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las células se lavaron y se midió la cantidad total de linfocitos T CD4+, CD8+ y totales proliferantes mediante el uso de citometría de flujo. Los datos se analizaron mediante el uso del software FlowJo. Para las muestras tratadas únicamente con una única concentración de anticuerpo, los datos se calcularon e informaron como un aumento de proporción sobre las muestras tratadas con hulgG de control. Para las muestras tratadas con una titulación de dosis de anticuerpo, la producción de IFN γ se graficó en función de la concentración de anticuerpo, y la potencia de EC50 se calculó mediante el uso de ajuste de curva por regresión no lineal (GraphPad Prism).

[000349] Todos los anticuerpos de Grupo 2/3 y Grupo3 dieron como resultado de forma reproducible

una actividad de bloqueo de punto de control de linfocitos T según se midió como un aumento en la producción de IFN γ y/o producción de linfocitos T CD4 $^{+}$, CD8 $^{+}$ o totales. La Figura 3A muestra que el anticuerpo 15441 aumenta la proliferación de linfocitos T en al menos 3 % y aumenta la proliferación de linfocitos T CD4 $^{+}$ y CD8 $^{+}$ en al menos 2 %. La Figura 3A también muestra que el anticuerpo 15461 aumenta la proliferación de linfocitos T en al menos 21 %, aumenta la proliferación de linfocitos T CD4 $^{+}$ en al menos 9 % y aumenta la proliferación de linfocitos T CD8 $^{+}$ en al menos 11 %. Las Figuras 3B-3D muestran otras actividades de bloqueo de punto de control de linfocitos T dependiente de la dosis.

Tabla 15: Anticuerpo de B7-H4 – Actividad de bloqueo de punto de control de linfocitos T

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

Tabla 16: Unión del anticuerpo de B7-H4 a B7-H4 en la superficie celular

Anticuerpo	GRUPO	Ensayo de aAPC (EC50 +/-STD; nM)	Donante 1 (Máx IFN γ , pg/mL)	Donante 2 (Máx IFN γ , pg/mL)	Donante 3 (Máx IFN γ , pg/mL)	Donante 4 (Máx IFN γ , pg/mL)	
20496	otro	PF	185,88	ND	ND	ND	
20500	3	0,84 +/- 0,35	821	273,83	117,9	4027,1	
20501	3	0,79 +/- 0,18	849,6	310	135,6	4493,1	
20502.1	3	0,79 +/- 0,03	937	303,9	174,02	4269,7	
20506	3	1,25 +/- 0,26	980,8	258,8	86,1	2301,8	
20513	3	1,16 +/- 0,16	658,8	240,3	91,1	1634,5	
20516	3	PF	ND	441,1	ND	ND	
22213	3	1,79 +/- 1,83	ND	ND	ND	ND	

Ejemplo 8: Generación de anticuerpos monoclonales fucosilados y afucosilados

- 5 [000350] Los anticuerpos con regiones Fc con contenido de fucosa reducido en restos de glicano pueden presentar mayor actividad de ADCC en comparación con un anticuerpo completamente

fucosilado (Niwa R et ál., *Clinical Cancer Research* 11(6):2327-36 (2005)). Los anticuerpos de B7-H4 se generaron en células CHO-x (Yamane-Ohnuki N, et ál. *Biotechnology and Bioengineering* 87(5): 614-22 (2004)) para producir anticuerpos fucosilados y en una línea celular CHO modificada genéticamente para producir anticuerpos afucosilados (células CHO-y) (*id.*).

5 Ejemplo 9: Caracterización de unión de anticuerpos monoclonales fucosilados y afucosilados

[000351] Los anticuerpos anti-B7-H4 fucosilados y afucosilados se caracterizaron mediante SPR siguiendo el protocolo que se describe en el Ejemplo 4. Los anticuerpos presentaron una unión similar a la proteína B7-H4 humana y, por lo tanto, no hay impacto de la glicosilación sobre la unión (Tabla 17).

10 Tabla 17: Unión de anticuerpos fucosilados y afucosilados

Anticuerpo	GRUPO		B7-H4 humana			SK-BR-3 (EC50 ; nM)	293-cynoB7-H4 (EC50; nM)	293-ratónB7-H4 (EC50; nM)	293-rataB7-H4 (EC50; nM)
			K _D (M)	k _{on} (1/Ms)	k _{off} (1/s)				
20502	3	Fucosilado	2,58E-09	4,28E+05	1,10E-03	0,571	3,291	4,371	2,486
20502	3	Afucosilado	2,74E-09	4,19E+05	1,15E-03	0,483	2,923	1,655	2,446
20506	3	Fucosilado	1,93E-09	3,65E+05	7,03E-04	0,739	1,770	1,77	3,249
20506	3	Afucosilado	2,01E-09	3,60E+05	7,25E-04	0,767	1,769	1,769	PF
22213	3	Fucosilado	5,81E-09	1,53E+05	8,88E-04	0,651	5,199	2,445	4,401

22213	3	Afucosilado	5,11E-09	1,69E+05	8,62E-04	0,667	3,878	2,453	3,545
-------	---	-------------	----------	----------	----------	-------	-------	-------	-------

[000352] Los anticuerpos anti-B7-H4 fucosilados y afucosilados también se caracterizaron mediante citometría de flujo. En estos experimentos, se transfectaron líneas celulares HEK293T para que expresaran B7-H4 de mono cynomolgus, ratón o rata de longitud completa. Además, se utilizaron las líneas celulares de cáncer de mama SK-BR-3 que expresan B7-H4 humana endógena para evaluar la potencia de unión celular de los anticuerpos de B7-H4. Se incubaron 1x10⁵ células SK-BR-3 o célula 293 transfectadas para que expresaran B7-H4 humana, de mono cynomolgus, ratón o rata de longitud completa con dosis de titulación de anticuerpos de B7-H4. Después de la incubación, las células se sedimentaron, lavaron, incubaron con un anticuerpo de etiquetado secundario, y se pasaron por un citómetro de flujo. Los datos se analizaron mediante el uso del software FlowJo. MFI se graficó en función de la concentración de anticuerpo, y la potencia de unión celular EC₅₀ se calculó mediante el uso de ajuste de curva por regresión no lineal (GraphPad Prism).

[000353] Los anticuerpos de B7-H4 también presentaron una potente unión dependiente de la dosis a células SK-BR-3 que expresaban de forma endógena B7-H4 en la superficie celular o líneas celulares 293 transfectadas para expresar B7-H4 de mono cynomolgus, ratón o rata en la superficie celular. La potencia de unión y la reactividad cruzada de especies no se vio afectada por que el anticuerpo estuviera fucosilado o afucosilado (Figuras 4A-4D y Tabla 17).

Ejemplo 10: Unión de anticuerpos monoclonales afucosilados y fucosilados con el alelo V158 del receptor IIIa de Fcγ (FcγRIIIa) humano.

[000354] El anticuerpo 20502 se produjo tanto fucosilado (Ab-F) como afucosilado (Ab-A) y se evaluó para verificar la afinidad de unión a la región Fc de FcγRIIIa (V158) mediante resonancia de plasmones superficiales (SPR). Brevemente, se unió de forma covalente proteína A a un chip de dextrano mediante el uso del kit de unión de amina con etilendiamina 100 mM a amortiguador de borato de sodio 100 mM, pH 8,0, como reactivo de bloqueo. Se capturó Ab-A o Ab-F a 2 densidades en celdas de flujo separadas y un flujo derivado de la proteína A funcionó como control de referencia. Se diluyó Fc gamma RIIIA (V158) en amortiguador de ejecución HBS-P+ y se inyectó a 6 concentraciones (0 nM, 1,37 nM, 12,3 nM, 37 nM, 111 nM, 333 nM y 1000 nM) por duplicado. La

constante de asociación, constante de disociación y afinidad para la unión de Ab-A se calculó mediante el uso del modelo de unión 1:1 de software de evaluación T200 de Biacore. La constante de afinidad para la unión de Ab-A y Ab-F se determinó mediante el uso del modelo de afinidad de estado constante del software de evaluación T200 de Biacore. El anticuerpo de B7-H4 afucosilado (Ab-A) tuvo una afinidad de 140 veces para el receptor IIIa de Fc gamma (V158) que el mismo anticuerpo con un Fc fucosilado (Ab-F) (Figuras 5 A y 5 B, Tabla 18).

Tabla 18: Unión del alelo V158 del receptor Fcγ IIIa (FcγRIIIa)

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

Ejemplo 11: Actividad de bloqueo de punto de control de linfocitos T por anticuerpos monoclonales afucosilados y fucosilados

[000355] Se enriquecieron linfocitos T humanos primarios a partir de PBMC mediante el uso del kit de enriquecimiento de linfocitos T humanos EasySep™ según las instrucciones del fabricante. Los linfocitos T enriquecidos se incubaron a 2×10^5 células/mL con Dynabeads anti-CD3/anti-CD28, a una proporción de una perla por célula, a 37 °C. Seis días después, las perlas se retiraron de forma magnética, y los linfocitos T se lavaron e incubaron a 1×10^6 células/mL con 10 U/mL de IL-2 a 37 °C. Cuatro días después, los linfocitos T se lavaron e incubaron a 1×10^6 células/mL junto con células que expresan antígenos artificiales (aAPC) a una concentración de 2×10^6 células/mL a 37° C en presencia una titulación de dosis de anticuerpo de B7-H4. Las aAPC se trataron con mitomicina C durante una hora a 37 °C y después se lavaron cuidadosamente antes de agregarlas al cocultivo de linfocitos T. 72 horas después del cocultivo de linfocitos T, aAPC y anticuerpos de B7-H4, se centrifugaron las placas y se recogieron los sobrenadantes y se evaluaron para detectar la producción de IFNγ mediante ELISA. La producción de IFNγ se graficó en función de la concentración de anticuerpo, y la potencia de EC50 se calculó mediante el uso de ajuste de curva por regresión no lineal (GraphPad Prism).

[000356] Los anticuerpos de B7-H4 presentaron actividad potente de bloqueo de punto de control de linfocitos T según se midió por un aumento en la producción de IFNγ. Además, no hubo una

diferencia demostrable en la potencia entre los anticuerpos fucosilados y afucosilados (Figura 6A y Tabla 19).

Tabla 19: Potencia del bloqueo de punto de control de linfocitos T

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

5 [000357] A continuación, se enriquecieron linfocitos T humanos primarios a partir de PBMC donantes de HLA-A2+ mediante el uso del kit de aislamiento de linfocitos T humanos según las instrucciones del fabricante. Se generaron linfocitos T que expresan MART-I TCR mediante primero la activación de 5x10⁶ linfocitos Pan T enriquecidos con 1,5x10⁷ Dynabeads anti-CD3/anti-CD28, 100 ng/mL de IL-2 y 15 ng/mL de IL-7 durante 48 horas. Se transdujeron entonces 5x10⁶ linfocitos T activados con

10 partículas lentivirales MART-I TCR en presencia de 200 ng/mL de IL-2, 30 ng/mL de IL-7 y 10 ug/mL de polibreno. 24 horas después de la transducción, se expandieron linfocitos Pan T MART-I TCR durante un período de 15 días en presencia de 33,3 ng/mL de IL-2 y 5 ng/mL de IL-7. Para generar las líneas celulares objetivo que expresan HLA-A2, las líneas celulares de cáncer de mama que expresan B7-H4 endógena MDA-MB-468 y SK-BR-3 se transdujeron con partículas lentivirales HLA-

15 A2 durante 48 horas. Además, se inactivó B7-H4 de la línea celular HLA-A2+ SK-BR-3. Se cocultivaron los linfocitos Pan T MART-I TCR+ en presencia de diversas líneas celulares objetivo a una proporción E:T 1:1, 500 µg/mL de péptido MART-I y 67 nM del anticuerpo de B7-H4 20502 (afucosilado) o un isotipo humano de control. 24 horas después de la incubación, se centrifugaron las placas y los sobrenadantes se recogieron y evaluaron para verificar la producción de IL-2

20 mediante AlphaLisa, de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

[000358] Tal como se muestra en la Figura 6 B, B7-H4 presentó actividad de ligando de punto de control de linfocitos T en este ensayo cuando se expresó de forma endógena a niveles fisiológicos, dado que la producción de IL-2 se redujo en los pocillos que contenían células SK-BR-3 B7-H4+ en

comparación con las células SK-BR-3 KO. Además, el anticuerpo de B7-H4 también presentó actividad de bloqueo de punto de control de linfocitos T, según se mide mediante un aumento en la producción de IL-2 en comparación con las células tratadas con isotipo de control (Figura 6B). Por lo tanto, estos datos confirman la actividad de bloqueo de punto de control de linfocitos T del anticuerpo de B7-H4 20502 (afucosilado) y muestran que el anticuerpo de B7-H4 20502 proporciona actividad de bloqueo de punto de control de linfocitos T en células que expresan B7-H4 de forma endógena.

Ejemplo 12: Actividad de ADCC de anticuerpos monoclonales afucosilados y fucosilados

[000359] Se evaluaron los anticuerpos de B7-H4 para detectar actividad de ADCC contra una línea celular objetivo que expresa B7-H4. Específicamente, se activaron mediante citocina células PBMC humanas primarias a 1×10^6 células/mL con 200 IU/mL de IL-2 a 37 °C. Al día siguiente, las células se lavaron e incubaron a una proporción 40:1 de Efector:Objetivo con células objetivo SK-BR-3 que se marcaron con Calceína-AM. 4 horas después de la incubación, se cuantificó la lisis celular objetivo mediante el uso de un fluorímetro. Una muestra tratada con Triton/X fue la muestra de control de lisis máx, mientras que una muestra tratada con medio solo fue la muestra de control de lisis de fondo. El porcentaje (%) de lisis específica se calculó de la siguiente manera: $[1 - ((\text{muestra} - \text{control de medio}) / (\text{lisis máx} - \text{control de medio}))] \times 100$. El porcentaje (%) de lisis específica se graficó en función de la concentración de anticuerpo, y la potencia de EC50 se calculó mediante el uso de ajuste de curva por regresión no lineal (GraphPad Prism).

[000360] Los anticuerpos de B7-H4 presentaron una actividad de ADCC dependiente de la dosis potente contra la línea celular SK-BR-3 de cáncer de mama que expresa B7-H4 endógena. Además, los anticuerpos afucosilados presentaron una actividad de ADCC significativamente más potente en comparación con los anticuerpos fucosilados (Figura 7 y Tabla 20).

Tabla 20: Actividad de ADCC

Anticuerpo	GRUPO	Ensayo de ADCC (EC50 +/- STD; nM)	
		Afucosilado	Fucosilado
20502	3	0,0007 +/-1,1x10E-3	0,0370 +/-6,2E-2

20506	3	0,0015 +/-2,5x10E-3	0,0135 +/-2,1E-2
22213	3	0,0015	0,014

Ejemplo 13: Correlación de actividad de ADCC con densidad del receptor

- [000361] La densidad de B7-H4 se cuantificó en la superficie de células SK-BR-3, HCC1569, ZR-75-1, MDA-MB-48 y HCC1964 mediante FACS, de acuerdo con las especificaciones del fabricante. Específicamente, se incubaron 1×10^5 células con 15 ug/mL de anticuerpo de B7-H4 en hielo durante 25 minutos. En paralelo, también se incubó una gota de microesferas Quantum™ Simply Cellular (QSC) (precubiertas con concentraciones en aumento de anticuerpo de captura de IgG anti-ratón) con 15 ug/mL de anticuerpo de B7-H4 en hielo durante 25 minutos. Después de la incubación, las células y microesferas QSC se sedimentaron y lavaron, y se adquirieron muestras mediante un citómetro de flujo. Los datos se analizaron mediante el uso del software FlowJo. La intensidad de fluorescencia promedio (MFI) se calculó e ingresó en la hoja de cálculo QuickCal®. Se calculará automáticamente una regresión que asocia el valor de canal de fluorescencia de cada perla con su capacidad de unión al anticuerpo (ABC, por sus siglas en inglés) preasignada. Un valor de ABC se asignó una vez que también se agregaron los valores de MFI para las células marcadas en la plantilla).
- [000362] Se evaluó la actividad de ADCC de los anticuerpos de B7-H4 contra líneas celulares objetivo que expresan B7-H4 con diferentes niveles de densidad de superficie celular de B7-H4. Específicamente, se coincubaron 1×10^4 célula objetivo SK-BR-3, HCC1569, ZR-75-1, MDA-MB-468 o HCC1964 con titulaciones de dosis de B7-H4 a 4 °C. 25 minutos después, se descongeló un vial de un solo uso de células informantes Jurkat-huCD16 de Promega, y se agregaron $7,5 \times 10^4$ células a la mezcla de células objetivo/anticuerpo de B7-H4 y se incubó a 37 °C. 24 horas después, las muestras se llevaron a temperatura ambiente (TA) y se incubaron con amortiguador Bio-Glo. Se cuantificaron el sustrato y la luminiscencia en un lector multietiqueta EnVision. Los datos se graficaron como luminiscencia en función de la concentración de anticuerpo, y la potencia de EC50 se calculó mediante el uso de ajuste de curva por regresión no lineal (GraphPad Prism).
- [000363] La actividad de ADCC del anticuerpo de B7-H4 fue dependiente de la dependiente en la superficie celular de B7-H4: a medida que disminuye la cantidad de molécula en la superficie celular, la cantidad de actividad de ADCC máxima también disminuye. Además, los anticuerpos fucosilados presentaron una actividad de ADCC mejorada en comparación con los anticuerpos fucosilados,

especialmente contra células objetivo con bajos niveles de densidad en la superficie celular de B7-H4 (Figura 8).

Ejemplo 14: Eficacia antitumoral *in vivo*

- [000364] Se adquirieron ratones BALB/c hembra de siete semanas de edad a través de Charles River Laboratories (Hollister, CA) y se aclimataron durante hasta tres semanas antes del inicio de los estudios. La línea celular de carcinoma colorrectal CT26 se modificó genéticamente para expresar una proteína quimérica que consistía en el dominio extracelular de B7-H4 murina con el dominio transmembrana de B7H3 murina. Estas líneas tumorales se implantaron por vía subcutánea a través del flanco derecho de los ratones a $1,0 \times 10^6$ células/200 μ l/ratón. Antes de la inoculación, las células se cultivaron durante no más de tres pasajes en medio RPMI 1640 complementado con suero fetal bovino (FBS, por sus siglas en inglés) inactivado por calor al 10 %, L-Glutamina 2 mM. Las células se cultivaron a 37 °C en una atmósfera humidificada con CO₂ al 5 %. Al alcanzar un 80-85 % de confluencia, las células se recolectaron y se volvieron a suspender en una mezcla 1:1 de RPMI 1640 sin suero y Matrigel® a 5×10^6 células por mililitro.
- [000365] Los ratones se supervisaron dos veces a la semana después del implante de células para determinar el crecimiento tumoral. Para medir los tumores, se midió la longitud y el ancho de cada tumor mediante el uso de calibres y se calculó el volumen de acuerdo con la fórmula: volumen tumoral (mm³) = (ancho (mm) x longitud (mm)/2. En el día de inicio del tratamiento, se midieron todos los tumores, los valores atípicos se excluyeron y los ratones se distribuyeron de manera aleatoria en grupos de tratamiento. Para el tratamiento anti-B7-H4, los anticuerpos incluían 20502 (Figura 9A) y 22213 (Figura 9B). Como controles, se les administró IgG humana policlonal (Bio X Cell, BE0092) o IgG2a de ratón (Bio X Cell, BE0085) a los ratones. Los anticuerpos se administraron cuatro veces por inyección intravenosa (i.v.) dos veces por semana comenzando en el Día 4 o 5 después de la inoculación.
- [000366] Se siguieron midiendo los tumores al menos dos veces a la semana hasta que el volumen tumoral superó el 10 % del peso del animal, o aproximadamente 2000 mm³. El cambio del tamaño de los tumores se muestra mediante una gráfica de los tumores individuales en relación con el día a partir del cual se inocularon los animales con células CT26. Los valores p se calcularon mediante análisis de prueba t de dos colas desapareada de los volúmenes tumorales calculados en cada día del estudio. El tratamiento con 20502 o 22213 redujo significativamente el crecimiento tumoral en comparación con el control con IgG humana ($p < 0,05$) cuando se administra en dosis de 10-20 mg/kg

(Figuras 9A y 9B).

[000367] Se realizaron experimentos similares mediante el uso de ratones a los que se les implantaron células 4T1 (una línea celular de carcinoma de mama murino) o B16 (línea celular de melanoma murino). Estos ratones se trataron con 20 mg/kg de sustituto de ratón de 20502 llamado 20502-msIgG2a-F, que contenía la región variable de 20502 fusionada con IgG2a de ratón fucosilada o con anticuerpo de control de IgG murina. El tratamiento con 20502-msIgG2a-F redujo significativamente el crecimiento tumoral en comparación con control de IgG murina tanto en el modelo de carcinoma de mama 4T1 como el de melanoma B16 (Figura 10).

[000368] También se llevaron a cabo experimentos adicionales mediante el uso de 20502 afucosilado en un modelo de xenoinjerto de cáncer de mama humano MX-1. Se adquirieron ratones NSG hembra (NOD-scid, IL2R con gamma nulo) de Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME) y se aclimataron durante una semana antes de comenzar los estudios. Se observó previamente que la línea celular de cáncer de mama humano MX-1 expresa de forma endógena la proteína B7H4 en la superficie celular. Estas células tumorales se implantaron por vía subcutánea en el flanco derecho de los ratones a $1,0 \times 10^6$ células/100 μ l/ratón en una mezcla 1:1 de RPMI 1640 libre de suero y Matrigel a 5×10^6 células por mililitro.

[000369] Los ratones se supervisaron dos veces a la semana después del implante de células para determinar el crecimiento tumoral. Para medir los tumores, se midió la longitud y el ancho de cada tumor mediante el uso de calibres y se calculó el volumen de acuerdo con la fórmula: Volumen tumoral (mm^3) = (ancho (mm) x longitud (mm)²)/2. En el Día 7 después de la inoculación, se midieron todos los tumores, los valores atípicos se excluyeron y los ratones se distribuyeron de manera aleatoria en grupos de tratamiento. A todos los animales se les administró una construcción de ADN que inducía la expresión de IL-15 humana constitutiva en la circulación durante el resto del estudio. En el Día 9, la mitad de los ratones recibió una inyección intravenosa (i.v.) de 20×10^6 células monocíticas de sangre periférica humana (PBMC) que se adquirió de StemCell Technologies (Tukwila, WA). Comenzando en el Día 11, se les administró a los ratones 20502 afucosilado (20 mg/kg) o solución salina como control negativo. Se administraron agentes terapéuticos cuatro veces por medio de inyección intravenosa (i.v.) dos veces por semana.

[000370] Se siguieron midiendo los tumores al menos dos veces a la semana hasta que el volumen tumoral superó el 10 % del peso del animal o hasta que los animales presentaron una pérdida de peso de 15 % o más del peso corporal inicial. Se calcularon los valores de p mediante el uso de

ANOVA de una vía que comparaba los volúmenes tumorales promedio en todos los grupos de tratamiento en el Día 28. Tal como muestra la Figura 11, el tratamiento con 20502 afucosilado redujo significativamente el crecimiento tumoral en comparación con el control con solución salina ($p < 0,05$) solamente cuando se administró a los ratones a los que se les inyectó previamente PBMC humanas.

5 Ejemplo 15: Eficacia antitumoral *in vivo* en combinación con anticuerpo anti-PD-1

Métodos

[000371] Se adquirieron ratones BALB/c hembra de ocho semanas de edad a través de Charles River Laboratories (Hollister, CA) y se aclimataron durante hasta dos semanas antes del inicio del estudio. La línea celular de carcinoma de mama 4T1 se modificó genéticamente para expresar una proteína quimérica que contenía en el dominio extracelular de B7-H4 murina y el dominio transmembrana de B7H3 murina. Las células tumorales se implantaron de forma ortotópica en el panículo adiposo mamario de los ratones a $0,5 \times 10^5$ células/50 μ l/ratón. Antes de la inoculación, las células se cultivaron durante no más de tres pasajes en medio RPMI 1640 complementado con suero fetal bovino (FBS) inactivado por calor al 10 %. Las células se cultivaron a 37 °C en una atmósfera humidificada con CO₂ al 5 %. Al alcanzar una confluencia de 80-85 %, las células se recogieron y volvieron a suspender en RPMI 1640 libre de suero en el flanco ventral de cada ratón en el panículo adiposo mamario.

[000372] Los ratones se supervisaron dos veces a la semana después del implante de células para determinar el crecimiento tumoral. Se midió la longitud y el ancho de cada tumor mediante el uso de calibres y se calculó el volumen de acuerdo con la fórmula: Volumen tumoral (mm^3) = (ancho (mm) x longitud (mm)²)/2. En el día de inicio del tratamiento, se midieron todos los tumores, los valores atípicos se excluyeron y los ratones se distribuyeron de manera aleatoria en grupos de tratamiento. Para el tratamiento anti-B7-H4, se utilizó un sustituto de ratón de 20502 llamado 20502-msIgG2a-F, que contenía la región variable de 20502 fusionada con IgG2a de ratón fucosilada. Como control, se les administró mslgG2a (anti-HEL) a los ratones. 20502-msIgG2a-F o mslgG2a se administraron cuatro veces por inyección intravenosa (i.v.) dos veces por semana comenzando en el Día 11 después de la inoculación. Se administró anti-PD-1 (una versión modificada de RMP1-14 (Bio X Cell) que contenía un dominio de mslgG2a con Fc silencioso) tres veces por medio de inyección intraperitoneal (i.p.) dos veces por semana, comenzando en el Día 11 después de la inoculación. Se siguieron midiendo los tumores al menos dos veces a la semana hasta que el volumen tumoral superó el 10 % del peso del animal, o aproximadamente 2000 mm^3 .

Resultados

[000373] El cambio en el tamaño tumoral, el cambio en el volumen tumoral promedio y el porcentaje de supervivencia se muestra en las Figuras 12A, 12B y 12C, respectivamente. El tratamiento con 20502-mslgG2a-F o anti-PD-1 redujo significativamente el crecimiento tumoral en comparación con el control con mslgG2a ($p < 0,05$). La coadministración de 20502-mslgG2a-F y anti-PD-1 mejoró significativamente la inhibición del crecimiento tumoral en comparación con cualquiera de las monoterapias ($p < 0,05$). Además, la terapia de combinación dio como resultado la regresión tumoral completa en 5 de 12 ratones. Los valores de p se calcularon mediante el uso de análisis de ANOVA de una vía de los volúmenes tumorales calculados en cada día del estudio con múltiples comparaciones entre cada grupo.

Ejemplo 16: El anticuerpo anti-B7-H4 aumenta la infiltración de células NK y linfocitos T y regula por incremento PD-L1

[000374] Se adquirieron ratones hembra BALB/c de ocho semanas de Charles River Laboratories (Hollister, CA) y se les implantaron de forma ortotópica en el páncreo adiposo mamario células 4T1+moB7-H4/H3 a $0,5 \times 10^5$ células/50 μ l/ratón. En el día de inicio del tratamiento, se midieron todos los tumores, los valores atípicos se excluyeron y los ratones se distribuyeron de manera aleatoria en grupos de tratamiento. A los ratones se les administró hulgG1 (anti-HEL) o 20502 afucosilado a 20 mg/kg por medio de inyección intravenosa (i.v.) dos veces (en el Día 11 y en el Día 14 después de la inoculación).

[000375] A las 24 horas después de la segunda dosis de administración, se sacrificaron los ratones y se perfundieron con solución salina amortiguada con fosfato (PBS). Se extrajeron entonces los tumores, se fijaron con formalina al 10 % durante cinco horas, se enjuagaron en PBS y se colocaron en solución de sacarosa al 30 % durante al menos 24 horas. Los tumores se embebieron en compuesto Tissue-Tek® O.C.T. y se seccionaron a 20 μ m en una cámara a -15°C (cryostat). Se enjuagaron portaobjetos montados con tejido en Triton al 0,3 % en PBS, se bloquearon con suero de cabra normal al 5 % y se tiñeron con anticuerpo primario (anti-NKp46, anti-CD3 o anti-PD-L1; 1:500) durante la noche. Se tiñeron dos secciones en serie de cada tumor.

[000376] Después de la incubación durante la noche, se enjuagaron los portaobjetos con Triton al 0,3 %, después se incubaron con anticuerpo secundario (1:400) durante tres horas en una cámara húmeda oscura y se enjuagaron. El tejido se fijó entonces en paraformaldehído al 1 % y se enjuagó en PBS. Se montaron cubreobjetos mediante el uso de Vectashield® con DAPI, se sellaron con

Cytoseal™ y se dejaron secar en una cámara oscura. Las imágenes se adquirieron de forma manual con un microscopio fluorescente y una cámara. Tal como se muestra en la Figura 13, el tratamiento con 20502 afucosilado dio como resultado un aumento en las células NK (según se mide por el anticuerpo anti-NKp46) y aumento de linfocitos T CD3+ en los bordes del tumor con un aumento moderado de linfocitos T CD3+ en el núcleo del tumor. También se observó un aumento en la expresión de PD-L1.

Ejemplo 17: El anticuerpo anti-B7-H4 reduce significativamente el crecimiento tumoral *in vivo* en modelos de 4T1- y B16-moB7-H4/H3 de una manera dependiente de la dosis

[000377] Se adquirieron ratones BALB/c o C57Bl/6 hembra de seis a ocho semanas de edad a través de Charles River Laboratories (Hollister, CA) y se aclimataron durante hasta tres semanas antes del inicio de los estudios. La línea celular de carcinoma de mama 4T1 y la línea celular de melanoma B16-F10 se modificaron genéticamente para expresar una proteína quimérica murina que consistía en el dominio extracelular de B7-H4 murina con el dominio transmembrana de B7-H3 murina. Estas células tumorales se implantaron de forma ortotópica en el pániculo adiposo mamario a $0,05 \times 10^6$ células/50 μ l/ratón para 4T1+moB7-H4/H3 o por vía subcutánea en el flanco derecho de los ratones a $0,5 \times 10^6$ células/100 μ l/ratón para B16+moB7-H4/H3. Antes de la inoculación, las células se cultivaron durante no más de tres pasajes en medio RPMI-1640 o DMEM complementado con suero fetal bovino (FBS) inactivado por calor al 10 % y L-Glutamina 2 mM. Las células se cultivaron a 37 °C en una atmósfera humidificada con CO₂ al 5 %.

[000378] Los ratones se supervisaron dos veces a la semana después del implante de células para determinar el crecimiento tumoral. Para medir los tumores, se midió la longitud y el ancho de cada tumor mediante el uso de calibres y se calculó el volumen de acuerdo con la fórmula: Volumen tumoral (mm³) = (ancho (mm) x longitud (mm)²)/2. En el día de inicio del tratamiento, se midieron todos los tumores, los valores atípicos se excluyeron y los ratones se distribuyeron de manera aleatoria en grupos de tratamiento. A los ratones se les administró anticuerpo 20502-msIgG2a-F (anti-B7-H4, mslgG2a, fucosilado (también llamado “cmFPA150-F”) o un anticuerpo de control de IgG2a de ratón cuatro veces por medio de inyección intravenosa (i.v.) dos veces por semana comenzando en el Día 11 (4T1+moB7-H4/H3) o el Día 6 (B16+moB7-H4/H3) después de la inoculación, excepto para el grupo de 20 mg/kg, que se le administró de forma continua dos veces por semana hasta el final del estudio.

[000379] Se siguieron midiendo los tumores al menos dos veces a la semana hasta que el volumen

tumoral superó el 10 % del peso del animal, o aproximadamente 2000 mm³. El cambio del tamaño de los tumores se muestra mediante una gráfica del volumen tumoral medio con respecto al día a partir del cual se inocularon los animales. El tratamiento con 20502-mslgG2a-F redujo significativamente el crecimiento tumoral en comparación con el control con IgG2a de ratón ($p < 0,05$) cuando se administró en dosis de 1 mg/kg o mayor en el modelo de 4T1+moB7-H4/H3 (véanse las Figuras 14A y 14B) y en dosis de 3 mg/kg o mayores en el modelo de B16+moB7-H4/H3 (Figuras 15A y 15B). Se calculó la significancia estadística mediante el uso de ANOVA de una vía que comparaba todos los grupos de tratamiento con mslgG2a.

[000380] Las Figuras 14A y 14B muestran que el anticuerpo 20502-mslgG2a-F reduce significativamente el crecimiento de 4T1 que expresa B7-H4/H3. Se inocularon de forma ortotópica ratones BALB/c con células de carcinoma de mama 4T1 modificadas genéticamente para expresar B7-H4 ECD murina fusionada con B7-H3 TM. A los ratones se les administró anticuerpo 20502-mslgG2a-F (anti-B7-H4, mslgG2a, fucosilado) dos veces por semana comenzando en el Día 11 después de la inoculación. El anticuerpo 20502-mslgG2a-F presentó una reducción dependiente de la dosis del crecimiento tumoral, con una inhibición del crecimiento tumoral significativa a 30 mg/kg ($p = 0,0003$), 20 mg/kg ($p = 0,0103$), 10 mg/kg ($p = 0,0419$), 3 mg/kg ($p = 0,0277$) y 1 mg/kg ($p = 0,0333$) según se evalúa mediante ANOVA de una vía en el Día 30.

[000381] Las Figuras 15A y 15B muestran que el anticuerpo 20502-mslgG2a-F reduce significativamente el crecimiento de B16 que expresa B7-H4/H3. Se inocularon de por vía subcutánea ratones C57Bl/6 con células de melanoma B16-F10 modificadas genéticamente para expresar B7-H4 ECD murina fusionada con B7-H3 TM. A los ratones se les administró anticuerpo 20502-mslgG2a-F (anti-B7-H4, mslgG2a, fucosilado) dos veces por semana comenzando en el Día 6 después de la inoculación. El anticuerpo 20502-mslgG2a-F presentó una reducción dependiente de la dosis del crecimiento tumoral (Figura 15A), con una inhibición del crecimiento tumoral significativa a 30 mg/kg ($p = 0,0085$), 20 mg/kg ($p = 0,0041$), 10 mg/kg ($p = 0,0017$) y 3 mg/kg ($p = 0,0420$) según se evalúa mediante ANOVA de una vía en el Día 23 (Figura 15B).

[000382] Por lo tanto, el anticuerpo 20502-mslgG2a-F redujo significativamente el tamaño tumoral de una manera dependiente de la dosis en dos modelos de cáncer diferentes. Estos datos en líneas celulares de carcinoma de mama y melanoma indican que el anticuerpo 20502-mslgG2a-F puede utilizarse para tratar pacientes con cáncer.

Tabla de secuencias

Secuencias de anticuerpo de G1TR

SEQ ID NO	Secuencia
411	SGSVFSIDAM
412	LSGISSAK
413	YADVSTGWGRDAHGYW
414	EVQLLES GGG EVQPGGSLRLSCAASGSVFSIDAMGWYRQAPGKQREL VAVLSGISSAKYAASAPGRFTISRDNANTVYLMSSLRAEDTAVYYCY ADVSTGWGRDAHGYWGQGT LTV
415	EVQLLES GGG EVQPGGSLRLSCAASGSVFSIDAMGWYRQAPGKQREL VAVLSGISSAKYAASAPGRFTISRDNANTVYLMSSLRAEDTAVYYCY ADVSTGWGRDAHGYWGQGT LTVKPGGSGGSEVQLLES GGG EVQPG GSLRLSCAASGSVFSIDAMGWYRQAPGKQREL VAVLSGISSAKYAASA PGRFTISRDNANTVYLMSSLRAEDTAVYYCYADVSTGWGRDAHGY WGQGT LTVKPGGGGDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLT V LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY TLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVL DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPG K
416	EPKSSDKTHTCPPC
417	DKTHTCPPC
418	ESKYGPPCPPC
419	GGSGGS

420	GGSGGSGGS
421	GGSGGSGGSGGS
422	GGSGGSGGSGGSGGS
423	GGGG
424	GGGGG
425	GGGGGG

Secuencias de CD80

SEQ ID NO	Secuencia
426	VIHVTKEVKEVATLSCGHNVSVEELAQTRIYWQKEKKMVLTMMSGD MNIWPEYKNRTIFDITNNLSIVILALRPSDEGTYESVVLKYEKDAFKRE HLAEVTLVKADFPTPSISDFEIPSTNIRRIICSTSGGFPEPHLSWLEN GEELNAINTTVSQDPETELYAVSSKLDFNMTTNHSFMCLIKYGHLRVN QTFNWNTTKQEHFPDN
427	VIHVTKEVKEVATLSCGHNVSVEELAQTRIYWQKEKKMVLTMMSGD MNIWPEYKNRTIFDITNNLSIVILALRPSDEGTYESVVLKYEKDAFKRE HLAEVTLVKADFPTPSISDFEIPSTNIRRIICSTSGGFPEPHLSWLEN GEELNAINTTVSQDPETELYAVSSKLDFNMTTNHSFMCLIKYGHLRVN QTFNWNTTKQEHFPDNEPKSSDKHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMHEA LHNHYTQKSLSLSPGK

428	VIHVTKEVKEVATLSCGHNVSVVEELAQTRIYWQKEKKMVLTMMSGD MNIWPEYKNRTIFDITNNLSIVILALRPSDEGTYESVVLKYEKDAFKRE HLAEVTL SVKADFPTPSISDFEIPTSNIRRIICSTSGGFPEPHLSWLEN GEELNAINTTVSQDPETELYAVSSKLDFNMTTNHSFMCLIKYGHLRVN QTFNWNTTKQEHFPDNEPKSSDKTHTCPPCPAPEFEGGPSVFLFPP <u>KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP</u> <u>REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPASIIEKTISK</u> <u>AKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG</u> <u>QPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEA</u> <u>LHNHYTQKSLSLSPGK</u>
-----	---

Secuencias de CSFR1

SEQ ID NO	Secuencia
429	QVQLVQSGAE VKKPGSSVKV SCKASGYTFT DNYMIWVRQA PGQGLEWMGD INPYNGGTTF NQKFKGRVTI TADKSTSTAY MELSSLRSED TAVYYCARES PYFSNLYVMD YWGQGTLVTV SS
430	EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCKASQSVD YDGDNYMNWY QQKPGQAPRL LIYAASNLES GIPARFSGSG SGTDFTLTIS SLEPEDFAVY YCHLSNEDLS TFGGGTKVEI K
431	GYTFTDNYMI
432	DINPYNGGTT FNQKFKG
433	ESPYFSNLYV MDY
434	KASQSVDYDG DNYMN
435	AASNLES

436	HLSNEDLST			
437	QVQLVQSGAE PGQGLEWMGD MELSSLRSED SSASTKGPSV VSWNSGALTS KTYTCNVDHK SVFLFPPKPK VDGVEVHNAK YKCKVSNKGL TKNQVSLTCL DSDGSFFLYS KSLSLSLGK	VKKPGSSVKV INPYNGGTTF TAVYYCARES FPLAPCSRST GVHTFPAVLQ PSNTKVDKRV DTLMISRTPE TKPREEQFNS PSSIEKTISK VKGFPYSDIA RLTVDKSRWQ	SCKASGYTFT NQKFKGRVTI PYFSNLYVMD SESTAALGCL SSGLYSLSSV ESKYGPPCPP VTCVVDVSQ TYRVVSVLTV AKGQPREPQV VEWESNGQPE EGNVFSCSVM	DNYMIWVRQA TADKSTSTAY YWGQGTLLTV VKDYFPEPVT VTVPSSSLGT CPAPEFLGGP EDPEVQFNWY LHQDWLNGKE YTLPPSQEEM NNYKTTTPVL HEALHNHYTQ
438	EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCKASQSVD YDGDNYMNWY QQKPGQAPRL LIYAASNLES GIPARFSGSG SGTDFTLTIS SLEPEDFAVY YCHLSNEDLS TFGGGTKVEI KRTVAAPSVF IFPPSDEQLK SGTASVVCLL NNFYPREAKV QWKVDNALQS GNSQESVTEQ DSKDSTYSLS STLTLSKADY EKHKVYACEV THQGLSSPVT KSFNRGEC			

Secuencias de anticuerpo de PD-1 (nivolumab)

SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia
440	región variable de cadena pesada	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLDCKASGITFSN SGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWDGSKRYYA DSVKGRFTISRDNKNTLFLQMNSLRAEDTAV YYCATNDYWGQGTLLTVSS
441	región constante de cadena pesada	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDY FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS LSSVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDK RVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPK

		DTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQ PREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFL YSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYT QKSLSLSLGK
442	región variable de cadena ligera	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYL AWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGS GSGTDFLTITSSLEPEDFAVYYCQQSSNWPRT FGQGTKVEIK
443	región constante de cadena ligera	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFY PREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKD STYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLS SPVTKSFNRGEC
444	FR1 pesada	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLDCKASGITFS
445	CDR1 pesada	NSGMH
446	FR2 pesada	WVRQAPGKGLEWVA
447	CDR2 pesada	VIWYDGSKRYYADSVKG
448	FR3 pesada	RFTISRDN SKNTLFLQMNSLRAEDTAVYYCAT
449	CDR3 pesada	NDDY
450	FR4 pesada	WGQGTLVTVSS
451	FR1 ligera	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSC
452	CDR1 ligera	RASQSVSSYLA
453	FR2 ligera	WYQQKPGQAPRLLIY

454	CDR2 ligera	DASNRAT
455	FR3 ligera	GIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYC
456	CDR3 ligera	QQSSNWPRT
457	FR4 ligera	FGQGTKVEIK

* * *

5 [000383] El alcance de la invención no se limita a las modalidades específicas descritas en la presente. De hecho, diversas modificaciones de la invención además de las que se describen serán evidentes para los expertos en la técnica a partir de la descripción que antecede y las figuras adjuntas. Se pretende que tales modificaciones se encuentren dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

10 [000384] Todas las referencias (por ejemplo, publicaciones, patentes o solicitudes de patente) mencionadas en la presente se incorporan a la presente mediante referencia en su totalidad y a todos los efectos con el mismo alcance como si se hubiese indicado específica e individualmente que cada referencia individual (por ejemplo, publicación, patente o solicitud de patente) se incorpora en su totalidad a todos los efectos mediante referencia.

[000385] Otras modalidades se encuentran dentro de las siguientes reivindicaciones.