

ANTICUERPOS B7-H4 Y ANTICUERPO ANTI-B7-H4/ PROTEÍNAS DE FUSIÓN IL-15

CAMPO

[0001] La presente descripción se refiere en general al campo de la biología molecular y la medicina. Más particularmente, la descripción proporciona proteínas de fusión que comprenden un anticuerpo anti-B7-H4, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, unido a un polipéptido de IL-15, que a su vez está unido a un polipéptido del receptor alfa de IL-15 (IL-15R α) que comprende el dominio sushi de IL-15R α . Además, la descripción proporciona anticuerpos, y fragmentos de unión a antígeno de los mismos, que se unen específicamente a B7-H4, así como proteínas de fusión que comprenden dichos anticuerpos anti-B7-H4, o fragmentos de unión a B7-H4 de los mismos. También se divulgan composiciones terapéuticas que comprenden las fusiones de anticuerpos o los anticuerpos para tratar enfermedades.

ANTECEDENTES

[0002] El B7-H4 es un ligando co-inhibitorio de la familia B7 que se expresa únicamente en las células tumorales, las células presentadoras de antígenos (APC) y los TAM (macrófagos asociados a tumores). El B7-H4 se une a un receptor afín no identificado en las células T. Mientras que la expresión de PD-L1 se asocia a tumores inmunológicamente "calientes", la expresión de B7-H4 marca entornos "fríos". La expresión de B7-H4 se correlaciona negativamente con la expresión de PD-L1. Es importante destacar que la sobreexpresión de B7-H4 se correlaciona con un estadio avanzado de la enfermedad y un mal pronóstico en los pacientes con cáncer. El B7-H4 expresado por los tumores y los TAM inhibe la actividad de las células T antitumorales, promueve un estado de agotamiento y disfunción en las células T, promueve los neutrófilos asociados al tumor (células supresoras derivadas de los mieloides) e induce la producción de células T reguladoras (T_{regs}), IL-6 e IL-10.

[0003] La IL-15 es una glicoproteína de 12.5 kDa con 114 aminoácidos que pertenece a la familia de citoquinas de cuatro hélices α . Esta familia también incluye la IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, el factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) y el GM-CSF. La IL-15 es secretada por macrófagos, células dendríticas y monocitos. La IL-15 puede estimular las

células CD8 de memoria central para que ejerzan la inmunidad sin efectos moduladores sobre otras células T. Además, la IL-15 puede activar los linfocitos citolíticos naturales (NK) y las células T CD8 efectoras y de memoria, y puede rescatar a las células T de la apoptosis inducida por T_{regs} . La administración de IL-15 también se asocia con un menor riesgo de inducir toxicidad sistémica a una dosis más alta en comparación con otras citoquinas. La IL-15 humana puede ser soluble o estar unida a la membrana. La IL-15 unida a la membrana, que es la principal forma de IL-15, se forma por la unión de la IL-15 a la membrana celular directamente o por la presentación de la IL-15 por el receptor IL-15R unido a la membrana. El receptor de la IL-15 está compuesto por tres subunidades: IL-15R α , IL-15R β e IL-15R γ . La IL-15 suele formar un complejo con el receptor α de la IL-15 expresado en las APC antes de unirse a las unidades funcionales IL-15R β y γ de las células T y NK. La IL-15 puede unirse al receptor IL-15R α solo con afinidad ($K_D \approx 10$ pM). También puede unirse al complejo de señalización IL-15R $\beta\gamma$ con menor afinidad ($K_D \approx 1$ nM). El dominio sushi (29.5 kDa) de la IL-15R α cumple una función crítica en la formación de complejos de IL-15 e IL-15R α . Una de las limitaciones del tratamiento sistémico con IL-15 es su corta vida media *in vivo*. Por lo tanto, es necesario generar una forma inmunoestimuladora adecuada de IL-15/IL-15R α que tenga una vida media más larga *in vivo* y que al mismo tiempo conserve su capacidad de modular la respuesta inmunitaria. Además, se necesitan antagonistas eficaces de la IL-15 que puedan dirigirse selectivamente al lugar de la enfermedad para evitar toxicidades sistémicas no deseadas y proporcionar un beneficio terapéutico más eficaz.

[0004] Las terapias combinadas que incluyen anticuerpos B7-H4 con diversas citoquinas como la IL-2, la IL-15, la IL-21, el factor de necrosis tumoral (TNF) y el factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF) pueden tener cierta eficacia en el tratamiento del cáncer y de las infecciones. Sin embargo, estas terapias están limitadas por la toxicidad sistémica que se asocia tanto a las altas concentraciones sanguíneas de citoquinas que se requieren para obtener eficacia como a la falta de especificidad de la citoquina administrada para las células y tejidos afectados.

[0005] Por consiguiente, existe una importante necesidad insatisfecha de desarrollar nuevas estrategias para dirigir varias moléculas efectoras a un lugar de la enfermedad para proporcionar un beneficio terapéutico sin los efectos secundarios asociados a la actividad inmunitaria no específica.

COMPENDIO

[0006] Se proporcionan en la presente memoria proteínas de fusión que comprenden un anticuerpo anti-B7-H4, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, unido a un polipéptido de IL-15, que a su vez está unido a un polipéptido del receptor alfa de IL-15 (IL-15R α) que comprende el dominio sushi de IL-15R α . La descripción proporciona anticuerpos, y fragmentos de unión a antígeno de los mismos, que se unen específicamente a B7-H4, así como proteínas de fusión que comprenden dichos anticuerpos anti-B7-H4, o fragmentos de unión a B7-H4 de los mismos. También se describen métodos de uso de los anticuerpos anti-B7-H4 descritos, o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, o proteínas de fusión para tratar a un sujeto que los necesite.

[0007] En un aspecto, se proporciona un anticuerpo anti-B7-H4, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, en donde el anticuerpo, o el fragmento de unión a antígeno del mismo, comprende una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera, en donde cada una de las regiones variables de cadena pesada y de cadena ligera comprende una CDR1, una CDR2 y una CDR3, y en donde:

- a. La CDR1H comprende la SEQ ID NO:16, la CDR2H comprende la SEQ ID NO:17, la CDR3H comprende la SEQ ID NO:18, y en donde:
 - i. CDR1L comprende SEQ ID NO:20, CDR2L comprende SEQ ID NO:21, y CDR3L comprende SEQ ID NO:22;
 - ii. CDR1L comprende SEQ ID NO:66, CDR2L comprende SEQ ID NO:67, y CDR3L comprende SEQ ID NO:68; o
 - iii. CDR1L comprende SEQ ID NO:70, CDR2L comprende SEQ ID NO:71, y CDR3L comprende SEQ ID NO:72; o
- b. La CDR1H comprende la SEQ ID NO:4, la CDR2H comprende la SEQ ID NO:5, la CDR3H comprende la SEQ ID NO:6, y en donde:
 - i. CDR1L comprende SEQ ID NO: 8, CDR2L comprende SEQ ID NO: 9, y CDR3L comprende SEQ ID NO: 10;
 - ii. CDR1L comprende SEQ ID NO: 77, CDR2L comprende SEQ ID NO: 78, y CDR3L comprende SEQ ID NO: 79; o
 - iii. CDR1L comprende SEQ ID NO: 81, CDR2L comprende SEQ ID NO:82, y CDR3L comprende SEQ ID NO:83.

[0008] En una realización, se proporciona un anticuerpo anti-B7-H4, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, en donde la CDR1H comprende la SEQ ID NO:16, la CDR2H

comprende la SEQ ID NO:17, la CDR3H comprende la SEQ ID NO:18, la CDR1L comprende la SEQ ID NO:70, la CDR2L comprende la SEQ ID NO:71, y la CDR3L comprende la SEQ ID NO:72.

[0009] En una realización, se proporciona un anticuerpo anti-B7-H4, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, en donde:

- a. la región variable de la cadena pesada comprende la SEQ ID NO: 15, o una secuencia que es al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, o al menos el 99 % idéntica a la SEQ ID NO: 15; y en donde
 - i. la región variable de la cadena ligera comprende la SEQ ID NO: x, o una secuencia que es al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, o al menos el 99 % idéntica a la SEQ ID NO: 19;
 - ii. la región variable de la cadena ligera comprende la SEQ ID NO: 65, o una secuencia que es al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, o al menos 99 % idéntica a la SEQ ID NO: 65; **o**
 - iii. la región variable de la cadena ligera comprende la SEQ ID NO: 69, o una secuencia que es al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, o al menos el 99 % idéntica a la SEQ ID NO: 69; **o**
- b. la región variable de la cadena pesada comprende la SEQ ID NO: 3, o una secuencia que es al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, o al menos el 99 % idéntica a la SEQ ID NO: 3; y en donde:
 - i. la región variable de la cadena ligera comprende la SEQ ID NO: 7, o una secuencia que es al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, o al menos 99 % idéntica a la SEQ ID NO: 7;
 - ii. la región variable de la cadena ligera comprende la SEQ ID NO: 76, o una secuencia que es al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, o al menos 99 % idéntica a la SEQ ID NO: 76; **o**
 - iii. la región variable de la cadena ligera comprende la SEQ ID NO: 80, o una secuencia que es al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, o al menos 99 % idéntica a la SEQ ID NO: 80.

[0010] En una realización, se proporciona un anticuerpo anti-B7-H4, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, en donde la región variable de la cadena pesada comprende SEQ ID NO: 15, o una secuencia que es al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, o al menos 99 % idéntica a SEQ ID NO: 15; y la región variable de la cadena ligera comprende la SEQ ID NO: 69, o una secuencia que es al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, o al menos 99 % idéntica a la SEQ ID NO: 69.

[0011] En una realización, se proporciona un anticuerpo anti-B7-H4, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, en donde:

- a. la región variable de la cadena pesada comprende SEQ ID NO: 15 y en donde:
 - i. la región variable de la cadena ligera comprende la SEQ ID NO: 19;
 - ii. la región variable de la cadena ligera comprende la SEQ ID NO: 65;
 - iii. la región variable de la cadena ligera comprende la SEQ ID NO: 69; y
- b. la región variable de la cadena pesada comprende SEQ ID NO: 3 y en donde:
 - i. la región variable de la cadena ligera comprende la SEQ ID NO: 7;
 - ii. la región variable de la cadena ligera comprende la SEQ ID NO: 76; o
 - iii. la región variable de la cadena ligera comprende la SEQ ID NO: 80.

[0012] En una realización, se proporciona un anticuerpo anti-B7-H4, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, en donde la región variable de la cadena pesada comprende la SEQ ID NO: 15 y la región variable de la cadena ligera comprende la SEQ ID NO: 69.

[0013] En una realización, se proporciona un anticuerpo anti-B7-H4, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, en donde el anticuerpo, o el fragmento de unión a antígeno del mismo, se une al dominio IgV del hB7-H4 de humano.

[0014] En un aspecto, se proporciona un anticuerpo anti-B7-H4, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, en donde el anticuerpo, o el fragmento de unión a antígeno del mismo, comprende una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera, en donde cada una de las regiones variables de cadena pesada y de cadena ligera comprende una CDR1, CDR2 y CDR3, y en donde la CDR1H comprende la SEQ ID NO:46, la CDR2H comprende la SEQ ID NO:47, la CDR3H comprende la SEQ ID NO:48 y en donde:

- a. CDR1L comprende SEQ ID NO:50, CDR2L comprende SEQ ID NO:51, y CDR3L comprende SEQ ID NO:52;
- b. CDR1L comprende SEQ ID NO:88, CDR2L comprende SEQ ID NO:89, y CDR3L comprende SEQ ID NO:90;

- c. CDR1L comprende SEQ ID NO:92, CDR2L comprende SEQ ID NO:93, y CDR3L comprende SEQ ID NO:94;
- d. CDR1L comprende SEQ ID NO:96, CDR2L comprende SEQ ID NO:97, y CDR3L comprende SEQ ID NO:98;
- e. CDR1L comprende SEQ ID NO:100, CDR2L comprende SEQ ID NO:101, y CDR3L comprende SEQ ID NO:102;
- f. CDR1L comprende SEQ ID NO:104, CDR2L comprende SEQ ID NO:105, y CDR3L comprende SEQ ID NO:106; o
- g. CDR1L comprende SEQ ID NO:108, CDR2L comprende SEQ ID NO:109, y CDR3L comprende SEQ ID NO:110.

[0015] En una realización, se proporciona un anticuerpo anti-B7-H4, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, en donde la CDR1H comprende la SEQ ID NO:46, la CDR2H comprende la SEQ ID NO:47, la CDR3H comprende la SEQ ID NO:48, la CDR1L comprende la SEQ ID NO:108, la CDR2L comprende la SEQ ID NO:109, y la CDR3L comprende la SEQ ID NO:110.

[0016] En una realización, se proporciona un anticuerpo anti-B7-H4, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, en donde la región variable de la cadena pesada comprende la SEQ ID NO:45, o una secuencia que es al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, o al menos el 99 % idéntica a la SEQ ID NO:45 y en donde:

- a. la región variable de la cadena ligera comprende la SEQ ID NO:49, o una secuencia que es al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, o al menos el 99 % idéntica a la SEQ ID NO:49;
- b. la región variable de la cadena ligera comprende la SEQ ID NO:87, o una secuencia que es al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, o al menos el 99 % idéntica a la SEQ ID NO:87;
- c. la región variable de la cadena ligera comprende la SEQ ID NO:91, o una secuencia que es al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, o al menos el 99 % idéntica a la SEQ ID NO:91;
- d. la región variable de la cadena ligera comprende la SEQ ID NO:95, o una secuencia que es al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, o al menos el 99 % idéntica a la SEQ ID NO:95;

- e. la región variable de la cadena ligera comprende la SEQ ID NO:99, o una secuencia que es al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, o al menos el 99 % idéntica a la SEQ ID NO:99;
- f. la región variable de la cadena ligera comprende la SEQ ID NO:103, o una secuencia que es al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, o al menos 99 % idéntica a la SEQ ID NO:103; o
- g. la región variable de la cadena ligera comprende la SEQ ID NO:107, o una secuencia que es al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, o al menos el 99 % idéntica a la SEQ ID NO:107.

[0017] En una realización, se proporciona un anticuerpo anti-B7-H4, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, en donde la región variable de la cadena pesada comprende SEQ ID NO:45, o una secuencia que es al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, o al menos 99 % idéntica a SEQ ID NO:45; y la región variable de la cadena ligera comprende SEQ ID NO:107, o una secuencia que es al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, o al menos 99 % idéntica a SEQ ID NO:107.

[0018] En una realización, se proporciona un anticuerpo anti-B7-H4, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, en donde la región variable de la cadena pesada comprende SEQ ID NO: 45 y en donde:

- a. la región variable de la cadena ligera comprende la SEQ ID NO:49;
- b. la región variable de la cadena ligera comprende la SEQ ID NO:87;
- c. la región variable de la cadena ligera comprende la SEQ ID NO:91;
- d. la región variable de la cadena ligera comprende la SEQ ID NO:95;
- e. la región variable de la cadena ligera comprende la SEQ ID NO:99;
- f. la región variable de la cadena ligera comprende la SEQ ID NO:103; o
- g. la región variable de la cadena ligera comprende la SEQ ID NO:107.

[0019] En una realización, se proporciona un anticuerpo anti-B7-H4, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, en donde la región variable de la cadena pesada comprende la SEQ ID NO:45 y la región variable de la cadena ligera comprende la SEQ ID NO:107.

[0020] En una realización, se proporciona un anticuerpo anti-B7-H4, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, en donde el anticuerpo, o el fragmento de unión a antígeno del mismo, se une al dominio IgC del hB7-H4 de humano y de murino.

[0021] En un aspecto, se proporciona un anticuerpo anti-B7-H4, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, en donde el anticuerpo, o el fragmento de unión a antígeno del mismo, comprende una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera, en donde cada una de las regiones variables de cadena pesada y de cadena ligera comprende una CDR1, una CDR2 y una CDR3, en donde la CDR1H comprende la SEQ ID NO:58, la CDR2H comprende la SEQ ID NO:59, la CDR3H comprende la SEQ ID NO:60, y en donde:

- a. CDR1L comprende SEQ ID NO:62, CDR2L comprende SEQ ID NO:63, y CDR3L comprende SEQ ID NO:64;
- b. CDR1L comprende SEQ ID NO:115, CDR2L comprende SEQ ID NO:116, y CDR3L comprende SEQ ID NO:117;
- c. CDR1L comprende SEQ ID NO:119, CDR2L comprende SEQ ID NO:120, y CDR3L comprende SEQ ID NO:121;
- d. CDR1L comprende SEQ ID NO:123, CDR2L comprende SEQ ID NO:124, y CDR3L comprende SEQ ID NO:125;
- e. CDR1L comprende SEQ ID NO:127, CDR2L comprende SEQ ID NO:128, y CDR3L comprende SEQ ID NO:129; o
- f. CDR1L comprende SEQ ID NO:131, CDR2L comprende SEQ ID NO:132, y CDR3L comprende SEQ ID NO:133.

[0022] En una realización, se proporciona un anticuerpo anti-B7-H4, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, en donde la CDR1H comprende la SEQ ID NO:58, la CDR2H comprende la SEQ ID NO:59, la CDR3H comprende la SEQ ID NO:60, la CDR1L comprende la SEQ ID NO:119, la CDR2L comprende la SEQ ID NO:120, y la CDR3L comprende la SEQ ID NO:121.

[0023] En una realización, se proporciona un anticuerpo anti-B7-H4, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, en donde la región variable de la cadena pesada comprende la SEQ ID NO:57, o una secuencia que es al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, o al menos el 99 % idéntica a la SEQ ID NO:57 y en donde:

- a. la región variable de la cadena ligera comprende la SEQ ID NO:61, o una secuencia que es al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, o al menos el 99 % idéntica a la SEQ ID NO:61;

- b. la región variable de la cadena ligera comprende la SEQ ID NO:114, o una secuencia que es al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, o al menos el 99 % idéntica a la SEQ ID NO:114;
- c. la región variable de la cadena ligera comprende la SEQ ID NO:118, o una secuencia que es al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, o al menos el 99 % idéntica a la SEQ ID NO:118;
- d. la región variable de la cadena ligera comprende la SEQ ID NO:122, o una secuencia que es al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, o al menos el 99 % idéntica a la SEQ ID NO:122;
- e. la región variable de la cadena ligera comprende la SEQ ID NO:126, o una secuencia que es al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, o al menos 99 % idéntica a la SEQ ID NO:126; o
- f. la región variable de la cadena ligera comprende la SEQ ID NO:130, o una secuencia que es al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, o al menos el 99 % idéntica a la SEQ ID NO:130.

[0024] En una realización, se proporciona un anticuerpo anti-B7-H4, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, en donde la región variable de la cadena pesada comprende SEQ ID NO:57, o una secuencia que es al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, o al menos 99 % idéntica a SEQ ID NO:57; y la región variable de la cadena ligera comprende SEQ ID NO:118, o una secuencia que es al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, o al menos 99 % idéntica a SEQ ID NO:118.

[0025] En una realización, se proporciona un anticuerpo anti-B7-H4, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, en donde la región variable de la cadena pesada comprende SEQ ID NO:57 y en donde:

- a. la región variable de la cadena ligera comprende la SEQ ID NO:61;
- b. la región variable de la cadena ligera comprende la SEQ ID NO:114;
- c. la región variable de la cadena ligera comprende la SEQ ID NO:118;
- d. la región variable de la cadena ligera comprende la SEQ ID NO:122;
- e. la región variable de la cadena ligera comprende la SEQ ID NO:126; o
- f. la región variable de la cadena ligera comprende la SEQ ID NO:130.

[0026] En una realización, se proporciona un anticuerpo anti-B7-H4, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, en donde la región variable de la cadena pesada comprende la SEQ ID NO:57 y la región variable de la cadena ligera comprende la SEQ ID NO:118.

[0027] En una realización, se proporciona un anticuerpo anti-B7-H4, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, en donde el anticuerpo, o el fragmento de unión a antígeno del mismo, se une al dominio IgV del hB7-H4 de humano y de murino.

[0028] En una realización, se proporciona un anticuerpo anti-B7-H4, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, que se une al mismo epítipo de B7-H4 que el anticuerpo anti-B7-H4, o un fragmento de unión a antígeno del mismo descrito en la presente memoria.

[0029] En una realización, se proporciona un anticuerpo anti-B7-H4, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, en donde el anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno es un anticuerpo quimérico, un anticuerpo injertado con CDR, o un anticuerpo humanizado o un fragmento de unión a antígeno del mismo.

[0030] En una realización, se proporciona un anticuerpo anti-B7-H4, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, en donde el anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno es un anticuerpo multiespecífico o biespecífico o un fragmento de unión a antígeno del mismo.

[0031] En una realización, se proporciona un anticuerpo anti-B7-H4 o un fragmento de unión a antígeno del mismo, en donde el anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno es un scFv, Fv, Fab', Fab, F(ab')₂, o diacuerpo.

[0032] En una realización, se proporciona un anticuerpo anti-B7-H4, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, en donde el anticuerpo es una inmunoglobulina de clase IgG.

[0033] En una realización, se proporciona un anticuerpo anti-B7-H4, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, en donde el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno tiene isotipo IgG1.

[0034] En una realización, se proporciona un anticuerpo anti-B7-H4, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, en donde el anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno está desglucosilado.

[0035] En una realización, se proporciona un anticuerpo anti-B7-H4, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, en donde el anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno comprende una primera y una segunda región constante de cadena pesada, y en donde el anticuerpo, o el fragmento de unión a antígeno del mismo, comprende al menos una modificación en los dominios CH3 de la primera y la segunda región constante de cadena pesada que causa heterodimerización. En una realización, la modificación en el dominio CH3

de la primera región constante de cadena pesada es diferente de la modificación en el dominio CH3 de la segunda región constante de cadena pesada. En una realización, la primera región constante de cadena pesada comprende una o más sustituciones de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en S354C, T366W, Y349C, T366S, L368A, e Y407V (numeración de índice Kabat EU) y la segunda región constante de cadena pesada comprende una o más sustituciones de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en S354C, T366W, Y349C, T366S, L368A, e Y407V (numeración de índice Kabat EU). En algunas realizaciones, (i) la primera región constante de la cadena pesada comprende una o más sustituciones de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en S354C y T366W (numeración del índice EU de Kabat) y la segunda región constante de la cadena pesada comprende una o más sustituciones de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en Y349C, T366S, L368A, e Y407V (numeración del índice EU de Kabat); o (ii) la segunda región constante de la cadena pesada comprende una o más sustituciones de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en S354C y T366W (numeración del índice EU de Kabat) y la primera región constante de la cadena pesada comprende una o más sustituciones de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en Y349C, T366S, L368A, e Y407V (numeración del índice EU de Kabat). En algunas realizaciones, (i) la primera región constante de la cadena pesada comprende las sustituciones de aminoácidos S354C y T366W (numeración del índice EU de Kabat) y la segunda región constante de la cadena pesada comprende las sustituciones de aminoácidos Y349C, T366S, L368A, e Y407V (numeración del índice EU de Kabat); o (ii) la segunda región constante de la cadena pesada comprende las sustituciones de aminoácidos S354C y T366W (numeración del índice EU de Kabat) y la primera región constante de la cadena pesada comprende las sustituciones de aminoácidos Y349C, T366S, L368A e Y407V (numeración del índice EU de Kabat). En una realización, la primera región constante de la cadena pesada, la segunda región constante de la cadena pesada, o ambas, comprenden las sustituciones de aminoácidos M428L y N434S (numeración del índice EU de Kabat).

[0036] En un aspecto, se proporciona una proteína de fusión que comprende:

- a. un anticuerpo anti-B7-H4, o un fragmento de unión a antígeno del mismo;
- b. un polipéptido del dominio sushi de la IL-15R α que comprenda la SEQ ID NO:167, o una secuencia de aminoácidos que al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 %, o al menos un 99 % idéntica a la SEQ ID NO:167; y

- c. un polipéptido de IL-15 que comprenda la SEQ ID NO:166, o una secuencia de aminoácidos que sea al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, o al menos el 99 % idéntica a la SEQ ID NO:166.

[0037] En algunas realizaciones, la proteína de fusión comprende una cadena pesada CDR1 (CDR1H), CDR2 (CDR2H) y CDR3 (CDR3H) y una cadena ligera CDR1 (CDR1L), CDR2 (CDR2L) y CDR3 (CDR3L), donde CDR1H comprende SEQ ID NO:16, CDR2H comprende SEQ ID NO:17, CDR3H comprende SEQ ID NO:18, CDR1L comprende SEQ ID NO:70, CDR2L comprende SEQ ID NO:71, y CDR3L comprende SEQ ID NO:72. En algunas realizaciones, la proteína de fusión comprende una cadena pesada CDR1 (CDR1H), CDR2 (CDR2H) y CDR3 (CDR3H) y una cadena ligera CDR1 (CDR1L), CDR2 (CDR2L) y CDR3 (CDR3L), donde CDR1H comprende SEQ ID NO:172, CDR2H comprende SEQ ID NO:173, CDR3H comprende SEQ ID NO:174, CDR1L comprende SEQ ID NO:175, CDR2L comprende SEQ ID NO:176, y CDR3L comprende SEQ ID NO:177. En algunas realizaciones, la proteína de fusión comprende una cadena pesada CDR1 (CDR1H), CDR2 (CDR2H) y CDR3 (CDR3H) y una cadena ligera CDR1 (CDR1L), CDR2 (CDR2L) y CDR3 (CDR3L), donde CDR1H comprende SEQ ID NO:178, CDR2H comprende SEQ ID NO:179, CDR3H comprende SEQ ID NO:180, CDR1L comprende SEQ ID NO:181, CDR2L comprende SEQ ID NO:182, y CDR3L comprende SEQ ID NO:183. En algunas realizaciones, la proteína de fusión comprende una cadena pesada CDR1 (CDR1H), CDR2 (CDR2H) y CDR3 (CDR3H) y una cadena ligera CDR1 (CDR1L), CDR2 (CDR2L) y CDR3 (CDR3L), donde CDR1H comprende SEQ ID NO:184, CDR2H comprende SEQ ID NO:185, CDR3H comprende SEQ ID NO:186, CDR1L comprende SEQ ID NO:187, CDR2L comprende SEQ ID NO:188, y CDR3L comprende SEQ ID NO:189.

[0038] En una realización, el polipéptido de dominio sushi de la IL-15R α comprende la SEQ ID NO:167. En una realización, el polipéptido de dominio sushi de IL-15R α consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:167. En una realización, el polipéptido de IL-15 comprende SEQ ID NO:166. En una realización, el polipéptido de IL-15 consiste en SEQ ID NO:166. En una realización, el polipéptido del dominio sushi de IL-15R α está fusionado al terminal N del polipéptido de IL-15.

[0039] En una realización, el anticuerpo anti-B7-H4, o el fragmento de unión a antígeno del mismo, comprende una primera y una segunda región constante de cadena pesada, y en donde el polipéptido del dominio sushi de la IL-15R α y el polipéptido de la IL-15 están

fusionados al terminal C de la primera región constante de cadena pesada. En una realización, la proteína de fusión comprende un enlazador que une (i) el polipéptido de dominio sushi de IL-15R α y el polipéptido de IL-15 y (ii) el terminal C de la región constante. En algunas realizaciones, el enlazador tiene una longitud de entre 25-35 aminoácidos. En algunas realizaciones, el enlazador consiste predominantemente en Gly (G), Asn (N), Ser (S), Thr (T), Ala (A), Leu (L) y Gln (Q). En una realización, el enlazador comprende SEQ ID NO:168. En una realización, la proteína de fusión comprende SEQ ID NO:169. En una realización, la primera y la segunda regiones constantes de cadena pesada comprenden al menos una modificación en los dominios CH3 de la primera y la segunda región constante de cadena pesada que causa heterodimerización. En una realización, la modificación en el dominio CH3 de la primera región constante de cadena pesada es diferente de la modificación en el dominio CH3 de la segunda región constante de cadena pesada. En una realización, la primera región constante de cadena pesada comprende una o más sustituciones de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en S354C, T366W, Y349C, T366S, L368A e Y407V (numeración de índice Kabat EU). En algunas realizaciones, (i) la primera región constante de la cadena pesada comprende una o más sustituciones de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en S354C y T366W (numeración del índice EU de Kabat) y la segunda región constante de la cadena pesada comprende una o más sustituciones de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en Y349C, T366S, L368A, e Y407V (numeración del índice EU de Kabat); o (ii) la segunda región constante de la cadena pesada comprende una o más sustituciones de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en S354C y T366W (numeración del índice EU de Kabat) y la primera región constante de la cadena pesada comprende una o más sustituciones de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en Y349C, T366S, L368A, e Y407V (numeración del índice EU de Kabat). En algunas realizaciones, (i) la primera región constante de la cadena pesada comprende las sustituciones de aminoácidos S354C y T366W (numeración del índice EU de Kabat) y la segunda región constante de la cadena pesada comprende las sustituciones de aminoácidos Y349C, T366S, L368A, e Y407V (numeración del índice EU de Kabat); o (ii) la segunda región constante de la cadena pesada comprende las sustituciones de aminoácidos S354C y T366W (numeración del índice EU de Kabat) y la primera región constante de la cadena pesada comprende las sustituciones de aminoácidos Y349C, T366S, L368A e Y407V (numeración del índice EU de Kabat). En una realización, la primera región constante de la cadena pesada, la segunda región constante de la cadena pesada, o ambas, comprenden las

sustituciones de aminoácidos M428L y N434S (numeración del índice EU de Kabat). En una realización, la proteína de fusión comprende no más de un polipéptido del dominio sushi de IL-15R α y no más de un polipéptido de IL-15. En algunas realizaciones, la proteína de fusión comprende un anticuerpo anti-B7-H4, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, descrito en la presente memoria.

[0040] En un aspecto, se proporciona una proteína de fusión que comprende:

- a. una cadena ligera que comprende SEQ ID NO:69 y/o SEQ ID NO:145;
- b. una primera cadena pesada que comprende la SEQ ID NO:150 o la SEQ ID NO:151; y
- c. una segunda cadena pesada que comprende la SEQ ID NO:157 o la SEQ ID NO:158.

[0041] En una realización, la primera cadena pesada comprende SEQ ID NO:150; y la segunda cadena pesada comprende SEQ ID NO:157. En una realización, la primera cadena pesada comprende SEQ ID NO:151; y la segunda cadena pesada comprende SEQ ID NO:158.

[0042] En un aspecto, se proporciona una proteína de fusión que comprende:

- a. una cadena ligera que comprende SEQ ID NO:118 y/o SEQ ID NO:144;
- b. una primera cadena pesada que comprende la SEQ ID NO:148 o la SEQ ID NO:149; y
- c. una segunda cadena pesada que comprende la SEQ ID NO:155 o la SEQ ID NO:156.

[0043] En una realización, la primera cadena pesada comprende SEQ ID NO:148; y la segunda cadena pesada comprende SEQ ID NO:155.

[0044] En una realización, la primera cadena pesada comprende SEQ ID NO:149; y la segunda cadena pesada comprende SEQ ID NO:156.

[0045] En un aspecto, se proporciona una proteína de fusión que comprende: una cadena ligera que comprende SEQ ID NO:145; una primera cadena pesada que comprende SEQ ID NO:150; y una segunda cadena pesada que comprende SEQ ID NO:157.

[0046] En un aspecto, se proporciona una secuencia de ácido nucleico que codifica un anticuerpo anti-B7-H4, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, o una proteína de fusión descrita en la presente memoria.

[0047] En la presente memoria se proporciona un vector que comprende un ácido nucleico descrito en la presente memoria. En la presente memoria se proporciona un conjunto de

vectores que comprenden dos o más moléculas de ácido nucleico descritas en la presente memoria.

[0048] En la presente memoria se proporciona una célula que comprende un ácido nucleico o un vector descrito en la presente memoria. En la presente memoria se proporciona una célula que expresa un anticuerpo anti-B7-H4, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, o una proteína de fusión descrita en la presente memoria. En la presente memoria se proporciona una célula T que expresa un anticuerpo anti-B7-H4, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, o una proteína de fusión descrita en la presente memoria. En la presente memoria se proporciona una célula T que expresa una proteína de unión a anti-B7-H4 que comprende las cadenas variables pesada y ligera de un anticuerpo anti-B7-H4, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, descrito en la presente memoria. En algunas realizaciones, la célula está aislada.

[0049] En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-B7-H4, o el fragmento de unión a antígeno del mismo, o la proteína de fusión se conjuga con una o más de una citotoxina, una etiqueta fluorescente y un agente de imagen.

[0050] En la presente memoria se proporciona una composición farmacéutica que comprende (i) un anticuerpo anti-B7-H4, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, o una proteína de fusión descrita en la presente memoria y (ii) un portador farmacéuticamente aceptable.

[0051] En la presente memoria se proporciona un método para producir un anticuerpo anti-B7-H4, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, o una proteína de fusión descrita en la presente memoria, el método comprende el cultivo de la célula descrita en la presente memoria en condiciones tales que se produzca el anticuerpo anti-B7-H4, o el fragmento de unión a antígeno del mismo, o la proteína de fusión.

[0052] En la presente memoria se proporciona un método para inhibir la unión de B7-H4 a un ligando de B7-H4 en un sujeto que lo necesita, el método comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz de un anticuerpo anti-B7-H4, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, o una proteína de fusión descrita en la presente memoria.

[0053] En la presente memoria se proporciona un método para aumentar la activación de las células T en un sujeto que lo necesita, el método comprende la administración al sujeto de una cantidad eficaz de un anticuerpo anti-B7-H4, o de un fragmento de unión a antígeno del mismo, o de una proteína de fusión descrita en la presente memoria.

[0054] En la presente memoria se proporciona un método para aumentar la proliferación de células T CD8⁺ en un sujeto que lo necesita, el método comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz de un anticuerpo anti-B7-H4, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, o una proteína de fusión descrita en la presente memoria.

[0055] En la presente memoria se proporciona un método para inducir citotoxicidad mediada por células dependientes de anticuerpos (ADCC) en una célula que expresa B7-H4 en un sujeto que lo necesita, el método comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz de un anticuerpo anti-B7-H4, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, o una proteína de fusión descrita en la presente memoria.

[0056] En la presente memoria se proporciona un método para estimular el sistema inmunitario en un sujeto que lo necesita, el método comprende la administración al sujeto de una cantidad eficaz de un anticuerpo anti-B7-H4, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, o una proteína de fusión descrita en la presente memoria.

[0057] En la presente memoria se proporciona un método para tratar el cáncer en un sujeto que lo necesita, el método comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz de un anticuerpo anti-B7-H4, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, o una proteína de fusión descrita en la presente memoria. En algunas realizaciones, el cáncer es un cáncer de ovario, un melanoma, un cáncer de páncreas, un cáncer de tiroides, un cáncer de pulmón, un cáncer colorrectal, un cáncer epidermoide, un cáncer de próstata, un cáncer de mama, un cáncer de vejiga o un cáncer gástrico. En algunas realizaciones, el cáncer es un cáncer de mama triple negativo o un cáncer de ovario.

[0058] En la presente memoria se proporciona un método para reducir el crecimiento de un tumor en un sujeto que lo necesita, el método comprende la administración al sujeto de una cantidad eficaz de un anticuerpo anti-B7-H4, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, o una proteína de fusión descrita en la presente memoria.

[0059] En la presente memoria se proporciona un método para reducir la metástasis tumoral en un sujeto que lo necesita, el método comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz de un anticuerpo anti-B7-H4, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, o una proteína de fusión descrita en la presente memoria.

[0060] En una realización, el método comprende además la administración de un agente terapéutico adicional o una terapia adicional. En algunas realizaciones, el agente terapéutico adicional se selecciona del grupo que consiste en una vacuna contra el cáncer, un inhibidor del punto de control, un anticuerpo contra un antígeno específico del tumor, una vacuna de

Bacillus Calmette-Guerin, una citotoxina un inhibidor del receptor de la interleucina 6 (IL-6R), un inhibidor del receptor de la interleucina 4 (IL-4R), un inhibidor de la IL-10, la IL-2, la IL-7, la IL-21, la IL-15, un conjugado anticuerpo-fármaco, un medicamento antiinflamatorio y un suplemento dietético. En algunas realizaciones, el inhibidor del punto de control es un inhibidor de CTLA-4, PD-1, PD-L1 o PD-L2. En algunas realizaciones, el agente terapéutico adicional es un inhibidor de LAG3, TIGIT, LAP, Podoplanina, receptor de la proteína C, ICOS, GITR, CD226 o CD160. En algunas realizaciones, la terapia adicional es quimioterapia, radioterapia o cirugía. En algunas realizaciones, el agente terapéutico adicional o la terapia adicional se administran de forma concurrente o consecutiva con el anticuerpo anti-B7-H4, o el fragmento de unión a antígeno del mismo, o la proteína de fusión. En algunas realizaciones, el agente terapéutico adicional se administra por separado o como una mezcla con el anticuerpo anti-B7-H4, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, o la proteína de fusión.

[0061] En una realización, el sujeto tiene una expresión regulada de B7-H4, o el sujeto ha sido identificado como positivo para la expresión de B7-H4. En una realización, el sujeto no responde a la terapia con un inhibidor de puntos de control o responde inicialmente al tratamiento con un inhibidor de puntos de control, pero posteriormente se ha vuelto resistente al bloqueo del inhibidor de puntos de control. En una realización, el sujeto es un humano.

[0062] En un aspecto, se proporciona un método para detectar B7-H4 en una muestra, el método comprende poner en contacto de la muestra con un anticuerpo anti-B7-H4, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, o una proteína de fusión descrita en la presente memoria.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

[0063] La Fig. 1A ilustra la estructura única del B7-H4, que incluye una IgC altamente glicosilada y una cola citoplasmática muy corta. La Fig. 1B muestra una proteína de fusión ejemplar descrita en la presente memoria.

[0064] La Fig. 2 ilustra el proceso de obtención de anticuerpos B7-H4 de alta afinidad mediante el barrido de bibliotecas de visualización de fagos scFv totalmente humanos (Superman 2.0 de Distributed Bio) sobre B7-H4, seguido de la maduración por afinidad (transposición de cadenas ligeras).

[0065] Las Figs. 3A, 3B, 3C, 3D, 3E y 3F ilustran la unión de los anticuerpos 1D3, 3F2, 1A12, 1F11 y 6C3 a B7-H4 tanto soluble como celular. Se realizaron experimentos de ELISA para determinar la unión a hB7-H4-Fc (Fig. 3A), hB7-H4-his (Fig. 3B), mB7-H4-Fc (Fig. 3C) y al dominio IgV de hB7-H4 (Fig. 3D). Se realizaron experimentos de citometría de flujo para determinar la unión a células CHO que expresan hB7-H4 (Fig. 3E) o mB7-H4 (Fig. 3F). Los anticuerpos 1D3, 3F2, 1A12, 1F11 y 6C3 se unieron al hB7-H4 tanto soluble como celular, específicamente al dominio IgV del hB7-H4.

[0066] Las Figs. 4A, 4B, 4C, 4D, 4E y 4F ilustran la unión de los anticuerpos 6C3, 1D3, 3D1 y 4H6 a B7-H4 tanto soluble como celular. Se realizaron experimentos ELISA para determinar la unión a hB7-H4-Fc (Fig. 4A), hB7-H4-his (Fig. 4B), dominio IgV de hB7-H4 (Fig. 4C) y dominio IgV de mB7-H4 (Fig. 4D). Se realizaron experimentos de citometría de flujo para determinar la unión a células CHO que expresan hB7-H4 (Fig. 4E) o mB7-H4 (Fig. 4F). Los anticuerpos 6C3, 1D3, 3D1 y 4H6 se unieron al hB7-H4 tanto soluble como celular, específicamente al dominio IgV del hB7-H4. Como control se utilizó un anticuerpo de unión IgV de reacción cruzada.

[0067] Las Figs. 5A, 5B, 5C, 5D, 5E, 5F y 5G ilustran la unión del anticuerpo 9H2 al B7-H4 soluble y celular. Se realizaron experimentos ELISA para determinar la unión a hB7-H4-Fc (Fig. 5A), hB7-H4-his (Fig. 5B), dominio mB7-H4-Fc (Fig. 5C), dominio hB7-H4 IgV (Fig. 5D) y dominio hB7-H4 IgC (Fig. 5E). Se realizaron experimentos de citometría de flujo para determinar la unión a células CHO que expresan hB7-H4 (Fig. 5F) o mB7-H4 (Fig. 5G). El anticuerpo 9H2 se unió tanto al hB7-H4 tanto soluble como celular, específicamente al dominio IgV del hB7-H4. Se utilizaron como controles un anticuerpo de unión a IgV de reacción cruzada y un anticuerpo de unión a IgC.

[0068] Las Figs. 6A, 6B, 6C, 6D, 6E y 6F ilustran la unión de los anticuerpos 5G6, 9E1, 5F4, 5E4 y 4B9 a B7-H4 tanto soluble como celular. Se realizaron experimentos ELISA para determinar la unión a hB7-H4-Fc (Fig. 6A), mB7-H4-hFc (Fig. 6B), dominio IgV de hB7-H4 (Fig. 6C) y dominio IgV de mB7-H4 (Fig. 6D). Se realizaron experimentos de citometría de flujo para determinar la unión a células CHO que expresan hB7-H4 (Fig. 6E) o mB7-H4 (Fig. 6F). Los anticuerpos 5E4, 5F4, 5G6 y 9E1 se unieron al dominio IgC del B7-H4 tanto humano como de ratón. El anticuerpo 4B9 se unió fuertemente al hB7-H4-Fc pero no se unió al mB7-H4. La unión del anticuerpo 4B9 requirió tanto IgV como IgC. Se utilizó como control un anticuerpo de unión IgV de reacción cruzada.

[0069] Las Figs. 7A, 7B, 7C, 7D, 7E, 7F, 7G y 7H ilustran la unión de los anticuerpos 9D11, 24B6, 15B11, 30G4 y 24F4 a B7-H4 tanto soluble como celular. Se realizaron experimentos ELISA para determinar la unión a hB7-H4-Fc (Fig. 7A), a hB7-H4-His (Fig. 7B), a mB7-H4-hFc (Fig. 7C), a mB7-H4-His (Fig. 7D), al dominio IgC de hB7-H4 (Fig. 7E) y al dominio IgC de mB7-H4 (Fig. 7F). Se realizaron experimentos de citometría de flujo para determinar la unión a células CHO que expresan hB7-H4 (Fig. 7G) o mB7-H4 (Fig. 7H). Los anticuerpos 9D11, 24B6, 15B11, 30G4 y 24F4 se unieron al dominio IgC del B7-H4 tanto humano como de ratón. Como control se utilizó un anticuerpo de unión IgC de reacción cruzada.

[0070] Las Figs. 8A, 8B, 8C, 8D, 8E, 8F, 8G y 8H ilustran la unión de los anticuerpos 39A11 y 31D7 a B7-H4 tanto soluble como celular. Se realizaron experimentos ELISA para determinar la unión a hB7-H4-Fc (Fig. 8A), a hB7-H4-His (Fig. 8B), a mB7-H4-hFc (Fig. 8C), a mB7-H4-His (Fig. 8D), dominio IgV hB7-H4 (Fig. 8E), dominio IgC hB7-H4 (Fig. 8F), dominio IgV mB7-H4 (Fig. 8G) y dominio IgC mB7-H4 (Fig. 8H). Se realizaron experimentos de citometría de flujo para determinar la unión a células CHO que expresan hB7-H4 (Fig. 8I) o mB7-H4 (Fig. 8J). Los anticuerpos 39A11 y 31D7 se unieron al dominio IgV del B7-H4 tanto humano como de ratón. Como control se utilizó un anticuerpo de unión IgV de reacción cruzada.

[0071] Las Figs. 9A, 9B, 9C, 9D, 9E, 9F, 9G, 9H ilustran la unión de los anticuerpos 1D3/1D3, derivado de 1D3/1D3 1D3/45A2, derivado de 1D3/1D3 1D3/47B2, 3F2/3F2, derivado de 3F2/3F2 3F2/50A10, y derivado de 3F2/3F2 3F2/49A2 a B7-H4 soluble. Se realizaron experimentos ELISA para determinar la unión a hB7-H4-Fc (Fig. 9A), mB7-H4-Fc (Fig. 9B), hB7-H4-his (Fig. 9C), mB7-H4-his (Fig. 9D), dominio IgV hB7-H4 (Fig. 9E), dominio IgV mB7-H4 (Fig. 9F), dominio IgC hB7-H4 (Fig. 9G), dominio IgC mB7-H4 (Fig. 9H). Los derivados 3F2 3F2/50A10 y 3F2/49A2 tienen la misma secuencia de cadena pesada que 3F2, pero una secuencia de cadena ligera diferente a la de 3F2. Los derivados de 1D3 1D3/47B2 y 1D3/45A2 tienen la misma secuencia de cadena pesada que 1D3, pero una secuencia de cadena ligera diferente a la de 1D3. Los anticuerpos C3 y 49A2 tienen las mismas secuencias VH y VL.

[0072] Las Figs. 10A, 10B, 10C, 10D ilustran la unión de los anticuerpos 1D3/1D3, derivado de 1D3/1D3 1D3/45A2, derivado de 1D3/1D3 1D3/47B2, 3F2/3F2, derivado de 3F2/3F2 3F2/50A10, y derivado de 3F2/3F2 3F2/49A2 a B7-H4 unido a células. Se realizaron experimentos de citometría de flujo para determinar la unión a células CHO que

expresan hB7-H4 (Fig. **10A**), a células CHO que expresan mB7-H4 (Fig. **10B**), a la estirpe celular de cáncer de mama triple negativo MDA-MB-468 que expresa hB7-H4 (Fig. **10C**) y a la estirpe celular de cáncer de ovario SK-BR-3 que expresa hB7-H4 (Fig. **10D**).

[0073] Las Figs. **11A, 11B, 11C, 11D, 11E y 11F** ilustran la unión del anticuerpo 9D11/9D11 y de los derivados de 9D11/9D11 9D11/67H9, 9D11/67C3, 9D11/67C6, 9D11/67E12 y 9D11/67G3 a B7-H4 soluble. Se realizaron experimentos ELISA para determinar la unión a hB7-H4-Fc (Fig. **11A**), mB7-H4-Fc (Fig. **11B**), dominio IgC de hB7-H4 (Fig. **11C**), dominio IgC de mB7-H4 (Fig. **11D**), dominio IgV de hB7-H4 (Fig. **11E**) y dominio IgV de mB7-H4 (Fig. **10F**). Los derivados 9D11/67E12, 9D11/67C3, 9D11/67C6, 9D11/67H9, 9D11/67G3 y 9D11/68F5 tienen la misma secuencia de cadena pesada que el 9D11, pero una secuencia de cadena ligera diferente a la del 9D11.

[0074] Las Figs. **12A, 12B, 12C y 12D** ilustran la unión de los derivados de 9D11/9D11 9D11/67C3, 9D11/67E12 y 9D11/68F5 a B7-H4 soluble. Se realizaron experimentos ELISA para determinar la unión a hB7-H4-Fc (Fig. **12A**), mB7-H4-Fc (Fig. **12B**), hB7-H4-his (Fig. **12C**) y hB7-H4-his (Fig. **12D**). Los derivados de 9D11 9D11/67C3, 9D11/67E12 y 9D11/68F5 tienen la misma secuencia de cadena pesada que 9D11, pero una secuencia de cadena ligera diferente a la de 9D11.

[0075] Las Figs. **13A y 13B** ilustran la unión de los anticuerpos 9D11/9D11 y los derivados de 9D11/9D11 9D11/67C3, 9D11/67C6, 9D11/67E12, 9D11/67G3, 9D11/67H9 y 9D11/68F5 a B7-H4 unido a las células. Se realizaron experimentos de citometría de flujo para determinar la unión a las células CT26 que expresan mB7-H4 (Fig. **13A**) y a las células SK-BR-3 que expresan hB7-H4 (Fig. **13B**). Los derivados de 9D11 9D11/67C3, 9D11/67C6, 9D11/67E12, 9D11/67G3, 9D11/67H9 y 9D11/68F5 tienen la misma secuencia de cadena pesada que 9D11, pero una secuencia de cadena ligera diferente a la de 9D11.

[0076] Las Figs. **14A, 14B, 14C, 14D, 14E y 14F** ilustran la unión del anticuerpo 39A11/39A11 y los derivados de 39A11/39A11 39A11/62F9, 39A11/56H7, 39A11/57G8, 39A11/57H3 y 39A11/56A9 a B7-H4 soluble. Se realizaron experimentos ELISA para determinar la unión a hB7-H4-Fc (Fig. **14A**), mB7-H4-Fc (Fig. **14B**), dominio IgV de hB7-H4 (Fig. **14C**), dominio IgV de mB7-H4 (Fig. **14D**), dominio IgC de hB7-H4 (Fig. **14E**) y dominio IgC de mB7-H4 (Fig. **14F**). Los derivados de 39A11 39A11/62F9, 39A11/56H7, 39A11/57G8, 39A11/57H3 y 39A11/56A9 tienen la misma secuencia de cadena pesada que el 39A11, pero una secuencia de cadena ligera diferente a la del 39A11.

[0077] Las Figs. 15A y 15B ilustran la unión de los anticuerpos 39A11/39A11 y los derivados de 39A11/39A11 39A11/62F9, 39A11/56H7, 39A11/57G8, 39A11/57H3 y 39A11/56A9 a B7-H4 unido a las células. Se realizaron experimentos de citometría de flujo para determinar la unión a las células CT26 que expresan mB7-H4 (Fig. 15A) y a las células SK-BR-3 que expresan hB7-H4 (Fig. 15B). Los derivados de 39A11 39A11/62F9, 39A11/56H7, 39A11/57G8, 39A11/57H3 y 39A11/56A9 tienen la misma secuencia de cadena pesada que el 39A11, pero una secuencia de cadena ligera diferente a la del 39A11.

[0078] Las Figs. 16A, 16B, 16C, 16D, 16E y 16F ilustran la unión de los anticuerpos 3F2/50A10 (anticuerpo de unión al dominio IgV de hB7-H4), 39A11/57G8 (anticuerpo de unión al dominio IgV de h/mB7-H4) y 9D11/68F5 (anticuerpo de unión al dominio IgC de h/mB7-H4) a B7-H4 soluble. Se realizaron experimentos ELISA para determinar la unión a hB7-H4-Fc (Fig. 16A), mB7-H4-Fc (Fig. 16B), dominio IgV de hB7-H4 (Fig. 16C), dominio IgV de mB7-H4 (Fig. 16D), dominio IgC de hB7-H4 (Fig. 16E) y dominio IgC de mB7-H4 (Fig. 16F). Los anticuerpos que se unen a IgV o IgC, respectivamente, se utilizaron como controles.

[0079] Las Figs. 17A, 17B y 17C ilustran la unión de los anticuerpos 3F2/50A10 (anticuerpo de unión al dominio IgV de hB7-H4), 39A11/57G8 (anticuerpo de unión al dominio IgV de h/mB7-H4) y 9D11/68F5 (anticuerpo de unión al dominio IgC de h/mB7-H4) al B7-H4 unido a las células. Se realizaron experimentos de citometría de flujo para determinar la unión a las células SK-BR-3 que expresan hB7-H4 (Fig. 17A), a las células CT26 que expresan mB7-H4 (Fig. 17B) y a las células MDA-MB-468 que expresan hB7-H4 (Fig. 17C).

[0080] Las Figs. 18A y 18B ilustran la internalización de los anticuerpos anti-B7-H4 anticuerpos 3F2/50A10 (anticuerpo de unión al dominio IgV del hB7-H4), 39A11/57G8 (anticuerpo de unión al dominio IgV del h/mB7-H4), y 9D11/68F5 (anticuerpo de unión al dominio IgC del h/mB7-H4) después de unirse a su hB7-H4. Los anticuerpos se mezclaron con un reactivo de etiquetado de anticuerpos (es decir, un fragmento Fab dirigido a la región Fc conjugado con una sonda fluorescente sensible al pH). Se observa una señal fluorogénica a medida que el complejo Fab-Ab es internalizado y procesado a través de los lisosomas y endosomas ácidos (pH 4.5-5.5). La internalización se muestra para las células SK-BR-3 que expresan hB7-H4 (Fig. 18A) y las células MDA-MB-468 que expresan hB7-H4 (Fig. 18B). Se utilizaron como controles los anticuerpos de unión IgV o IgC, respectivamente.

[0081] Las Figs. 19A y 19B ilustran la restauración de la función de secreción de citoquinas de las células T (en este caso la secreción de IFN γ) mediante los anticuerpos 3F2/50A10 (anticuerpo de unión al dominio IgV hB7-H4), 39A11/57G8 (anticuerpo de unión al dominio IgV h/mB7-H4) (Fig. 19A) y 9D11/68F5 (anticuerpo de unión al dominio IgC h/mB7-H4) (Fig. 19B). Los anticuerpos de unión a IgV o IgC, respectivamente, se utilizaron como controles. También se incluyó un anticuerpo de control irrelevante.

[0082] Las Figs. 20A y 20B ilustran que los anticuerpos 3F2/50A10 (anticuerpo de unión al dominio IgV de hB7-H4), 39A11/57G8 (anticuerpo de unión al dominio IgV de h/mB7-H4) y 9D11/68F5 (anticuerpo de unión al dominio IgC de h/mB7-H4) inducen citotoxicidad mediada por células dependientes de anticuerpos (ADCC) en células tumorales. Se muestra la eliminación de células tumorales en las células SK-BR-3 que expresan hB7-H4 (Fig. 20A) y en las células MDA-MB-468 que expresan hB7-H4 (Fig. 20B).

[0083] Las Figs. 21A y 21B ilustran que los anticuerpos de unión al dominio IgV 3F2/50A10 y 39A11/57G8 eliminan células tumorales en un ensayo de eliminación de células inmunitarias IncuCyte®. Para analizar la ADCC se preparó un modelo de co-cultivo SKBR3/hPBMC, en donde se mezclaron células cancerosas SK-BR-3 con hPBMC en una proporción de 1:5 (Fig. 21A) o 1:10 (Fig. 21B), respectivamente. DP47 sirvió como anticuerpo de control.

[0084] Las Figs. 22A, 22B, 22C, 22D, 22E y 22F ilustran la unión de los anticuerpos 39A11/57G8 y un anticuerpo de control positivo (anticuerpo de unión a IgV), así como la unión de las proteínas de fusión que comprenden el anticuerpo 39A11/57G8 (es decir, la proteína de fusión 57G8/IL15) o el anticuerpo de control positivo (es decir, la proteína de fusión Ab1/IL15(+)), respectivamente a B7-H4. Se realizaron experimentos ELISA para determinar la unión a hB7-H4-Fc (Fig. 22A), hB7-H4-his (Fig. 22B), dominio IgV de hB7-H4 (Fig. 22C), mB7-H4-Fc (Fig. 22D), mB7-H4-his (Fig. 22E), dominio IgV de mB7-H4 (Fig. 22F).

[0085] Las Figs. 23A, 23B, 23C, 23D, 23E y 23F ilustran la unión de los anticuerpos 3F2/50A10 y un anticuerpo de control positivo (anticuerpo de unión a IgV), así como la unión de las proteínas de fusión que comprenden el anticuerpo 3F2/50A10 (es decir, la proteína de fusión 50A10/IL15) o el anticuerpo de control positivo (es decir, la proteína de fusión Ab1/IL15(+)), respectivamente a B7-H4. Se realizaron experimentos ELISA para determinar la unión a hB7-H4-Fc (Fig. 23A), hB7-H4-his (Fig. 23B), dominio IgV de hB7-

H4 (Fig. 23C), mB7-H4-Fc (Fig. 23D), mB7-H4-his (Fig. 23E), dominio IgV de mB7-H4 (Fig. 23F).

[0086] Las Figs. 24A, 24B, 24C y 24D, ilustran la unión de los anticuerpos 3F2/50A10, 39A11/57G8 y un anticuerpo de control positivo (que se une al dominio IgV B7-H5), así como la unión de las proteínas de fusión que comprenden el anticuerpo 3F2/50A10 (*es decir*, proteína de fusión 50A10/IL15), el anticuerpo 39A11/57G8 (*es decir*, la proteína de fusión 57G8/IL15), o el anticuerpo de control positivo (*es decir*, la proteína de fusión Ab1/IL15(+)) a B7-H4 celular. Se realizaron experimentos de citometría de flujo para determinar la unión a las células SK-BR-3 que expresan hB7-H4 (Fig. 24A y Fig. 24B) o a las células CT26 que expresan mB7-H4 (Fig. 24C y Fig. 24D).

[0087] Las Figs. 25A, 25B, 25C y 25D ilustran la unión de los anticuerpos 3F2/50A10, 39A11/57G8 y un anticuerpo de control negativo DP47, así como la unión de las proteínas de fusión que comprenden el anticuerpo 3F2/50A10 (*es decir*, la proteína de fusión 50A10/IL15), el anticuerpo 39A11/57G8 (*es decir*, proteína de fusión 57G8/IL15), o el anticuerpo de control negativo (*es decir*, la proteína de fusión DP47/IL15) a B7-H4 celular expresado en células MDA-MB-468 (Figs. 25A y 25B) o MX-1 (Figs. 25C y 25D) según se determina por citometría de flujo.

[0088] Las Figs. 26A y 26B ilustran la eliminación de células tumorales por los anticuerpos 3F2/50A10, 39A11/57G8, y el anticuerpo de control negativo DP47, así como la eliminación de células tumorales por proteínas de fusión que comprenden el anticuerpo 3F2/50A10 (*es decir*, la proteína de fusión 50A10/IL15), el anticuerpo 39A11/57G8 (*es decir*, la proteína de fusión 57G8/IL15), o el anticuerpo de control negativo (*es decir*, la proteína de fusión DP47/IL15) que utiliza un ensayo de eliminación de células inmunitarias IncuCyte®. Se muestra la eliminación de células SD-BR-3 para 3F2/50A10 y la proteína de fusión 50A10/IL15 (Fig. 26A) y para 39A11/57G8 y la proteína de fusión 57G8/IL15 (Fig. 26B). Se muestra la eliminación de las células MDA-MB-468 para 3F2/50A10 y la proteína de fusión 50A10/IL15 (Fig. 26C). La Fig. 26D muestra los valores del punto final para las curvas mostradas en la Fig. 26C. La Fig. 26E muestra la apoptosis de las células MDA-MB-468 tras el tratamiento con 50A10/IL-15, 57G8/IL-15, 57G8 y 50A1.

[0089] Las Figs. 27A, 27B y 27C ilustran el efecto de los anticuerpos 39A11/57G8 y 3F2/50A10 así como de las proteínas de fusión 57G8/IL15 y 50A10/IL15 sobre la proliferación de hPBMC (Fig. 27A) y específicamente de las células T CD8+ (Fig. 27B) y de

las células T CD4+ (**Figs. 27C**). El anticuerpo DP47 y una proteína de fusión de IL-15 que comprende DP47 se utilizaron como controles.

[0090] Las **Figs. 28A y 28B** ilustran la capacidad de los anticuerpos 39A11/57G8 y 3F2/50A10 así como de las proteínas de fusión 57G8/IL15 y 50A10/IL115 para activar la vía de señalización p-STAT5 a través de los receptores de IL-2. La **Fig. 28A** ilustra la vía de señalización de STAT5. **La Fig. 28B muestra la** activación de la vía por los anticuerpos y proteínas de fusión indicados. El anticuerpo DP47 y una proteína de fusión de IL-15 que comprende DP47 se utilizaron como controles.

[0091] Las **Figs. 29A y 29B** ilustran que los anticuerpos 39A11/57G8 y 3F2/50A10 así como las proteínas de fusión 57G8/IL15 y 50A10/IL15 inducen citotoxicidad mediada por células dependientes de anticuerpos (ADCC) en células tumorales. Se muestra la eliminación de células tumorales en las células SK-BR-3 que expresan hB7-H4 (**Fig. 29A**) y en las células MDA-MB-468 que expresan hB7-H4 (**Fig. 29B**).

[0092] Las **Figs. 30A, 30B, 30C y 30D**, ilustran la unión de las proteínas de fusión 57G8/IL-15, 57G8/IL-15_LS, 50A10/IL-15 y 50A10/IL-15_LS a B7-H4 soluble. La mutación "LS" (M428L/N434S) en la región constante de un anticuerpo aumenta la afinidad por el FcRn y disminuye la tasa K_{off} a pH 6, lo que conduce a una prolongación de la vida media en suero. Se realizaron experimentos ELISA para determinar la unión a hB7-H4-Fc (**Fig. 30A**), mB7-H4-Fc (**Fig. 30B**), hB7-H4his (**Fig. 30C**) y mB7-H4his (**Fig. 30D**). Como control se utilizó una proteína de fusión de IL-15 con DP47.

[0093] Las **Figs. 31A y 31B** ilustran la unión de las proteínas de fusión 57G8/IL-15, 57G8/IL-15_LS, 50A10/IL-15 y 50A10/IL-15_LS al B7-H4 unido a las células. Se realizaron experimentos de citometría de flujo para determinar la unión a las células SK-BR-3 que expresan hB7-H4 (**Fig. 31A**) y a las células CT26 que expresan mB7-H4 (**Fig. 31B**). Se utilizó como control una proteína de fusión de IL-15 que incluía DP47.

[0094] La **Fig. 32** ilustra la capacidad de las proteínas de fusión 57G8/IL-15, 57G8/IL-15_LS, 50A10/IL-15 y 50A10/IL-15_LS para inducir la proliferación de las células M07e dependientes de IL-2. Se utilizó como control una proteína de fusión de IL-15 con DP47.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

[0095] **Proteínas de fusión**

[0096] B7-H4 (también conocido como inhibidor de la activación de las células T con dominio V, también conocido como homólogo B7 4, B7h.5, proteína coestimuladora inmunitaria B7-H4, proteína B7S1 o molécula coestimuladora de células T B7x) es una molécula reguladora inmunitaria que comparte homología con otros miembros de la familia B7, incluida la PD-L1. B7-H4 es una proteína transmembrana de tipo I compuesta por ectodominios tanto IgV como IgC. Mientras que la expresión de B7-H4 en los tejidos sanos es relativamente limitada a nivel proteico, B7-H4 se expresa en varios tumores sólidos. La expresión de B7-H4 en los tumores tiende a correlacionarse con un mal pronóstico. B7-H4 tiene una estructura única que comprende un dominio IgC altamente glicosilado y una cola citoplasmática muy corta (**Fig. 1A**).

[0097] En un aspecto, la descripción proporciona proteínas de fusión que comprenden un anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, que se une a B7-H4. Esta porción de la proteína de fusión puede ser cualquier anticuerpo, o fragmento de anticuerpo del mismo, que se une específicamente a B7-H4, incluyendo aquellos que comprenden las correspondientes regiones variables de cadena pesada y ligera o CDR de los anticuerpos proporcionados en **las Tablas 1, 5, 7, 9 y 16-20**, o descritos de otra manera en la presente memoria.

[0098] En la presente memoria se describen proteínas de fusión que comprenden un dominio estimulador. Tal como se utiliza en la presente memoria, un "dominio estimulador" es un dominio que promueve una respuesta inmunitaria. El dominio estimulador puede estimular una respuesta inmunitaria mediada, por ejemplo, por la inducción de la actividad y/o proliferación de células T o NK. En algunas realizaciones, el dominio estimulador estimula las células que responden a una interleucina o a un interferón, como, por ejemplo, IL-2, IL-7, IL-15 e IL-21. En una realización, el dominio estimulador se une y estimula un receptor que responde a una interleucina o un interferón, como, sin limitación, IL-2, IL-7, IL-13, IL-15 e IL-21. El dominio estimulador también puede ser un dominio híbrido que es un heterocomplejo de dos o más ligandos unidos covalentemente entre sí.

[0099] En las realizaciones, el dominio estimulador incluye una secuencia o dominio que promueve la estimulación de IL-15 del receptor de IL-15 (IL-15R).

[00100] En una realización, el dominio estimulador que promueve la estimulación de IL-15R comprende IL-15 o un derivado de IL-15.

[00101] En una realización, el dominio estimulador que promueve la estimulación de IL-15R comprende un polipéptido de IL-15R α que comprende el dominio sushi de IL-15R α o un

derivado del mismo. En una realización, el dominio estimulador comprende el dominio sushi de la cadena IL-15R α .

[00102] En una realización, el dominio estimulador comprende la IL-15 o un derivado de la misma, cuya unión puede ser potenciada por la presencia de un polipéptido IL-15R α que comprende el dominio sushi de la IL-15R α o un derivado de la misma. En una realización, el dominio estimulador comprende un complejo de IL-15 o un derivado del mismo y un polipéptido de IL-15R α que comprende el dominio sushi de IL-15R α o un derivado del mismo. En una realización, el dominio estimulador comprende una IL-15 o un derivado de la misma y un polipéptido de IL-15R α que comprende el dominio sushi de IL-15R α o un derivado de la misma, en donde los dos polipéptidos están unidos covalentemente por un enlazador.

[00103] En una realización, la IL-15 o el derivado de la misma se localiza en el terminal N del polipéptido IL-15R α que comprende el dominio sushi de la IL-15R α o el derivado de la misma. En una realización, la IL-15 o un derivado de la misma se localiza en el terminal C del polipéptido IL-15R α que comprende el dominio sushi de la IL-15R α o un derivado de la misma. En una realización, el dominio estimulador comprende la secuencia SEQ ID NO:169.

[00104] En la presente memoria se proporciona una proteína de fusión que comprende (1) un dominio de unión anti-B7-H4 que bloquea la unión de B7-H4 a su ligando e inhibe la inmunosupresión, y (2) un dominio estimulador que promueve una respuesta inmunitaria, en donde las proteínas de fusión pueden proporcionar una mayor actividad de las células inmunitarias, en comparación con dos moléculas distintas que proporcionan las funciones antes mencionadas por separado. Específicamente, los experimentos descritos en la presente memoria demuestran que las proteínas de fusión que contienen tanto un dominio de unión a B7-H4 que bloquea la unión de B7-H4 a su ligando, como un dominio estimulador IL-15 o un derivado del mismo y un polipéptido IL-15R α que comprende el dominio sushi de IL-15R α o un derivado del mismo, eliminaron células tumorales, indujeron la proliferación de células T y activaron la vía STAT5 secuencia abajo de IL-2R $\beta\gamma$.

[00105] Las proteínas de fusión proporcionadas en la presente memoria pueden exhibir (a) unión a B7-H4 y bloqueo de eventos de señalización secuencia abajo; (b) bloqueo de la unión de B7-H4 a su ligando afín; (c) aumento de la proliferación de células T; (d) aumento de la respuesta inmunitaria mediada por células T; (e) estimulación de la secreción de citoquinas; (f) reducción de la transducción de señales inhibitorias a través de B7-H4; y/o (g) eliminación de células tumorales. Las proteínas de fusión descritas en la presente memoria presentan

potentes actividades de unión e inhibición y son útiles para usos terapéuticos y de diagnóstico.

[00106] En ciertas realizaciones, la proteína de fusión comprende un dominio estimulador descrito en la presente memoria que está unido covalentemente a un anticuerpo anti-B7-H4, o fragmento de unión a antígeno del mismo, descrito en la presente memoria a través de un enlazador flexible. En algunas realizaciones, se proporciona aquí una proteína de fusión en donde el dominio estimulador descrito en la presente memoria se fusiona directamente con un anticuerpo anti-B7-H4, o fragmento de unión a antígeno del mismo, descrito en la presente memoria.

[00107] Tal y como se utiliza en la presente memoria, "unido covalentemente" o "fusionado" se refiere a la asociación de dos o más polipéptidos a través de un enlace covalente. En algunas realizaciones, dos polipéptidos unidos covalentemente se fusionan entre sí directamente, es decir, sin ninguna secuencia polipeptídica adicional entre el primer y el segundo péptido. Por consiguiente, en algunas realizaciones, el terminal N del primer polipéptido se fusiona directamente con el terminal C del segundo polipéptido o viceversa. En otras realizaciones, los dos polipéptidos unidos covalentemente forman parte de una cadena polipeptídica continua, pero no están directamente fusionados entre sí (es decir, los dos polipéptidos pueden estar separados por uno o más aminoácidos, un enlazador u otro polipéptido). El término "unido covalentemente" no implica una orientación específica de los dos o más polipéptidos fusionados entre sí.

[00108] La IL-15 es una citoquina de 14-15 kDa con una similitud estructural con la IL-2. La IL-15 también se conoce como MGC9721. Diversos tipos de células producen de forma constitutiva el ARNm de la IL-15, entre las que se encuentran los monocitos, los macrófagos, las CD, los queratinocitos, las células epidérmicas de la piel, los fibroblastos, diversas células epiteliales, las células estromales de la médula ósea y las neuronas. Además, el ARNm de la IL-15 también se produce en los tejidos del riñón, la placenta, el pulmón, el corazón, el músculo esquelético y el cerebro. Sin embargo, sólo los monocitos, las CD, las células epiteliales, las células estromales de la médula ósea, los fibroblastos y muy pocas otras células y tejidos secretan niveles detectables de IL-15. Se ha descubierto que la IL-15 y la IL-2 se unen a las mismas subunidades de hematopoyetina y comparten muchas actividades biológicas. La IL-15 regula la activación y proliferación de las células T y NK, y el número de células de memoria CD8⁺ se ve afectado por un equilibrio entre la IL-15 y la IL-2. En las realizaciones, la IL-15 o el derivado de la IL-15 descrito en la presente memoria tiene al

menos un 10 %, al menos un 20 %, al menos un 30 %, al menos un 40 %, al menos un 50 %, al menos un 60 %, al menos un 70 %, al menos un 80 % o al menos un 90 % de la actividad de la IL-15 humana. La IL-15 puede ser una IL-15 de mamífero, preferiblemente una IL-15 de primate, y más preferiblemente una IL-15 humana. La secuencia de aminoácidos de la IL-15 humana se proporciona como SEQ ID NO:164 (proteína de longitud completa) y SEQ ID NO:165 (proteína madura).

[00109] El término "derivado de la IL-15" se refiere a un polipéptido que tiene al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 % o al menos un 99 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:164 (forma madura de la IL-15 humana) o con la SEQ ID NO:165 (forma madura de la IL-15 humana con la mutación N65S). Las técnicas para hacer tales derivados son conocidas en la técnica. En algunas realizaciones, la secuencia de IL-15 o del derivado de IL-15 puede comprender una o más sustituciones de aminoácidos. En algunas realizaciones, la proteína de fusión descrita en la presente memoria comprende un polipéptido de IL-15 que comprende N65S. En las realizaciones, la proteína de fusión descrita en la presente memoria comprende un polipéptido de IL-15 que comprende SEQ ID NO:165.

[00110] El receptor de la IL-15, es decir, el complejo del receptor de la IL-15, se une específicamente a la IL-15 con gran afinidad y está formado por una subunidad α única del receptor de la interleucina 15, la IL-2/IL-15R β , y la subunidad común de la cadena γ /IL-2R γ . La IL-15R α se expresa en macrófagos activados por mitógenos, células NK y células T CD4⁺ y CD8⁺. La IL-15R α humana consta de siete exones, y el empalme alternativo del ARNm puede dar lugar a ocho isoformas moleculares de IL-15R α con diferentes dominios extra o intracelulares. Las isoformas de longitud completa constan de una porción extracelular que contiene un motivo conservado de unión a proteínas (dominio sushi), un dominio transmembrana y una cola intracelular. Como se emplea en la presente memoria, el término "dominio sushi" de la IL-15R α se refiere a un dominio que comienza en el primer residuo de cisteína (C1) después del péptido señal de la IL-15R α y termina en el cuarto residuo de cisteína (C4) después de dicho péptido señal. El dominio sushi correspondiente a una porción de la región extracelular de la IL-15R α participa en la unión a la IL-15. El dominio sushi de la presente descripción tiene al menos el 10 %, al menos el 20 %, al menos el 30 %, al menos el 40 %, al menos el 50 %, al menos el 60 %, al menos el 70 %, al menos el 80 % o al menos el 90 % de la actividad del dominio sushi de la cadena IL-15R α humana. La secuencia de aminoácidos del dominio sushi de la IL-15R α humana se proporciona en la SEQ ID NO:167.

[00111] El término "derivado del dominio sushi de la IL-15R α " o "variante del dominio sushi de la IL-15R α " se refiere a un polipéptido que tiene al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 %, o al menos un 99 % de identidad de secuencia con la secuencia del dominio sushi de la IL-15R α humana (SEQ ID NO:167). Las técnicas para hacer tales derivados o variantes son conocidas en la técnica. Todos estos derivados comprenden los cuatro residuos de cisteína del dominio sushi de la IL-15R α . En algunos de estos derivados, los aminoácidos naturales pueden ser sustituidos por aminoácidos modificados químicamente para alterar la vida media del polipéptido. En algunas realizaciones, la secuencia del dominio sushi de la IL-15R α o del derivado del dominio sushi de la IL-15R α puede comprender una o más sustituciones de aminoácidos.

[00112] La IL-15 se une con gran afinidad a la IL-15R α , que luego se asocia con un complejo IL-15R β / γ c expresado por la misma célula diana (presentación cis). También se sabe que la IL-15R α trans-presenta la IL-15 con alta afinidad a una célula diana diferente que expresa el complejo IL-15R β / γ (c) (trans-presentación). Los mecanismos de cis- y trans-presentación de la IL-15 conducen a diferentes dinámicas de activación del receptor y de transducción de la señal, siendo la cis-presentación la que induce respuestas rápidas y transitorias, y la trans-presentación la que induce respuestas más lentas y persistentes.

[00113] En algunas realizaciones, las proteínas de fusión descritas en la presente memoria comprenden un dominio estimulador, que comprende un dominio híbrido que comprende el dominio sushi de la cadena IL-15R α unido a la IL-15 por un enlazador. En ciertas realizaciones, el dominio estimulador descrito en la presente memoria está unido covalentemente a un anticuerpo anti-B7-H4, o a un fragmento de unión a antígeno del mismo, descrito en la presente memoria a través de un segundo enlazador. En otras realizaciones, el dominio estimulador aquí ejemplificado está directamente fusionado a un anticuerpo anti-B7-H4 o a un fragmento de unión a antígeno descrito en la presente memoria.

[00114] En una realización, se proporciona una "proteína de fusión terminal C", en donde un dominio estimulador está vinculado directamente o a través de un enlazador (por ejemplo, a través de uno o más péptidos) al terminal C de una porción de unión anti-B7-H4 de la proteína de fusión (por ejemplo, el terminal C de una cadena pesada de un anticuerpo anti-B7-H4 descrito en la presente memoria).

[00115] Las proteínas de fusión terminal C incluyen, pero no se limitan a las siguientes proteínas de fusión (ejemplares) (los componentes mencionados desde el terminal N hasta el

terminal C, "-" indica la unión covalente directa o la unión a través de un enlazador (por ejemplo, a través de uno o más péptidos):

- (a) (cadena pesada del anticuerpo anti-B7-H4 o fragmento de unión a antígeno del mismo) - (IL-15 o derivado del mismo)
- (b) (cadena pesada del anticuerpo anti-B7-H4 o fragmento de unión a antígeno del mismo) - (un polipéptido de IL-15R α que comprenda el dominio sushi de IL-15R α o un derivado del mismo); y
- (c) (cadena pesada del anticuerpo anti-B7-H4 o fragmento de unión a antígeno del mismo) - (polipéptido IL-15R α que comprende el dominio sushi de IL-15R α o un derivado del mismo) - (IL-15 o derivado del mismo)

[00116] Las proteínas de fusión terminal C pueden comprender más de un dominio estimulador.

[00117] En una realización, se proporciona una proteína de fusión, en donde el dominio estimulador está unido covalentemente al terminal C de una (y sólo una) de las cadenas pesadas del anticuerpo anti-B7-H4 o fragmento de unión a antígeno del mismo.

[00118] En la presente memoria se proporciona una proteína de fusión que comprende (1) un dominio estimulador, (2) una primera cadena pesada de un anticuerpo anti-B7-H4 o un fragmento de unión a antígeno del mismo, en donde el dominio estimulador está unido covalentemente al terminal C de la primera cadena pesada, y (3) una segunda cadena pesada de un anticuerpo anti-B7-H4 o un fragmento de unión a antígeno del mismo, en donde la segunda cadena pesada no está unida a un dominio estimulador. En algunas realizaciones, el dominio estimulador comprende (i) IL-15 o un derivado del mismo, o (ii) un polipéptido IL-15R α que comprende el dominio sushi de IL-15R α o un derivado del mismo, o (iii) ambos.

[00119] La Fig. 1B representa un diagrama esquemático de un ejemplo no limitante de una proteína de fusión descrita en la presente memoria.

[00120] En un aspecto, se proporciona una proteína de fusión que comprende:

- (a) un anticuerpo anti-B7-H4, o un fragmento de unión a antígeno del mismo,
- (b) un polipéptido de dominio sushi de IL-15R α , y
- (c) un polipéptido de IL-15.

[00121] En un aspecto, se proporciona una proteína de fusión que comprende:

- (a) un anticuerpo anti-B7-H4, o un fragmento de unión a antígeno del mismo,
- (b) un polipéptido del dominio sushi de la IL-15R α ,
- (c) un polipéptido IL-15, y

(d) un enlazador que une el polipéptido del dominio sushi de la IL-15R α y el polipéptido de la IL-15.

[00122] En un aspecto, se proporciona una proteína de fusión que comprende:

- (a) un anticuerpo anti-B7-H4, o un fragmento de unión a antígeno del mismo,
- (b) un enlazador que une el anticuerpo anti-B7-H4, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, y un polipéptido del dominio sushi de IL-15R α ,
- (c) el polipéptido del dominio sushi de la IL-15R α ,
- (d) un enlazador que une el polipéptido de dominio sushi de IL-15R α y un polipéptido de IL-15, y
- (e) el polipéptido IL-15.

[00123] En un aspecto, se proporciona una proteína de fusión que comprende:

- (a) un anticuerpo anti-B7-H4, o un fragmento de unión a antígeno del mismo,
- (b) un polipéptido del dominio sushi de la IL-15R α que comprenda la SEQ ID NO:167, o una secuencia de aminoácidos que al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 %, o al menos un 99 % idéntica a la SEQ ID NO:167; y
- (c) un polipéptido de IL-15 que comprenda la SEQ ID NO:166, o una secuencia de aminoácidos que sea al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, o al menos el 99 % idéntica a la SEQ ID NO:166.

[00124] En un aspecto, se proporciona una proteína de fusión que comprende:

- (a) un anticuerpo anti-B7-H4, o un fragmento de unión a antígeno del mismo,
- (b) un polipéptido del dominio sushi de la IL-15R α que comprenda la SEQ ID NO:167, o una secuencia de aminoácidos que al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 %, o al menos un 99 % idéntica a la SEQ ID NO:167;
- (c) un polipéptido de IL-15 que comprenda la SEQ ID NO:166, o una secuencia de aminoácidos que sea al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, o al menos el 99 % idéntica a la SEQ ID NO:166, y
- (d) un enlazador que une el polipéptido del dominio sushi de la IL-15R α y el polipéptido de la IL-15.

[00125] En una realización, se proporciona una proteína de fusión que comprende de N- a terminal C

- (a) una cadena pesada variable de un anticuerpo anti-B7-H4, o un fragmento de unión a antígeno del mismo,
- (b) una cadena pesada constante,
- (c) un polipéptido del dominio sushi de la IL-15R α que comprenda la SEQ ID NO:167, o una secuencia de aminoácidos que al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 %, o al menos un 99 % idéntica a la SEQ ID NO:167,
- (d) un enlazador que une el polipéptido de dominio sushi de IL-15R α y un polipéptido de IL-15, y
- (e) el polipéptido IL-15, en donde el polipéptido IL-15 comprende la SEQ ID NO:166, o una secuencia de aminoácidos que es al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, o al menos el 99 % idéntica a la SEQ ID NO:166.

[00126] En una realización, se proporciona una proteína de fusión que comprende desde el terminal N hasta el terminal C

- (a) una cadena pesada variable de un anticuerpo anti-B7-H4, o un fragmento de unión a antígeno del mismo,
- (b) una cadena pesada constante,
- (c) un enlazador que une la cadena pesada constante y un polipéptido del dominio sushi de la IL-15R α ,
- (d) el polipéptido de dominio sushi de la IL-15R α , en donde el polipéptido de dominio sushi de la IL-15R α comprende la SEQ ID NO:167, o una secuencia de aminoácidos que al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, o al menos el 99 % es idéntica a la SEQ ID NO:167,
- (e) un enlazador que une el polipéptido de dominio sushi de IL-15R α y un polipéptido de IL-15, y
- (f) el polipéptido IL-15, en donde el polipéptido IL-15 comprende la SEQ ID NO:166, o una secuencia de aminoácidos que es al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, o al menos el 99 % idéntica a la SEQ ID NO:166.

[00127] En una realización, se proporciona una proteína de fusión que comprende

- (a) una primera cadena que comprende desde el terminal N hasta el terminal C:
 - a. una cadena pesada variable de un anticuerpo anti-B7-H4, o un fragmento de unión a antígeno del mismo,
 - b. una cadena pesada constante,
 - c. un polipéptido del dominio sushi de la IL-15R α que comprenda la SEQ ID NO:167, o una secuencia de aminoácidos que al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 %, o al menos un 99 % idéntica a la SEQ ID NO:167,
 - d. un enlazador que une el polipéptido de dominio sushi de IL-15R α y un polipéptido de IL-15, y
 - e. el polipéptido IL-15, en donde el polipéptido IL-15 comprende la SEQ ID NO:166, o una secuencia de aminoácidos que es al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, o al menos el 99 % idéntica a la SEQ ID NO:166; y
- (b) una segunda cadena que comprende desde el terminal N hasta el terminal C :
 - a. una cadena ligera variable de un anticuerpo anti-B7-H4, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, y
 - b. una cadena ligera constante;

opcionalmente, en donde la cadena pesada constante comprende una o varias modificaciones que provocan la heterodimerización.

[00128] En una realización, se proporciona una proteína de fusión que comprende

- (a) una primera cadena que comprende desde el terminal N hasta el terminal C:
 - a. una cadena pesada variable de un anticuerpo anti-B7-H4, o un fragmento de unión a antígeno del mismo,
 - b. una cadena pesada constante,
 - c. un enlazador que une la cadena pesada constante y un polipéptido del dominio sushi de la IL-15R α ,
 - d. el polipéptido de dominio sushi de la IL-15R α , en donde el polipéptido de dominio sushi de la IL-15R α comprende la SEQ ID NO:167, o una secuencia de aminoácidos que al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, o al menos el 99 % idéntica a la SEQ ID NO:167,

- e. un enlazador que une el polipéptido de dominio sushi de IL-15R α y un polipéptido de IL-15, y
 - f. el polipéptido IL-15, en donde el polipéptido IL-15 comprende la SEQ ID NO:166, o una secuencia de aminoácidos que es al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, o al menos el 99 % idéntica a la SEQ ID NO:166, y
- (b) una segunda cadena que comprende desde el terminal N hasta el terminal C:
- a. una cadena ligera variable de un anticuerpo anti-B7-H4, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, y
 - b. una cadena ligera constante;
- opcionalmente, en donde la cadena pesada constante comprende una o varias modificaciones que provocan la heterodimerización.

[00129] En una realización, se proporciona una proteína de fusión que comprende

- (a) una primera cadena pesada que comprende desde el terminal N hasta el terminal C:
- a. una primera cadena pesada variable de un anticuerpo anti-B7-H4, o un fragmento de unión a antígeno del mismo,
 - b. una primera cadena pesada constante,
 - c. un polipéptido del dominio sushi de la IL-15R α que comprenda la SEQ ID NO:167, o una secuencia de aminoácidos que al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 %, o al menos un 99 % idéntica a la SEQ ID NO:167,
 - d. un enlazador que une el polipéptido de dominio sushi de IL-15R α y un polipéptido de IL-15, y
 - e. el polipéptido IL-15, en donde el polipéptido IL-15 comprende la SEQ ID NO:166, o una secuencia de aminoácidos que es al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, o al menos el 99 % idéntica a la SEQ ID NO:166;
- (b) una segunda cadena pesada que comprende desde el terminal N hasta el terminal C:
- a. una segunda cadena pesada variable de un anticuerpo anti-B7-H4, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, y
 - b. una segunda cadena pesada constante; y
- (c) una cadena ligera que comprende desde el terminal N hasta el terminal C:

- a. una cadena ligera variable de un anticuerpo anti-B7-H4, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, y

- b. una cadena ligera constante;

opcionalmente, donde la primera y la segunda cadenas pesadas constantes comprenden una o modificaciones que provocan la heterodimerización.

[00130] En una realización, se proporciona una proteína de fusión que comprende

(a) una primera cadena pesada que comprende desde el terminal N hasta el terminal C:

- a. una primera cadena pesada variable de un anticuerpo anti-B7-H4, o un fragmento de unión a antígeno del mismo,

- b. una primera cadena pesada constante,

- c. un enlazador que une la cadena pesada constante y un polipéptido del dominio sushi de la IL-15R α ,

- d. el polipéptido de dominio sushi de la IL-15R α , en donde el polipéptido de dominio sushi de la IL-15R α comprende la SEQ ID NO:167, o una secuencia de aminoácidos que al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, o al menos el 99 % idéntica a la SEQ ID NO:167,

- e. un enlazador que une el polipéptido de dominio sushi de IL-15R α y un polipéptido de IL-15, y

- f. el polipéptido IL-15, en donde el polipéptido IL-15 comprende la SEQ ID NO:166, o una secuencia de aminoácidos que es al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, o al menos el 99 % idéntica a la SEQ ID NO:166;

(b) una segunda cadena pesada que comprende desde el terminal N hasta el terminal C:

- a. una segunda cadena pesada variable de un anticuerpo anti-B7-H4, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, y

- b. una segunda cadena pesada constante; y

(c) una cadena ligera que comprende desde el terminal N hasta el terminal C:

- a. una cadena ligera variable de un anticuerpo anti-B7-H4, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, y

- b. una cadena ligera constante;

opcionalmente, donde la primera y la segunda cadenas pesadas constantes comprenden una o modificaciones que provocan la heterodimerización.

[00131] En una realización, el polipéptido de dominio sushi de IL-15R α comprende SEQ ID NO:167. En una realización, el polipéptido de dominio sushi de la IL-15R α consiste en SEQ ID NO:167.

[00132] En una realización, el polipéptido de IL-15 comprende SEQ ID NO:166. En una realización, el polipéptido de IL-15 consiste en SEQ ID NO:166.

[00133] En una realización, el enlazador que une el polipéptido del dominio sushi de la IL-15R α y el polipéptido de la IL-15 comprende la SEQ ID NO:168. En una realización, el enlazador que une el polipéptido de dominio sushi de IL-15R α y el polipéptido de IL-15 consiste en SEQ ID NO:168.

[00134] En una realización, la proteína de fusión comprende la SEQ ID NO:169.

[00135] En un aspecto, se proporciona una proteína de fusión que comprende un anticuerpo anti-B7-H4, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, en donde el anticuerpo, o el fragmento de unión a antígeno del mismo, comprende una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera, en donde cada una de las regiones variables de cadena pesada y de cadena ligera comprende una CDR1, CDR2 y CDR3.

[00136] En una realización, la proteína de fusión comprende un anticuerpo anti-B7-H4, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, en donde CDR1H comprende SEQ ID NO:16, CDR2H comprende SEQ ID NO:17, CDR3H comprende SEQ ID NO:18, CDR1L comprende SEQ ID NO:73, CDR2L comprende SEQ ID NO:74, y CDR3L comprende SEQ ID NO:75.

[00137] En la presente memoria se proporciona una proteína de fusión que comprende un anticuerpo anti-B7-H4, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, en donde CDR1H comprende SEQ ID NO:16, CDR2H comprende SEQ ID NO:17, CDR3H comprende SEQ ID NO:18, CDR1L comprende SEQ ID NO:20, CDR2L comprende SEQ ID NO:21, y CDR3L comprende SEQ ID NO:22.

[00138] En la presente memoria se proporciona una proteína de fusión que comprende un anticuerpo anti-B7-H4, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, en donde CDR1H comprende SEQ ID NO:16, CDR2H comprende SEQ ID NO:17, CDR3H comprende SEQ ID NO:18, CDR1L comprende SEQ ID NO:66, CDR2L comprende SEQ ID NO:67, y CDR3L comprende SEQ ID NO:68.

[00139] En la presente memoria se proporciona una proteína de fusión que comprende un anticuerpo anti-B7-H4, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, en donde CDR1H comprende SEQ ID NO:16, CDR2H comprende SEQ ID NO:17, CDR3H comprende SEQ

ID NO:18, CDR1L comprende SEQ ID NO:70, CDR2L comprende SEQ ID NO:71, y CDR3L comprende SEQ ID NO:72.

[00140] En la presente memoria se proporciona una proteína de fusión que comprende un anticuerpo anti-B7-H4, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, en donde CDR1H comprende SEQ ID NO:16, CDR2H comprende SEQ ID NO:17, CDR3H comprende SEQ ID NO:18, CDR1L comprende SEQ ID NO: 84, CDR2L comprende SEQ ID NO:85, y CDR3L comprende SEQ ID NO:86.

[00141] En la presente memoria se proporciona una proteína de fusión que comprende un anticuerpo anti-B7-H4, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, en donde CDR1H comprende SEQ ID NO:16, CDR2H comprende SEQ ID NO:17, CDR3H comprende SEQ ID NO:18, CDR1L comprende SEQ ID NO: 8, CDR2L comprende SEQ ID NO: 9, y CDR3L comprende SEQ ID NO:10.

[00142] En la presente memoria se proporciona una proteína de fusión que comprende un anticuerpo anti-B7-H4, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, en donde CDR1H comprende SEQ ID NO:16, CDR2H comprende SEQ ID NO:17, CDR3H comprende SEQ ID NO:18, CDR1L comprende SEQ ID NO: 77, CDR2L comprende SEQ ID NO: 78, y CDR3L comprende SEQ ID NO: 79.

[00143] En la presente memoria se proporciona una proteína de fusión que comprende un anticuerpo anti-B7-H4, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, en donde CDR1H comprende SEQ ID NO:16, CDR2H comprende SEQ ID NO:17, CDR3H comprende SEQ ID NO:18, CDR1L comprende SEQ ID NO: 81, CDR2L comprende SEQ ID NO:82, y CDR3L comprende SEQ ID NO:83.

[00144] En la presente memoria se proporciona una proteína de fusión que comprende un anticuerpo anti-B7-H4, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, en donde la región variable de la cadena pesada comprende SEQ ID NO: 15, o una secuencia que es al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, o al menos 99 % idéntica a SEQ ID NO: 15; y donde la región variable de la cadena ligera comprende SEQ ID NO: x, o una secuencia que es al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, o al menos 99 % idéntica a SEQ ID NO: 19.

[00145] En la presente memoria se proporciona una proteína de fusión que comprende un anticuerpo anti-B7-H4, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, en donde la región variable de la cadena pesada comprende SEQ ID NO: 15, o una secuencia que es al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, o al menos 99 %

idéntica a SEQ ID NO: 15; y en donde la región variable de la cadena ligera comprende SEQ ID NO: 65, o una secuencia que es al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, o al menos 99 % idéntica a SEQ ID NO: 65.

[00146] En la presente memoria se proporciona una proteína de fusión que comprende un anticuerpo anti-B7-H4, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, en donde la región variable de la cadena pesada comprende SEQ ID NO: 15, o una secuencia que es al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, o al menos 99 % idéntica a SEQ ID NO: 15; y en donde la región variable de la cadena ligera comprende SEQ ID NO: 69, o una secuencia que es al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, o al menos 99 % idéntica a SEQ ID NO: 69.

[00147] En la presente memoria se proporciona una proteína de fusión que comprende un anticuerpo anti-B7-H4, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, en donde la región variable de la cadena pesada comprende SEQ ID NO: 3, o una secuencia que es al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, o al menos 99 % idéntica a SEQ ID NO: 3 y donde la región variable de la cadena ligera comprende la SEQ ID NO: 7, o una secuencia que es al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, o al menos 99 % idéntica a la SEQ ID NO: 7.

[00148] En la presente memoria se proporciona una proteína de fusión que comprende un anticuerpo anti-B7-H4, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, en donde la región variable de la cadena pesada comprende SEQ ID NO: 3, o una secuencia que es al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, o al menos 99 % idéntica a SEQ ID NO: 3 y donde la región variable de la cadena ligera comprende la SEQ ID NO: 76, o una secuencia que es al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, o al menos 99 % idéntica a la SEQ ID NO: 76.

[00149] En la presente memoria se proporciona una proteína de fusión que comprende un anticuerpo anti-B7-H4, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, en donde la región variable de la cadena pesada comprende SEQ ID NO: 3, o una secuencia que es al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, o al menos 99 % idéntica a SEQ ID NO: 3 y donde la región variable de la cadena ligera comprende la SEQ ID NO: 80, o una secuencia que es al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, o al menos 99 % idéntica a la SEQ ID NO: 80.

[00150] En la presente memoria se proporciona una proteína de fusión que comprende un anticuerpo anti-B7-H4, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, en donde la región

variable de la cadena pesada comprende la SEQ ID NO: 15 y en donde la región variable de la cadena ligera comprende la SEQ ID NO: 19.

[00151] En la presente memoria se proporciona una proteína de fusión que comprende un anticuerpo anti-B7-H4, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, en donde la región variable de la cadena pesada comprende la SEQ ID NO: 15 y en donde la región variable de la cadena ligera comprende la SEQ ID NO: 65.

[00152] En la presente memoria se proporciona una proteína de fusión que comprende un anticuerpo anti-B7-H4, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, en donde la región variable de la cadena pesada comprende la SEQ ID NO: 15 y en donde la región variable de la cadena ligera comprende la SEQ ID NO: 69.

[00153] En la presente memoria se proporciona una proteína de fusión que comprende un anticuerpo anti-B7-H4, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, en donde la región variable de la cadena pesada comprende la SEQ ID NO: 3 y en donde la región variable de la cadena ligera comprende la SEQ ID NO: 7.

[00154] En la presente memoria se proporciona una proteína de fusión que comprende un anticuerpo anti-B7-H4, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, en donde la región variable de la cadena pesada comprende la SEQ ID NO: 3 y en donde la región variable de la cadena ligera comprende la SEQ ID NO: 76.

[00155] En la presente memoria se proporciona una proteína de fusión que comprende un anticuerpo anti-B7-H4, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, en donde la región variable de la cadena pesada comprende la SEQ ID NO: 3 y en donde la región variable de la cadena ligera comprende la SEQ ID NO: 80.

[00156] En un aspecto, se proporciona un anticuerpo anti-B7-H4, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, en donde el anticuerpo, o el fragmento de unión a antígeno del mismo, comprende una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera, en donde cada una de las regiones variables de cadena pesada y de cadena ligera comprende una CDR1, CDR2 y CDR3.

[00157] En la presente memoria se proporciona una proteína de fusión que comprende un anticuerpo anti-B7-H4, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, en donde la CDR1H comprende la SEQ ID NO:46, la CDR2H comprende la SEQ ID NO:47, la CDR3H comprende la SEQ ID NO:48, la CDR1L comprende la SEQ ID NO:111, la CDR2L comprende la SEQ ID NO:112, y la CDR3L comprende la SEQ ID NO:113.

[00158] En la presente memoria se proporciona una proteína de fusión que comprende un anticuerpo anti-B7-H4, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, en donde la CDR1H comprende la SEQ ID NO:46, la CDR2H comprende la SEQ ID NO:47, la CDR3H comprende la SEQ ID NO:48, la CDR1L comprende la SEQ ID NO:50, la CDR2L comprende la SEQ ID NO:51, y la CDR3L comprende la SEQ ID NO:52.

[00159] En la presente memoria se proporciona una proteína de fusión que comprende un anticuerpo anti-B7-H4, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, en donde la CDR1H comprende la SEQ ID NO:46, la CDR2H comprende la SEQ ID NO:47, la CDR3H comprende la SEQ ID NO:48, la CDR1L comprende la SEQ ID NO:88, la CDR2L comprende la SEQ ID NO:89, y la CDR3L comprende la SEQ ID NO:90.

[00160] En la presente memoria se proporciona una proteína de fusión que comprende un anticuerpo anti-B7-H4, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, en donde la CDR1H comprende la SEQ ID NO:46, la CDR2H comprende la SEQ ID NO:47, la CDR3H comprende la SEQ ID NO:48, la CDR1L comprende la SEQ ID NO:92, la CDR2L comprende la SEQ ID NO:93, y la CDR3L comprende la SEQ ID NO:94.

[00161] En la presente memoria se proporciona una proteína de fusión que comprende un anticuerpo anti-B7-H4, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, en donde la CDR1H comprende la SEQ ID NO:46, la CDR2H comprende la SEQ ID NO:47, la CDR3H comprende la SEQ ID NO:48, la CDR1L comprende la SEQ ID NO:96, la CDR2L comprende la SEQ ID NO:97, y la CDR3L comprende la SEQ ID NO:98.

[00162] En la presente memoria se proporciona una proteína de fusión que comprende un anticuerpo anti-B7-H4, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, en donde la CDR1H comprende la SEQ ID NO:46, la CDR2H comprende la SEQ ID NO:47, la CDR3H comprende la SEQ ID NO:48, la CDR1L comprende la SEQ ID NO:100, la CDR2L comprende la SEQ ID NO:101, y la CDR3L comprende la SEQ ID NO:102.

[00163] En la presente memoria se proporciona una proteína de fusión que comprende un anticuerpo anti-B7-H4, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, en donde la CDR1H comprende la SEQ ID NO:46, la CDR2H comprende la SEQ ID NO:47, la CDR3H comprende la SEQ ID NO:48, la CDR1L comprende la SEQ ID NO:104, la CDR2L comprende la SEQ ID NO:105, y la CDR3L comprende la SEQ ID NO:106.

[00164] En la presente memoria se proporciona una proteína de fusión que comprende un anticuerpo anti-B7-H4, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, en donde la CDR1H comprende la SEQ ID NO:46, la CDR2H comprende la SEQ ID NO:47, la CDR3H

comprende la SEQ ID NO:48, la CDR1L comprende la SEQ ID NO:108, la CDR2L comprende la SEQ ID NO:109, y la CDR3L comprende la SEQ ID NO:110.

[00165] En la presente memoria se proporciona una proteína de fusión que comprende un anticuerpo anti-B7-H4, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, en donde la región variable de la cadena pesada comprende SEQ ID NO:45, o una secuencia que es al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, o al menos 99 % idéntica a SEQ ID NO:45 y en donde la región variable de la cadena ligera comprende SEQ ID NO:49, o una secuencia que es al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, o al menos 99 % idéntica a SEQ ID NO:49.

[00166] En la presente memoria se proporciona una proteína de fusión que comprende un anticuerpo anti-B7-H4, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, en donde la región variable de la cadena pesada comprende SEQ ID NO:45, o una secuencia que es al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, o al menos 99 % idéntica a SEQ ID NO:45 y donde la región variable de la cadena ligera comprende SEQ ID NO:87, o una secuencia que es al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, o al menos 99 % idéntica a SEQ ID NO:87.

[00167] En la presente memoria se proporciona una proteína de fusión que comprende un anticuerpo anti-B7-H4, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, en donde la región variable de la cadena pesada comprende SEQ ID NO:45, o una secuencia que es al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, o al menos 99 % idéntica a SEQ ID NO:45 y donde la región variable de la cadena ligera comprende SEQ ID NO:91, o una secuencia que es al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, o al menos 99 % idéntica a SEQ ID NO:91.

[00168] En la presente memoria se proporciona una proteína de fusión que comprende un anticuerpo anti-B7-H4, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, en donde la región variable de la cadena pesada comprende SEQ ID NO:45, o una secuencia que es al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, o al menos 99 % idéntica a SEQ ID NO:45 y donde la región variable de la cadena ligera comprende SEQ ID NO:95, o una secuencia que es al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, o al menos 99 % idéntica a SEQ ID NO:95.

[00169] En la presente memoria se proporciona una proteína de fusión que comprende un anticuerpo anti-B7-H4, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, en donde la región variable de la cadena pesada comprende SEQ ID NO:45, o una secuencia que es al menos

90 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, o al menos 99 % idéntica a SEQ ID NO:45 y donde la región variable de la cadena ligera comprende SEQ ID NO:99, o una secuencia que es al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, o al menos 99 % idéntica a SEQ ID NO:99.

[00170] En la presente memoria se proporciona una proteína de fusión que comprende un anticuerpo anti-B7-H4, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, en donde la región variable de la cadena pesada comprende SEQ ID NO:45, o una secuencia que es al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, o al menos 99 % idéntica a SEQ ID NO:45 y donde la región variable de la cadena ligera comprende SEQ ID NO:103, o una secuencia que es al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, o al menos 99 % idéntica a SEQ ID NO:103.

[00171] En la presente memoria se proporciona una proteína de fusión que comprende un anticuerpo anti-B7-H4, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, en donde la región variable de la cadena pesada comprende SEQ ID NO:45, o una secuencia que es al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, o al menos 99 % idéntica a SEQ ID NO:45 y donde la región variable de la cadena ligera comprende SEQ ID NO:107, o una secuencia que es al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, o al menos 99 % idéntica a SEQ ID NO:107.

[00172] En la presente memoria se proporciona una proteína de fusión que comprende un anticuerpo anti-B7-H4, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, en donde la región variable de la cadena pesada comprende la SEQ ID NO: 45 y en donde la región variable de la cadena ligera comprende la SEQ ID NO:49.

[00173] En la presente memoria se proporciona una proteína de fusión que comprende un anticuerpo anti-B7-H4, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, en donde la región variable de la cadena pesada comprende la SEQ ID NO: 45 y en donde la región variable de la cadena ligera comprende la SEQ ID NO:87.

[00174] En la presente memoria se proporciona una proteína de fusión que comprende un anticuerpo anti-B7-H4, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, en donde la región variable de la cadena pesada comprende la SEQ ID NO: 45 y en donde la región variable de la cadena ligera comprende la SEQ ID NO:91.

[00175] En la presente memoria se proporciona una proteína de fusión que comprende un anticuerpo anti-B7-H4, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, en donde la región

variable de la cadena pesada comprende la SEQ ID NO: 45 y en donde la región variable de la cadena ligera comprende la SEQ ID NO:95.

[00176] En la presente memoria se proporciona una proteína de fusión que comprende un anticuerpo anti-B7-H4, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, en donde la región variable de la cadena pesada comprende la SEQ ID NO: 45 y en donde la región variable de la cadena ligera comprende la SEQ ID NO:99.

[00177] En la presente memoria se proporciona una proteína de fusión que comprende un anticuerpo anti-B7-H4, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, en donde la región variable de la cadena pesada comprende la SEQ ID NO: 45 y en donde la región variable de la cadena ligera comprende la SEQ ID NO:103.

[00178] En la presente memoria se proporciona una proteína de fusión que comprende un anticuerpo anti-B7-H4, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, en donde la región variable de la cadena pesada comprende la SEQ ID NO: 45 y en donde la región variable de la cadena ligera comprende la SEQ ID NO:107.

[00179] En un aspecto, se proporciona un anticuerpo anti-B7-H4, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, en donde el anticuerpo, o el fragmento de unión a antígeno del mismo, comprende una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera, en donde cada una de las regiones variables de cadena pesada y de cadena ligera comprende una CDR1, CDR2 y CDR3.

[00180] En la presente memoria se proporciona una proteína de fusión que comprende un anticuerpo anti-B7-H4, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, en donde CDR1H comprende SEQ ID NO:58, CDR2H comprende SEQ ID NO:59, CDR3H comprende SEQ ID NO:60, y en donde CDR1L comprende SEQ ID NO:134, CDR2L comprende SEQ ID NO:135, y CDR3L comprende SEQ ID NO:136.

[00181] En la presente memoria se proporciona una proteína de fusión que comprende un anticuerpo anti-B7-H4, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, en donde CDR1H comprende SEQ ID NO:58, CDR2H comprende SEQ ID NO:59, CDR3H comprende SEQ ID NO:60, y en donde CDR1L comprende SEQ ID NO:62, CDR2L comprende SEQ ID NO:63, y CDR3L comprende SEQ ID NO:64.

[00182] En la presente memoria se proporciona una proteína de fusión que comprende un anticuerpo anti-B7-H4, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, en donde CDR1H comprende SEQ ID NO:58, CDR2H comprende SEQ ID NO:59, CDR3H comprende SEQ

ID NO:60, y en donde CDR1L comprende SEQ ID NO:115, CDR2L comprende SEQ ID NO:116, y CDR3L comprende SEQ ID NO:117.

[00183] En la presente memoria se proporciona una proteína de fusión que comprende un anticuerpo anti-B7-H4, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, en donde CDR1H comprende SEQ ID NO:58, CDR2H comprende SEQ ID NO:59, CDR3H comprende SEQ ID NO:60, y en donde CDR1L comprende SEQ ID NO:119, CDR2L comprende SEQ ID NO:120, y CDR3L comprende SEQ ID NO:121.

[00184] En la presente memoria se proporciona una proteína de fusión que comprende un anticuerpo anti-B7-H4, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, en donde CDR1H comprende SEQ ID NO:58, CDR2H comprende SEQ ID NO:59, CDR3H comprende SEQ ID NO:60, y en donde CDR1L comprende SEQ ID NO:123, CDR2L comprende SEQ ID NO:124, y CDR3L comprende SEQ ID NO:125.

[00185] En la presente memoria se proporciona una proteína de fusión que comprende un anticuerpo anti-B7-H4, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, en donde CDR1H comprende SEQ ID NO:58, CDR2H comprende SEQ ID NO:59, CDR3H comprende SEQ ID NO:60, y en donde CDR1L comprende SEQ ID NO:127, CDR2L comprende SEQ ID NO:128, y CDR3L comprende SEQ ID NO:129.

[00186] En la presente memoria se proporciona una proteína de fusión que comprende un anticuerpo anti-B7-H4, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, en donde CDR1H comprende SEQ ID NO:58, CDR2H comprende SEQ ID NO:59, CDR3H comprende SEQ ID NO:60, y en donde CDR1L comprende SEQ ID NO:131, CDR2L comprende SEQ ID NO:132, y CDR3L comprende SEQ ID NO:133.

[00187] En la presente memoria se proporciona una proteína de fusión que comprende un anticuerpo anti-B7-H4, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, en donde la región variable de la cadena pesada comprende SEQ ID NO:57, o una secuencia que es al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, o al menos 99 % idéntica a SEQ ID NO:57 y donde la región variable de la cadena ligera comprende SEQ ID NO:61, o una secuencia que es al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, o al menos 99 % idéntica a SEQ ID NO:61.

[00188] En la presente memoria se proporciona una proteína de fusión que comprende un anticuerpo anti-B7-H4, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, en donde la región variable de la cadena pesada comprende SEQ ID NO:57, o una secuencia que es al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, o al menos 99 %

idéntica a SEQ ID NO:57 y donde la región variable de la cadena ligera comprende SEQ ID NO:114, o una secuencia que es al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, o al menos 99 % idéntica a SEQ ID NO:114.

[00189] En la presente memoria se proporciona una proteína de fusión que comprende un anticuerpo anti-B7-H4, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, en donde la región variable de la cadena pesada comprende SEQ ID NO:57, o una secuencia que es al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, o al menos 99 % idéntica a SEQ ID NO:57 y donde la región variable de la cadena ligera comprende SEQ ID NO:118, o una secuencia que es al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, o al menos 99 % idéntica a SEQ ID NO:118.

[00190] En la presente memoria se proporciona una proteína de fusión que comprende un anticuerpo anti-B7-H4, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, en donde la región variable de la cadena pesada comprende SEQ ID NO:57, o una secuencia que es al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, o al menos 99 % idéntica a SEQ ID NO:57 y donde la región variable de la cadena ligera comprende SEQ ID NO:122, o una secuencia que es al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, o al menos 99 % idéntica a SEQ ID NO:122.

[00191] En la presente memoria se proporciona una proteína de fusión que comprende un anticuerpo anti-B7-H4, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, en donde la región variable de la cadena pesada comprende SEQ ID NO:57, o una secuencia que es al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, o al menos 99 % idéntica a SEQ ID NO:57 y donde la región variable de la cadena ligera comprende SEQ ID NO:126, o una secuencia que es al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, o al menos 99 % idéntica a SEQ ID NO:126. o

[00192] En la presente memoria se proporciona una proteína de fusión que comprende un anticuerpo anti-B7-H4, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, en donde la región variable de la cadena pesada comprende SEQ ID NO:57, o una secuencia que es al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, o al menos 99 % idéntica a SEQ ID NO:57 y donde la región variable de la cadena ligera comprende SEQ ID NO:130, o una secuencia que es al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, o al menos 99 % idéntica a SEQ ID NO:130.

[00193] En la presente memoria se proporciona una proteína de fusión que comprende un anticuerpo anti-B7-H4, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, en donde la región

variable de la cadena pesada comprende la SEQ ID NO:57 y en donde la región variable de la cadena ligera comprende la SEQ ID NO:61.

[00194] En la presente memoria se proporciona una proteína de fusión que comprende un anticuerpo anti-B7-H4, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, en donde la región variable de la cadena pesada comprende la SEQ ID NO:57 y en donde la región variable de la cadena ligera comprende la SEQ ID NO:114.

[00195] En la presente memoria se proporciona una proteína de fusión que comprende un anticuerpo anti-B7-H4, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, en donde la región variable de la cadena pesada comprende la SEQ ID NO:57 y en donde la región variable de la cadena ligera comprende la SEQ ID NO:118.

[00196] En la presente memoria se proporciona una proteína de fusión que comprende un anticuerpo anti-B7-H4, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, en donde la región variable de la cadena pesada comprende la SEQ ID NO:57 y en donde la región variable de la cadena ligera comprende la SEQ ID NO:122.

[00197] En la presente memoria se proporciona una proteína de fusión que comprende un anticuerpo anti-B7-H4, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, en donde la región variable de la cadena pesada comprende la SEQ ID NO:57 y en donde la región variable de la cadena ligera comprende la SEQ ID NO:126.

[00198] En la presente memoria se proporciona una proteína de fusión que comprende un anticuerpo anti-B7-H4, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, en donde la región variable de la cadena pesada comprende la SEQ ID NO:57 y en donde la región variable de la cadena ligera comprende la SEQ ID NO:130.

[00199] En una realización, se proporciona una proteína de fusión que comprende

- (a) una primera cadena que comprende desde el terminal N hasta el terminal C:
 - a. una cadena pesada variable de un anticuerpo anti-B7-H4, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, en donde la cadena pesada variable comprende una CDR1H, una CDR2H y una CDR3H, en donde la CDR1H comprende la SEQ ID NO:16, la CDR2H comprende la SEQ ID NO:17, la CDR3H comprende la SEQ ID NO:18,
 - b. una cadena pesada constante,
 - c. un polipéptido del dominio sushi de la IL-15R α que comprenda la SEQ ID NO:167, o una secuencia de aminoácidos que al menos un 80 %, al menos un

- 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 %, o al menos un 99 % idéntica a la SEQ ID NO:167,
- d. un enlazador que une el polipéptido de dominio sushi de IL-15R α y un polipéptido de IL-15, y
 - e. el polipéptido IL-15, en donde el polipéptido IL-15 comprende la SEQ ID NO:166, o una secuencia de aminoácidos que es al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, o al menos el 99 % idéntica a la SEQ ID NO:166, y
- (b) una segunda cadena que comprende desde el terminal N hasta el terminal C:
- a. una cadena ligera variable de un anticuerpo anti-B7-H4, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, donde la cadena ligera variable comprende una CDR1L, una CDR2L y una CDR3L, donde la CDR1L comprende la SEQ ID NO:70, la CDR2L comprende la SEQ ID NO:71 y la CDR3L comprende la SEQ ID NO:72, y
 - b. una cadena ligera constante;
- opcionalmente, en donde la cadena pesada constante comprende una o varias modificaciones que provocan la heterodimerización.

[00200] En una realización, se proporciona una proteína de fusión que comprende

- (a) una primera cadena que comprende desde el terminal N hasta el C:
- a. una cadena pesada variable de un anticuerpo anti-B7-H4, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, en donde la cadena pesada variable comprende una CDR1H, una CDR2H y una CDR3H, en donde la CDR1H comprende la SEQ ID NO:16, la CDR2H comprende la SEQ ID NO:17, la CDR3H comprende la SEQ ID NO:18,
 - b. una cadena pesada constante,
 - c. un enlazador que une la cadena pesada constante y un polipéptido del dominio sushi de la IL-15R α ,
 - d. el polipéptido de dominio sushi de la IL-15R α , en donde el polipéptido de dominio sushi de la IL-15R α comprende la SEQ ID NO:167, o una secuencia de aminoácidos que al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, o al menos el 99 % es idéntica a la SEQ ID NO:167,

- e. un enlazador que une el polipéptido de dominio sushi de IL-15R α y un polipéptido de IL-15, y
 - f. el polipéptido IL-15, en donde el polipéptido IL-15 comprende la SEQ ID NO:166, o una secuencia de aminoácidos que es al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, o al menos el 99 % idéntica a la SEQ ID NO:166; y
- (b) una segunda cadena que comprende desde el terminal N hasta el terminal C:
- a. una cadena pesada variable de un anticuerpo anti-B7-H4, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, donde la cadena pesada variable comprende una CDR1H, una CDR2H y una CDR3H, donde la CDR1H comprende la SEQ ID NO:16, la CDR2H comprende la SEQ ID NO:17, la CDR3H comprende la SEQ ID NO:18; y
 - b. una cadena ligera constante;
- opcionalmente, en donde la cadena pesada constante comprende una o varias modificaciones que provocan la heterodimerización.

[00201] En una realización, se proporciona una proteína de fusión que comprende

- (a) una primera cadena que comprende desde el terminal N hasta el terminal C:
 - a. una cadena pesada variable de un anticuerpo anti-B7-H4, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, en donde la cadena pesada variable comprende una CDR1H, una CDR2H y una CDR3H, en donde la CDR1H comprende la SEQ ID NO:46, la CDR2H comprende la SEQ ID NO:47, la CDR3H comprende la SEQ ID NO:48,
 - b. una cadena pesada constante,
 - c. un polipéptido del dominio sushi de la IL-15R α que comprenda la SEQ ID NO:167, o una secuencia de aminoácidos que al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 %, o al menos un 99 % idéntica a la SEQ ID NO:167,
 - d. un enlazador que une el polipéptido de dominio sushi de IL-15R α y un polipéptido de IL-15, y
 - e. el polipéptido IL-15, en donde el polipéptido IL-15 comprende la SEQ ID NO:166, o una secuencia de aminoácidos que es al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, o al menos el 99 % idéntica a la SEQ ID NO:166; y

- (b) una segunda cadena que comprende desde el terminal N hasta el terminal C:
- a. una cadena ligera variable de un anticuerpo anti-B7-H4, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, donde la cadena ligera variable comprende una CDR1L, una CDR2L y una CDR3L, donde la CDR1L comprende la SEQ ID NO:108, la CDR2L comprende la SEQ ID NO:109 y la CDR3L comprende la SEQ ID NO:110, y
 - b. una cadena ligera constante;
- opcionalmente, en donde la cadena pesada constante comprende una o varias modificaciones que provocan la heterodimerización.

[00202] En una realización, se proporciona una proteína de fusión que comprende

- (a) una primera cadena que comprende desde el terminal N hasta el terminal C:
- a. una cadena pesada variable de un anticuerpo anti-B7-H4, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, en donde la cadena pesada variable comprende una CDR1H, una CDR2H y una CDR3H, en donde la CDR1H comprende la SEQ ID NO:46, la CDR2H comprende la SEQ ID NO:47, la CDR3H comprende la SEQ ID NO:48,
 - b. una cadena pesada constante,
 - c. un enlazador que une la cadena pesada constante y un polipéptido del dominio sushi de la IL-15R α ,
 - d. el polipéptido de dominio sushi de la IL-15R α , en donde el polipéptido de dominio sushi de la IL-15R α comprende la SEQ ID NO:167, o una secuencia de aminoácidos que al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, o al menos el 99 % es idéntica a la SEQ ID NO:167,
 - e. un enlazador que une el polipéptido de dominio sushi de IL-15R α y un polipéptido de IL-15, y
 - f. el polipéptido IL-15, en donde el polipéptido IL-15 comprende la SEQ ID NO:166, o una secuencia de aminoácidos que es al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, o al menos el 99 % idéntica a la SEQ ID NO:166; y
- (b) una segunda cadena que comprende desde el terminal N hasta el terminal C:
- a. una cadena ligera variable de un anticuerpo anti-B7-H4, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, donde la cadena ligera variable comprende una

CDR1L, una CDR2L y una CDR3L, donde la CDR1L comprende la SEQ ID NO:108, la CDR2L comprende la SEQ ID NO:109 y la CDR3L comprende la SEQ ID NO:110, y

- b. una cadena ligera constante;

opcionalmente, en donde la cadena pesada constante comprende una o varias modificaciones que provocan la heterodimerización.

[00203] En una realización, se proporciona una proteína de fusión que comprende

(a) una primera cadena que comprende desde el terminal N hasta el terminal C:

- a. una cadena pesada variable de un anticuerpo anti-B7-H4, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, en donde la cadena pesada variable comprende una CDR1H, una CDR2H y una CDR3H, en donde la CDR1H comprende la SEQ ID NO:58, la CDR2H comprende la SEQ ID NO:59, la CDR3H comprende la SEQ ID NO:60,
- b. una cadena pesada constante,
- c. un polipéptido del dominio sushi de la IL-15R α que comprenda la SEQ ID NO:167, o una secuencia de aminoácidos que al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 %, o al menos un 99 % idéntica a la SEQ ID NO:167,
- d. un enlazador que une el polipéptido de dominio sushi de IL-15R α y un polipéptido de IL-15, y
- e. el polipéptido IL-15, en donde el polipéptido IL-15 comprende la SEQ ID NO:166, o una secuencia de aminoácidos que es al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, o al menos el 99 % idéntica a la SEQ ID NO:166; y

(b) una segunda cadena que comprende desde el terminal N hasta el terminal C:

- a. una cadena ligera variable de un anticuerpo anti-B7-H4, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, donde la cadena ligera variable comprende una CDR1L, una CDR2L y una CDR3L, donde la CDR1L comprende la SEQ ID NO:119, la CDR2L comprende la SEQ ID NO:120 y la CDR3L comprende la SEQ ID NO:121, y
- b. una cadena ligera constante;

opcionalmente, en donde la cadena pesada constante comprende una o varias modificaciones que provocan la heterodimerización.

[00204] En una realización, se proporciona una proteína de fusión que comprende

- (a) una primera cadena que comprende desde el terminal N hasta el terminal C:
 - a. una cadena pesada variable de un anticuerpo anti-B7-H4, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, en donde la cadena pesada variable comprende una CDR1H, una CDR2H y una CDR3H, en donde la CDR1H comprende la SEQ ID NO:58, la CDR2H comprende la SEQ ID NO:59, la CDR3H comprende la SEQ ID NO:60,
 - b. una cadena pesada constante,
 - c. un enlazador que une la cadena pesada constante y un polipéptido del dominio sushi de la IL-15R α ,
 - d. el polipéptido de dominio sushi de la IL-15R α , en donde el polipéptido de dominio sushi de la IL-15R α comprende la SEQ ID NO:167, o una secuencia de aminoácidos que al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, o al menos el 99 % es idéntica a la SEQ ID NO:167,
 - e. un enlazador que une el polipéptido del dominio sushi de IL-15R α y un polipéptido de IL-15,
 - f. el polipéptido IL-15, en donde el polipéptido IL-15 comprende la SEQ ID NO:166, o una secuencia de aminoácidos que es al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, o al menos el 99 % idéntica a la SEQ ID NO:166; y
- (b) una segunda cadena que comprende desde el terminal N hasta el terminal C:
 - a. una cadena ligera variable de un anticuerpo anti-B7-H4, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, donde la cadena ligera variable comprende una CDR1L, una CDR2L y una CDR3L, donde la CDR1L comprende la SEQ ID NO:119, la CDR2L comprende la SEQ ID NO:120 y la CDR3L comprende la SEQ ID NO:121, y
 - b. una cadena ligera constante;

opcionalmente, en donde la cadena pesada constante comprende una o varias modificaciones que provocan la heterodimerización.

[00205] En una realización, se proporciona una proteína de fusión que comprende

- (a) una primera cadena que comprende desde el terminal N hasta el terminal C:

- a. una cadena pesada variable de un anticuerpo anti-B7-H4, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, que comprenda la SEQ ID NO: 15 o una secuencia de aminoácidos que al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 %, o al menos un 99 % idéntica a la SEQ ID NO: 15,
 - b. una cadena pesada constante,
 - c. un polipéptido del dominio sushi de la IL-15R α que comprenda la SEQ ID NO:167, o una secuencia de aminoácidos que al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 %, o al menos un 99 % idéntica a la SEQ ID NO:167,
 - d. un enlazador que une el polipéptido de dominio sushi de IL-15R α y un polipéptido de IL-15, y
 - e. el polipéptido IL-15, en donde el polipéptido IL-15 comprende la SEQ ID NO:166, o una secuencia de aminoácidos que es al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, o al menos el 99 % idéntica a la SEQ ID NO:166; y
- (b) una segunda cadena que comprende desde el terminal N hasta el terminal C:
- a. una cadena ligera variable de un anticuerpo anti-B7-H4, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, que comprenda la SEQ ID NO: 69 o una secuencia de aminoácidos que al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 %, o al menos un 99 % idéntica a la SEQ ID NO: 69, y
 - b. una cadena ligera constante;
- opcionalmente, en donde la cadena pesada constante comprende una o varias modificaciones que provocan la heterodimerización.

[00206] En una realización, se proporciona una proteína de fusión que comprende

- (a) una primera cadena que comprende desde el terminal N hasta el terminal C:
- a. una cadena pesada variable de un anticuerpo anti-B7-H4, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, que comprenda la SEQ ID NO: 15 o una secuencia de aminoácidos que al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 %, o al menos un 99 % idéntica a la SEQ ID NO: 15,
 - b. una cadena pesada constante,

- c. un enlazador que une la cadena pesada constante y un polipéptido del dominio sushi de la IL-15R α ,
 - d. el polipéptido de dominio sushi de la IL-15R α , en donde el polipéptido de dominio sushi de la IL-15R α comprende la SEQ ID NO:167, o una secuencia de aminoácidos que al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, o al menos el 99 % es idéntica a la SEQ ID NO:167,
 - e. un enlazador que une el polipéptido de dominio sushi de IL-15R α y un polipéptido de IL-15, y
 - f. el polipéptido IL-15, en donde el polipéptido IL-15 comprende la SEQ ID NO:166, o una secuencia de aminoácidos que es al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, o al menos el 99 % idéntica a la SEQ ID NO:166; y
- (b) una segunda cadena que comprende desde el terminal N hasta el terminal C:
- a. una cadena ligera variable de un anticuerpo anti-B7-H4, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, que comprenda la SEQ ID NO: 69 o una secuencia de aminoácidos que al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 %, o al menos un 99 % idéntica a la SEQ ID NO:69, y
 - b. una cadena ligera constante;
- opcionalmente, en donde la cadena pesada constante comprende una o varias modificaciones que provocan la heterodimerización.

[00207] En una realización, se proporciona una proteína de fusión que comprende

- (a) una primera cadena que comprende desde el terminal N hasta el terminal C:
- a. una cadena pesada variable de un anticuerpo anti-B7-H4, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, que comprenda la SEQ ID NO: 45 o una secuencia de aminoácidos que al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 %, o al menos un 99 % idéntica a la SEQ ID NO:45,
 - b. una cadena pesada constante,
 - c. un polipéptido del dominio sushi de la IL-15R α que comprenda la SEQ ID NO:167, o una secuencia de aminoácidos que al menos un 80 %, al menos un

- 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 %, o al menos un 99 % idéntica a la SEQ ID NO:167,
 - d. un enlazador que une el polipéptido de dominio sushi de IL-15R α y un polipéptido de IL-15, y
 - e. el polipéptido IL-15, en donde el polipéptido IL-15 comprende la SEQ ID NO:166, o una secuencia de aminoácidos que es al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, o al menos el 99 % idéntica a la SEQ ID NO:166; y
- (b) una segunda cadena que comprende desde el terminal N hasta el terminal C:
- a. una cadena pesada variable de un anticuerpo anti-B7-H4, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, que comprenda la SEQ ID NO: 107 o una secuencia de aminoácidos que al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 %, o al menos un 99 % idéntica a la SEQ ID NO:107, y
 - b. una cadena ligera constante;
- opcionalmente, en donde la cadena pesada constante comprende una o varias modificaciones que provocan la heterodimerización.

[00208] En una realización, se proporciona una proteína de fusión que comprende

- (a) una primera cadena que comprende desde el terminal N hasta el terminal C:
- a. una cadena pesada variable de un anticuerpo anti-B7-H4, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, que comprenda la SEQ ID NO: 45 o una secuencia de aminoácidos que al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 %, o al menos un 99 % idéntica a la SEQ ID NO:45,
 - b. una cadena pesada constante,
 - c. un enlazador que une la cadena pesada constante y un polipéptido del dominio sushi de la IL-15R α ,
 - d. el polipéptido de dominio sushi de la IL-15R α , en donde el polipéptido de dominio sushi de la IL-15R α comprende la SEQ ID NO:167, o una secuencia de aminoácidos que al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, o al menos el 99 % es idéntica a la SEQ ID NO:167,

- e. un enlazador que une el polipéptido de dominio sushi de IL-15R α y un polipéptido de IL-15, y
 - f. el polipéptido IL-15, en donde el polipéptido IL-15 comprende la SEQ ID NO:166, o una secuencia de aminoácidos que es al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, o al menos el 99 % idéntica a la SEQ ID NO:166; y
- (b) una segunda cadena que comprende desde el terminal N hasta el terminal C:
- a. una cadena pesada variable de un anticuerpo anti-B7-H4, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, que comprenda la SEQ ID NO: 107 o una secuencia de aminoácidos que al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 %, o al menos un 99 % idéntica a la SEQ ID NO:107, y
 - b. una cadena ligera constante;
- opcionalmente, en donde la cadena pesada constante comprende una o varias modificaciones que provocan la heterodimerización.

[00209] En una realización, se proporciona una proteína de fusión que comprende

- (a) una primera cadena que comprende desde el terminal N hasta el terminal C:
- a. una cadena pesada variable de un anticuerpo anti-B7-H4, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, que comprenda la SEQ ID NO: 57 o una secuencia de aminoácidos que al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 %, o al menos un 99 % idéntica a la SEQ ID NO:57,
 - b. una cadena pesada constante,
 - c. un polipéptido del dominio sushi de la IL-15R α que comprenda la SEQ ID NO:167, o una secuencia de aminoácidos que al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 %, o al menos un 99 % idéntica a la SEQ ID NO:167,
 - d. un enlazador que une el polipéptido de dominio sushi de IL-15R α y un polipéptido de IL-15, y
 - e. el polipéptido IL-15, en donde el polipéptido IL-15 comprende la SEQ ID NO:166, o una secuencia de aminoácidos que es al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, o al menos el 99 % idéntica a la SEQ ID NO:166; y

- (b) una segunda cadena que comprende desde el terminal N hasta el terminal C:
- a. una cadena pesada variable de un anticuerpo anti-B7-H4, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, que comprenda la SEQ ID NO: 118 o una secuencia de aminoácidos que al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 %, o al menos un 99 % idéntica a la SEQ ID NO:118, y
 - b. una cadena ligera constante;
- opcionalmente, en donde la cadena pesada constante comprende una o varias modificaciones que provocan la heterodimerización.

[00210] En una realización, se proporciona una proteína de fusión que comprende

- (a) una primera cadena que comprende desde el terminal N hasta el terminal C:
- a. una cadena pesada variable de un anticuerpo anti-B7-H4, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, que comprenda la SEQ ID NO: 57 o una secuencia de aminoácidos que al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 %, o al menos un 99 % idéntica a la SEQ ID NO:57,
 - b. una cadena pesada constante,
 - c. un enlazador que une la cadena pesada constante y un polipéptido del dominio sushi de la IL-15R α ,
 - d. el polipéptido de dominio sushi de la IL-15R α , en donde el polipéptido de dominio sushi de la IL-15R α comprende la SEQ ID NO:167, o una secuencia de aminoácidos que al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, o al menos el 99 % es idéntica a la SEQ ID NO:167,
 - e. un enlazador que une el polipéptido de dominio sushi de IL-15R α y un polipéptido de IL-15, y
 - f. el polipéptido IL-15, en donde el polipéptido IL-15 comprende la SEQ ID NO:166, o una secuencia de aminoácidos que es al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, o al menos el 99 % idéntica a la SEQ ID NO:166; y
- (b) una segunda cadena que comprende desde el terminal N hasta el terminal C:
- a. una cadena pesada variable de un anticuerpo anti-B7-H4, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, que comprenda la SEQ ID NO: 118 o una

secuencia de aminoácidos que al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 %, o al menos un 99 % idéntica a la SEQ ID NO:118, y

b. una cadena ligera constante;

opcionalmente, en donde la cadena pesada constante comprende una o varias modificaciones que provocan la heterodimerización.

[00211] En una realización, se proporciona una proteína de fusión que comprende:

- (a) una cadena ligera que comprenda la SEQ ID NO:69 o una secuencia de aminoácidos que sea al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, o al menos el 99 % idéntica a la SEQ ID NO:69 y/o a la SEQ ID NO:145 o una secuencia de aminoácidos que sea al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, o al menos el 99 % idéntica a la SEQ ID NO:145;
- (b) una primera cadena pesada que comprende la SEQ ID NO:150 o una secuencia de aminoácidos que es al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, o al menos el 99 % idéntica a la SEQ ID NO:150; y
- (c) una segunda cadena pesada que comprende la SEQ ID NO:157 o una secuencia de aminoácidos que es al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, o al menos el 99 % idéntica a la SEQ ID NO:157.

[00212] En una realización, se proporciona una proteína de fusión que comprende:

- (a) una cadena ligera que comprenda la SEQ ID NO:69 o una secuencia de aminoácidos que sea al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, o al menos el 99 % idéntica a la SEQ ID NO:69 y/o a la SEQ ID NO:145 o una secuencia de aminoácidos que sea al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, o al menos el 99 % idéntica a la SEQ ID NO:145;
- (b) una primera cadena pesada que comprende la SEQ ID NO:151 o una secuencia de aminoácidos que es al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos

el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 % o al menos el 99 % idéntica a la SEQ ID NO:151; y

- (c) una segunda cadena pesada que comprende la SEQ ID NO:158 o una secuencia de aminoácidos que es al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, o al menos el 99 % idéntica a la SEQ ID NO:158.

[00213] En una realización, se proporciona una proteína de fusión que comprende:

- (a) una cadena ligera que comprende la SEQ ID NO:118 o una secuencia de aminoácidos que es 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 % idéntica a la SEQ ID NO:118 y/o a la SEQ ID NO:144 o una secuencia de aminoácidos que es 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 % idéntica a la SEQ ID NO:144;
- (b) una primera cadena pesada que comprende la SEQ ID NO:148 o una secuencia de aminoácidos que es al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, o al menos el 99 % idéntica a la SEQ ID NO:148; y
- (c) una segunda cadena pesada que comprende la SEQ ID NO:155 o una secuencia de aminoácidos que es al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, o al menos el 99 % idéntica a la SEQ ID NO:155.

[00214] En una realización, se proporciona una proteína de fusión que comprende:

- (a) una cadena ligera que comprende la SEQ ID NO:118 o una secuencia de aminoácidos que es 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 % idéntica a la SEQ ID NO:118 y/o a la SEQ ID NO:144 o una secuencia de aminoácidos que es 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 % idéntica a la SEQ ID NO:144;
- (b) una primera cadena pesada que comprende la SEQ ID NO:149 o una secuencia de aminoácidos que es al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, o al menos el 99 % idéntica a la SEQ ID NO:149; y

- (c) una segunda cadena pesada que comprende la SEQ ID NO:156 o una secuencia de aminoácidos que es al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, o al menos el 99 % idéntica a la SEQ ID NO:156.

[00215] En una realización, se proporciona una proteína de fusión que comprende:

- (a) una cadena ligera que comprende SEQ ID NO:69 y/o SEQ ID NO:145;
- (b) una primera cadena pesada que comprende la SEQ ID NO:150; y
- (c) una segunda cadena pesada que comprende la SEQ ID NO:157.

[00216] En una realización, se proporciona una proteína de fusión que comprende:

- (a) una cadena ligera que comprende SEQ ID NO:69 y/o SEQ ID NO:145;
- (b) una primera cadena pesada que comprende la SEQ ID NO:151; y
- (c) una segunda cadena pesada que comprende la SEQ ID NO:158.

[00217] En una realización, se proporciona una proteína de fusión que comprende:

- (a) una cadena ligera que comprende SEQ ID NO:118 y/o SEQ ID NO:144;
- (b) una primera cadena pesada que comprende la SEQ ID NO:148; y
- (c) una segunda cadena pesada que comprende la SEQ ID NO:155.

[00218] En una realización, se proporciona una proteína de fusión que comprende:

- (a) una cadena ligera que comprende SEQ ID NO:118 y/o SEQ ID NO:144;
- (b) una primera cadena pesada que comprende la SEQ ID NO:149; y
- (c) una segunda cadena pesada que comprende la SEQ ID NO:156.

[00219] En una realización, se proporciona una proteína de fusión que comprende:

- (a) una cadena ligera que comprende la SEQ ID NO:145;
- (b) una primera cadena pesada que comprende la SEQ ID NO:150; y
- (c) una segunda cadena pesada que comprende la SEQ ID NO:157.

[00220] En la presente memoria se proporciona una proteína de fusión que comprende una o más secuencias divulgadas en **las Tablas 13, 21 o 22**.

[00221] Anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos

[00222] El término anticuerpo se emplea en la presente memoria en el sentido más amplio e incluye los anticuerpos monoclonales (incluidos los anticuerpos monoclonales de longitud completa o intactos), los anticuerpos policlonales, los anticuerpos biespecíficos, los anticuerpos humanizados, los anticuerpos de cadena simple, los anticuerpos quiméricos, los anticuerpos sintéticos, los anticuerpos recombinantes, los anticuerpos híbridos, los

anticuerpos mutagénicos y los anticuerpos injertados (anticuerpos injertados), los anticuerpos biespecíficos, una porción específica del anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo de dominio), así como cualquier porción de unión a antígeno de la misma que compita con un anticuerpo intacto por la unión específica, una porción de unión a antígeno de la misma (por ejemplo, paratopos, CDRs), y cualquier otra conformación modificada de la molécula de inmunoglobulina que comprenda el sitio de reconocimiento de antígeno siempre que presenten la actividad biológica y la especificidad deseadas. Por consiguiente, un anticuerpo es una molécula de inmunoglobulina o un fragmento o derivado de la misma que incluye cualquier polipéptido que comprende un sitio de unión a antígeno, capaz de unirse específicamente a una diana a través de al menos un sitio de reconocimiento de antígeno situado en la región variable de la molécula de inmunoglobulina. El anticuerpo divulgado puede ser murino, de rata, humano o de cualquier otro origen (incluyendo anticuerpos quiméricos o humanizados).

[00223] En ciertas realizaciones, las regiones marco del anticuerpo (o fragmento de unión a antígeno del mismo) pueden ser idénticas a las secuencias de la línea germinal humana o pueden ser modificadas natural o artificialmente.

[00224] En una realización preferida, las estructuras de anticuerpos descritas pertenecen a la clase IgG de moléculas de inmunoglobulina. Una molécula de inmunoglobulina IgG estándar comprende dos polipéptidos de cadena ligera idénticos y dos polipéptidos de cadena pesada idénticos. El peso molecular del polipéptido de la cadena ligera es de unos 23.000 daltons y el peso molecular del polipéptido de la cadena pesada varía entre 53.000-70.000 daltons. Las cuatro cadenas suelen estar unidas por enlaces disulfuro en una configuración en "Y".

[00225] Las dos cadenas pesadas (HC) y las dos cadenas ligeras (LC) de una molécula de inmunoglobulina están unidas covalentemente entre sí, y las porciones de extremo de las dos cadenas pesadas están unidas entre sí mediante enlaces disulfuro covalentes o enlaces no covalentes cuando las inmunoglobulinas son generadas por hibridomas, células B o células huésped modificadas genéticamente. Las cadenas ligeras y pesadas contienen regiones de homología estructural y funcional. Los términos "variable" y "constante" se utilizan funcionalmente. Cada cadena pesada está compuesta por una región variable de cadena pesada ("HCVR" o "VH") y una región constante de cadena pesada (compuesta por los dominios CH1, CH2 y CH3). Cada cadena ligera está compuesta por una región variable de la cadena ligera ("LCVR" o "VL") y una región constante de la cadena ligera (CL). Las

regiones VH y VL pueden subdividirse en regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones determinantes de la complementariedad (CDR), intercaladas con regiones más conservadas, denominadas regiones marco (FR). Cada VH y VL se compone de tres CDR y cuatro FR, dispuestas desde el terminal amino al terminal carboxi en el siguiente orden FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4.

[00226] La región variable permite que el anticuerpo reconozca y se una específicamente a los epítomos localizados en los antígenos. Los dominios variables de las porciones de la cadena ligera (VL) y pesada (VH) determinan el reconocimiento y la especificidad del antígeno. El sitio de unión al antígeno de un anticuerpo está compuesto por el dominio VL y el dominio VH, o un subconjunto de las CDR. Más concretamente, el sitio de unión al antígeno está definido por una, dos o tres CDR en cada una de las cadenas VH y VL (es decir, CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3). Por el contrario, los dominios constantes de la cadena ligera (CL) y de la cadena pesada (CH1, CH2 o CH3) confieren propiedades biológicas como la secreción, la movilidad transplacentaria, la unión al receptor Fc, la unión al complemento y otras similares. Por convención, la numeración de los dominios de la región constante aumenta a medida que se alejan del sitio de unión al antígeno o del terminal amino del anticuerpo.

[00227] Tal y como se utiliza en la presente memoria, el término "Regiones Determinantes de la Complementariedad" (CDR) se refiere a las porciones del dominio variable de un anticuerpo que (normalmente) participan en la unión al antígeno. Cada región variable tiene tres CDR no consecutivas, conocidas como CDR1, CDR2 y CDR3. Las CDR están separadas por regiones estructuralmente conservadas denominadas regiones marco (FR-1, -2, -3 y -4) que forman una estructura de hoja β "central" que muestra estos bucles en la superficie del dominio variable. Las seis CDR presentes en cada dominio de unión a antígeno son secuencias cortas y no contiguas de aminoácidos que se posicionan específicamente para formar el dominio de unión a antígeno cuando el anticuerpo asume su configuración tridimensional en un entorno acuoso. La longitud y la composición de las secuencias CDR son muy variables, especialmente en la CDR3. El resto de los aminoácidos situados en los dominios de unión al antígeno o las regiones "marco", muestran menos variabilidad intermolecular. El dominio de unión al antígeno formado por las CDR posicionadas define una superficie complementaria al epítomo del antígeno inmunorreactivo. Esta superficie complementaria favorece la unión no covalente del anticuerpo a su epítomo afín. Cada CDR puede comprender residuos de aminoácidos de una CDR como la definida, por ejemplo, por

Kabat (es decir, sobre los residuos 24-34 (L1), 50-56 (L2) y 89-97 (L3) en el dominio variable de la cadena ligera y 31-35 (H1), 50-65 (H2) y 95-102 (H3) en el dominio variable de la cadena pesada (Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987, 1991)). Cada CDR también puede comprender residuos de aminoácidos de un "bucle hipervariable" (es decir, alrededor de los residuos 26-32 (L1), 50-52 (L2) y 91-96 (L3) en el dominio variable de la cadena ligera y 26-32 (H1), 53-55 (H2) y 96-101 (H3) en el dominio variable de la cadena pesada (Chothia & Lesk 196 J. Mol. Biol. 901 (1987)). En algunos casos, una CDR puede incluir aminoácidos tanto de una región CDR definida por consiguiente con Kabat como de un bucle hipervariable. La numeración de Kabat puede no corresponder siempre a la numeración lineal de los residuos de aminoácidos debido a un acortamiento o inserción en un componente estructural, ya sea marco o CDR, de la estructura del dominio variable básico. La numeración Kabat correcta de los residuos puede determinarse para un anticuerpo dado, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, mediante la alineación de los residuos de homología en la secuencia del anticuerpo, o del fragmento de unión a antígeno del mismo, con una secuencia numerada Kabat "estándar" o definirse según el sistema ImMunoGeneTics (IMGT) (Lefranc, M.-P. et al., *Dev. Comp. Immunol.*, 27, 55-77 (2003)).

[00228] Tal como se emplea en la presente memoria, el término "porción de unión a antígeno" o "fragmento de unión a antígeno" puede ser un fragmento que comprende un Fab, Fab', F(ab')₂, Fd, Fv, anticuerpos de dominio (dAbs como los anticuerpos de tiburón y camello), ScFv, un maxicuerpo, un minicuerpo un nanobody, un intrabody, un diabody, un triabody, un tetrabody, un v-NAR y un bis-scFv, o un polipéptido que contenga al menos ciertas porciones de una inmunoglobulina suficientes para conferir una unión específica al antígeno.

[00229] El anticuerpo puede ser de cualquier clase de anticuerpo, como IgG, IgA o IgM (o una subclase de las mismas), y no es necesario que el anticuerpo sea de ninguna clase en particular, y cualquiera de las moléculas de inmunoglobulina que comprenden el sitio de reconocimiento de antígeno de la especificidad requerida, otras configuraciones modificadas (incluidas las variantes de glicosilación de los anticuerpos, las variantes de la secuencia de aminoácidos de los anticuerpos y los anticuerpos modificados covalentemente) pueden ser abarcadas. Las versiones modificadas de cada una de estas clases e isotipos son conocidas por un experto en la materia y, en consecuencia, están dentro del ámbito de la presente descripción.

[00230] En algunas realizaciones de los aspectos descritos en la presente memoria, el fragmento de anticuerpo anti-B7-H4 es un fragmento Fab, que comprende o consiste esencialmente en un dominio variable (VL) y constante (CL) de la cadena ligera y un dominio variable (VH) y el primer dominio constante (CH1) de la cadena pesada.

[00231] En algunas realizaciones de los aspectos aquí descritos, el fragmento de anticuerpo anti-B7-H4 es un fragmento Fab', que se refiere a un fragmento Fab que tiene uno o más residuos de cisteína en el terminal C del dominio CH1.

[00232] En algunas realizaciones de los aspectos descritos en la presente memoria, el fragmento de anticuerpo anti-B7-H4 es un fragmento Fd que comprende o consiste esencialmente en dominios VH y CH1.

[00233] En algunas realizaciones de los aspectos descritos en la presente memoria, el fragmento de anticuerpo anti-B7-H4 es un fragmento Fd' que comprende los dominios VH y CH1 y uno o más residuos de cisteína en el terminal C del dominio CH1.

[00234] Los fragmentos de anticuerpos de cadena única Fv o scFv comprenden o consisten esencialmente en los dominios VH y VL de un anticuerpo, de manera que estos dominios están presentes en una sola cadena polipeptídica. En general, un polipéptido Fv comprende además un polipéptido enlazador entre los dominios VH y VL, que permite que el scFv forme la estructura deseada para la unión al antígeno. Por consiguiente, en algunas realizaciones de los aspectos descritos en la presente memoria, el fragmento de anticuerpo anti-B7-H4 es un fragmento Fv que comprende o consiste esencialmente en los dominios VL y VH de un solo brazo de un anticuerpo.

[00235] En algunas realizaciones de los aspectos descritos en la presente memoria, el fragmento de anticuerpo anti-B7-H4 es un diacuerpo que comprende dos sitios de unión a antígeno, que comprende un dominio variable de cadena pesada (VH) conectado a un dominio variable de cadena ligera (VL) en la misma cadena polipeptídica.

[00236] En algunas realizaciones de los aspectos descritos en la presente memoria, el fragmento de anticuerpo anti-B7-H4 es un fragmento dAb que comprende o consiste esencialmente en un dominio VH.

[00237] En algunas realizaciones de los aspectos descritos en la presente memoria, el fragmento de anticuerpo anti-B7-H4 es un fragmento F(ab')₂, que comprende un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab' unidos por un puente disulfuro en la región bisagra.

[00238] En algunas realizaciones de los aspectos descritos en la presente memoria, el fragmento de anticuerpo anti-B7-H4 es un anticuerpo lineal que comprende un par de segmentos Fd en tándem (VH-CH1-VH-CH1) que, junto con polipéptidos de cadena ligera complementarios, forman un par de regiones de unión a antígeno.

[00239] Un experto en la materia puede utilizar diversas técnicas que se han desarrollado y están disponibles para la producción de fragmentos de anticuerpos. Tradicionalmente, estos fragmentos se derivaban mediante la digestión proteolítica de anticuerpos intactos. Sin embargo, los fragmentos de F(ab')₂ pueden aislarse directamente del cultivo de células huésped recombinantes. Otras técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpos serán evidentes para el profesional experto. En otras realizaciones, el fragmento de anticuerpo elegido es un fragmento Fv de cadena única (scFv). Véase, por ejemplo, el documento WO 93/16185. Alternativamente, estos fragmentos también pueden ser producidos directamente por células huésped recombinantes. Por ejemplo, los fragmentos de anticuerpos pueden aislarse a partir de las bibliotecas de fagos de anticuerpos comentadas en la presente memoria. En otro enfoque, los fragmentos Fab'-SH pueden recuperarse directamente de *E. coli* y acoplarse químicamente para formar fragmentos F(ab')₂ (Carter et al., 1992).

[00240] En una realización, el anticuerpo es un anticuerpo biespecífico que comprende una región complementaria que se une a B7-H4.

[00241] Los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno contemplados pueden tener todos los tipos de regiones constantes, incluyendo IgM, IgG, IgD e IgE, y cualquier isotipo, incluyendo IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. En una realización, el isotipo es IgG1 humana. En otra realización, se utiliza el isotipo humano IgG4. Las regiones constantes de la cadena ligera pueden ser λ o κ . El anticuerpo, o el fragmento de unión a antígeno del mismo, puede comprender secuencias de más de una clase o isotipo.

[00242] La descripción describe anticuerpos que se unen a B7-H4, y fragmentos de unión a antígeno de los mismos, que se unen a B7-H4, así como proteínas de fusión que comprenden dichos anticuerpos anti-B7-H4, o fragmentos de unión a antígeno de los mismos. El término "B7-H4" se refiere al inhibidor de la activación de células T 1 que contiene el dominio V (VTCN1), también conocido como homólogo homólogo B7 4, B7h.5, proteína inmunocostimuladora B7-H4, proteína B7S1 o molécula costimuladora de células T B7x). La secuencia de la B7-H4 humana se proporciona en la SEQ ID NO:161. La secuencia de la B7-H4 murina se proporciona en la SEQ ID NO:162. El término B7-H4 abarca el B7-H4 recombinante y/o un fragmento del mismo. El término también incluye B7-H4, o un

fragmento del mismo acoplado a, por ejemplo, Fc de ratón o humano, etiqueta de histidina, y/o una secuencia de señal. El término puede abarcar además una proteína de fusión que comprende B7-H4.

[00243] En realizaciones, el anticuerpo anti-B7-H4 o el fragmento de unión a antígeno del mismo, o la proteína de fusión que comprende un anticuerpo anti-B7-H4, o los fragmentos de unión a antígeno del mismo, se une específicamente a B7-H4 y antagoniza la inmunosupresión mediada por B7-H4. Los anticuerpos anti-B7-H4, y los fragmentos de unión a antígeno de los mismos, (y las proteínas de fusión que comprenden dichos anticuerpos anti-B7-H4 y fragmentos de unión a antígeno de los mismos) descritos en la presente memoria pueden interrumpir, inhibir o reducir la actividad biológica de B7-H4, incluidos los eventos secuencia abajo mediados por B7-H4. Los anticuerpos anti-B7-H4, y los fragmentos de unión a antígeno de los mismos, (y las proteínas de fusión que comprenden dichos anticuerpos anti-B7-H4 y fragmentos de unión a antígeno de los mismos) descritos en la presente memoria pueden presentar una o más de las siguientes características (a) unión a B7-H4 y bloqueo de los eventos de señalización secuencia abajo; (b) bloqueo de la unión de B7-H4 a su ligando afín; (c) aumento de la proliferación de células T; (d) aumento de la respuesta inmunitaria mediada por células T; (e) estimulación de la secreción de citoquinas; (f) reducción de la transducción de señales inhibitorias a través de B7-H4; y/o (g) eliminación de células tumorales. Los anticuerpos anti-B7-H4, y los fragmentos de unión a antígeno de los mismos, (y las proteínas de fusión que comprenden dichos anticuerpos anti-B7-H4 y los fragmentos de unión a antígeno de los mismos) divulgados descritos en la presente memoria presentan potentes actividades de unión e inhibición y son útiles para usos terapéuticos y de diagnóstico.

[00244] En un aspecto, la descripción proporciona anticuerpos, y fragmentos de unión a antígeno de los mismos, (y proteínas de fusión que comprenden dichos anticuerpos anti-B7-H4 y fragmentos de unión a antígeno de los mismos), que se unen a B7-H4. En ciertas realizaciones, la descripción proporciona anticuerpos biespecíficos y proteínas de unión que se unen específicamente a B7-H4 y al menos a otra molécula.

[00245] En un aspecto, se proporciona un anticuerpo anti-B7-H4, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, en donde el anticuerpo, o el fragmento de unión a antígeno del mismo, comprende una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera, en donde cada una de las regiones variables de cadena pesada y de cadena ligera comprende una CDR1, CDR2 y CDR3.

[00246] En la presente memoria se proporciona un anticuerpo anti-B7-H4, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, en donde CDR1H comprende SEQ ID NO:16, CDR2H comprende SEQ ID NO:17, CDR3H comprende SEQ ID NO:18, CDR1L comprende SEQ ID NO:73, CDR2L comprende SEQ ID NO:74, y CDR3L comprende SEQ ID NO:75.

[00247] En la presente memoria se proporciona un anticuerpo anti-B7-H4, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, en donde CDR1H comprende SEQ ID NO:16, CDR2H comprende SEQ ID NO:17, CDR3H comprende SEQ ID NO:18, CDR1L comprende SEQ ID NO:20, CDR2L comprende SEQ ID NO:21, y CDR3L comprende SEQ ID NO:22.

[00248] En la presente memoria se proporciona un anticuerpo anti-B7-H4, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, en donde CDR1H comprende SEQ ID NO:16, CDR2H comprende SEQ ID NO:17, CDR3H comprende SEQ ID NO:18, CDR1L comprende SEQ ID NO:66, CDR2L comprende SEQ ID NO:67, y CDR3L comprende SEQ ID NO:68.

[00249] En la presente memoria se proporciona un anticuerpo anti-B7-H4, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, en donde CDR1H comprende SEQ ID NO:16, CDR2H comprende SEQ ID NO:17, CDR3H comprende SEQ ID NO:18, CDR1L comprende SEQ ID NO:70, CDR2L comprende SEQ ID NO:71, y CDR3L comprende SEQ ID NO:72.

[00250] En la presente memoria se proporciona un anticuerpo anti-B7-H4, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, en donde CDR1H comprende SEQ ID NO:16, CDR2H comprende SEQ ID NO:17, CDR3H comprende SEQ ID NO:18, CDR1L comprende SEQ ID NO: 84, CDR2L comprende SEQ ID NO:85, y CDR3L comprende SEQ ID NO:86.

[00251] En la presente memoria se proporciona un anticuerpo anti-B7-H4, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, en donde CDR1H comprende SEQ ID NO:16, CDR2H comprende SEQ ID NO:17, CDR3H comprende SEQ ID NO:18, CDR1L comprende SEQ ID NO: 8, CDR2L comprende SEQ ID NO: 9, y CDR3L comprende SEQ ID NO:10.

[00252] En la presente memoria se proporciona un anticuerpo anti-B7-H4, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, en donde CDR1H comprende SEQ ID NO:16, CDR2H comprende SEQ ID NO:17, CDR3H comprende SEQ ID NO:18, CDR1L comprende SEQ ID NO: 77, CDR2L comprende SEQ ID NO: 78, y CDR3L comprende SEQ ID NO: 79.

[00253] En la presente memoria se proporciona un anticuerpo anti-B7-H4, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, en donde CDR1H comprende SEQ ID NO:16, CDR2H comprende SEQ ID NO:17, CDR3H comprende SEQ ID NO:18, CDR1L comprende SEQ ID NO: 81, CDR2L comprende SEQ ID NO:82, y CDR3L comprende SEQ ID NO:83.

[00254] En la presente memoria se proporciona un anticuerpo anti-B7-H4, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, en donde CDR1H comprende SEQ ID NO:16, CDR2H comprende SEQ ID NO:17, CDR3H comprende SEQ ID NO:18, CDR1L comprende SEQ ID NO:70, CDR2L comprende SEQ ID NO:71, y CDR3L comprende SEQ ID NO:72.

[00255] En la presente memoria se proporciona un anticuerpo anti-B7-H4, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, en donde CDR1H comprende SEQ ID NO:172, CDR2H comprende SEQ ID NO:173, CDR3H comprende SEQ ID NO:174, CDR1L comprende SEQ ID NO:175, CDR2L comprende SEQ ID NO:176, y CDR3L comprende SEQ ID NO:177.

[00256] En la presente memoria se proporciona un anticuerpo anti-B7-H4, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, en donde CDR1H comprende SEQ ID NO:178, CDR2H comprende SEQ ID NO:179, CDR3H comprende SEQ ID NO:180, CDR1L comprende SEQ ID NO:181, CDR2L comprende SEQ ID NO:182, y CDR3L comprende SEQ ID NO:183.

[00257] En la presente memoria se proporciona un anticuerpo anti-B7-H4, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, en donde CDR1H comprende SEQ ID NO:184, CDR2H comprende SEQ ID NO:185, CDR3H comprende SEQ ID NO:186, CDR1L comprende SEQ ID NO:187, CDR2L comprende SEQ ID NO:188, y CDR3L comprende SEQ ID NO:189.

[00258] En la presente memoria se proporciona un anticuerpo anti-B7-H4, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, en donde la región variable de la cadena pesada comprende SEQ ID NO: 15, o una secuencia que es al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, o al menos 99 % idéntica a SEQ ID NO: 15; y donde la región variable de la cadena ligera comprende SEQ ID NO: x, o una secuencia que es al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, o al menos 99 % idéntica a SEQ ID NO: 19.

[00259] En la presente memoria se proporciona un anticuerpo anti-B7-H4, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, en donde la región variable de la cadena pesada comprende SEQ ID NO: 15, o una secuencia que es al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, o al menos 99 % idéntica a SEQ ID NO: 15; y en donde la región variable de la cadena ligera comprende SEQ ID NO: 65, o una secuencia que es al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, o al menos 99 % idéntica a SEQ ID NO: 65.

[00260] En la presente memoria se proporciona un anticuerpo anti-B7-H4, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, en donde la región variable de la cadena pesada comprende SEQ ID NO: 15, o una secuencia que es al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al

menos 97 %, al menos 98 %, o al menos 99 % idéntica a SEQ ID NO: 15; y en donde la región variable de la cadena ligera comprende SEQ ID NO: 69, o una secuencia que es al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, o al menos 99 % idéntica a SEQ ID NO: 69.

[00261] Se proporciona un anticuerpo anti-B7-H4, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, en donde la región variable de la cadena pesada comprende la SEQ ID NO: 3, o una secuencia que es al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, o al menos el 99 % idéntica a la SEQ ID NO: 3 y donde la región variable de la cadena ligera comprende la SEQ ID NO: 7, o una secuencia que es al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, o al menos 99 % idéntica a la SEQ ID NO: 7.

[00262] Se proporciona un anticuerpo anti-B7-H4, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, en donde la región variable de la cadena pesada comprende la SEQ ID NO: 3, o una secuencia que es al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, o al menos el 99 % idéntica a la SEQ ID NO: 3 y donde la región variable de la cadena ligera comprende la SEQ ID NO: 76, o una secuencia que es al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, o al menos 99 % idéntica a la SEQ ID NO: 76.

[00263] Se proporciona un anticuerpo anti-B7-H4, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, en donde la región variable de la cadena pesada comprende SEQ ID NO: 3, o una secuencia que es al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, o al menos 99 % idéntica a SEQ ID NO: 3 y donde la región variable de la cadena ligera comprende la SEQ ID NO: 80, o una secuencia que es al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, o al menos 99 % idéntica a la SEQ ID NO: 80.

[00264] En la presente memoria se proporciona un anticuerpo anti-B7-H4, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, en donde la región variable de la cadena pesada comprende la SEQ ID NO: 15 y en donde la región variable de la cadena ligera comprende la SEQ ID NO: 19.

[00265] En la presente memoria se proporciona un anticuerpo anti-B7-H4, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, en donde la región variable de la cadena pesada comprende la SEQ ID NO: 15 y en donde la región variable de la cadena ligera comprende la SEQ ID NO: 65.

[00266] En la presente memoria se proporciona un anticuerpo anti-B7-H4, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, en donde la región variable de la cadena pesada comprende la SEQ ID NO: 15 y en donde la región variable de la cadena ligera comprende la SEQ ID NO: 69.

[00267] En la presente memoria se proporciona un anticuerpo anti-B7-H4, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, en donde la región variable de la cadena pesada comprende la SEQ ID NO: 3 y en donde la región variable de la cadena ligera comprende la SEQ ID NO: 7.

[00268] En la presente memoria se proporciona un anticuerpo anti-B7-H4, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, en donde la región variable de la cadena pesada comprende la SEQ ID NO: 3 y en donde la región variable de la cadena ligera comprende la SEQ ID NO: 76.

[00269] En la presente memoria se proporciona un anticuerpo anti-B7-H4, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, en donde la región variable de la cadena pesada comprende la SEQ ID NO: 3 y en donde la región variable de la cadena ligera comprende la SEQ ID NO: 80.

[00270] En un aspecto, se proporciona un anticuerpo anti-B7-H4, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, en donde el anticuerpo, o el fragmento de unión a antígeno del mismo, comprende una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera, en donde cada una de las regiones variables de cadena pesada y de cadena ligera comprende una CDR1, CDR2 y CDR3.

[00271] En la presente memoria se proporciona un anticuerpo anti-B7-H4, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, en donde la CDR1H comprende la SEQ ID NO:46, la CDR2H comprende la SEQ ID NO:47, la CDR3H comprende la SEQ ID NO:48, la CDR1L comprende la SEQ ID NO:111, la CDR2L comprende la SEQ ID NO:112, y la CDR3L comprende la SEQ ID NO:113.

[00272] En la presente memoria se proporciona un anticuerpo anti-B7-H4, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, en donde la CDR1H comprende la SEQ ID NO:46, la CDR2H comprende la SEQ ID NO:47, la CDR3H comprende la SEQ ID NO:48, la CDR1L comprende la SEQ ID NO:50, la CDR2L comprende la SEQ ID NO:51, y la CDR3L comprende la SEQ ID NO:52.

[00273] En la presente memoria se proporciona un anticuerpo anti-B7-H4, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, en donde la CDR1H comprende la SEQ ID NO:46, la CDR2H comprende la SEQ ID NO:47, la CDR3H comprende la SEQ ID NO:48, la CDR1L

comprende la SEQ ID NO:88, la CDR2L comprende la SEQ ID NO:89, y la CDR3L comprende la SEQ ID NO:90.

[00274] En la presente memoria se proporciona un anticuerpo anti-B7-H4, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, en donde la CDR1H comprende la SEQ ID NO:46, la CDR2H comprende la SEQ ID NO:47, la CDR3H comprende la SEQ ID NO:48, la CDR1L comprende la SEQ ID NO:92, la CDR2L comprende la SEQ ID NO:93, y la CDR3L comprende la SEQ ID NO:94.

[00275] En la presente memoria se proporciona un anticuerpo anti-B7-H4, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, en donde la CDR1H comprende la SEQ ID NO:46, la CDR2H comprende la SEQ ID NO:47, la CDR3H comprende la SEQ ID NO:48, la CDR1L comprende la SEQ ID NO:96, la CDR2L comprende la SEQ ID NO:97, y la CDR3L comprende la SEQ ID NO:98.

[00276] En la presente memoria se proporciona un anticuerpo anti-B7-H4, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, en donde la CDR1H comprende la SEQ ID NO:46, la CDR2H comprende la SEQ ID NO:47, la CDR3H comprende la SEQ ID NO:48, la CDR1L comprende la SEQ ID NO:100, la CDR2L comprende la SEQ ID NO:101, y la CDR3L comprende la SEQ ID NO:102.

[00277] En la presente memoria se proporciona un anticuerpo anti-B7-H4, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, en donde la CDR1H comprende la SEQ ID NO:46, la CDR2H comprende la SEQ ID NO:47, la CDR3H comprende la SEQ ID NO:48, la CDR1L comprende la SEQ ID NO:104, la CDR2L comprende la SEQ ID NO:105, y la CDR3L comprende la SEQ ID NO:106.

[00278] En la presente memoria se proporciona un anticuerpo anti-B7-H4, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, en donde la CDR1H comprende la SEQ ID NO:46, la CDR2H comprende la SEQ ID NO:47, la CDR3H comprende la SEQ ID NO:48, la CDR1L comprende la SEQ ID NO:108, la CDR2L comprende la SEQ ID NO:109, y la CDR3L comprende la SEQ ID NO:110.

[00279] En la presente memoria se proporciona un anticuerpo anti-B7-H4, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, en donde la región variable de la cadena pesada comprende SEQ ID NO:45, o una secuencia que es al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, o al menos 99 % idéntica a SEQ ID NO:45 y en donde la región variable de la cadena ligera comprende SEQ ID NO:49, o una secuencia que es al menos

90 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, o al menos 99 % idéntica a SEQ ID NO:49.

[00280] En la presente memoria se proporciona un anticuerpo anti-B7-H4, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, en donde la región variable de la cadena pesada comprende SEQ ID NO:45, o una secuencia que es al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, o al menos 99 % idéntica a SEQ ID NO:45 y donde la región variable de la cadena ligera comprende SEQ ID NO:87, o una secuencia que es al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, o al menos 99 % idéntica a SEQ ID NO:87.

[00281] En la presente memoria se proporciona un anticuerpo anti-B7-H4, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, en donde la región variable de la cadena pesada comprende SEQ ID NO:45, o una secuencia que es al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, o al menos 99 % idéntica a SEQ ID NO:45 y donde la región variable de la cadena ligera comprende SEQ ID NO:91, o una secuencia que es al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, o al menos 99 % idéntica a SEQ ID NO:91.

[00282] En la presente memoria se proporciona un anticuerpo anti-B7-H4, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, en donde la región variable de la cadena pesada comprende SEQ ID NO:45, o una secuencia que es al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, o al menos 99 % idéntica a SEQ ID NO:45 y donde la región variable de la cadena ligera comprende SEQ ID NO:95, o una secuencia que es al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, o al menos 99 % idéntica a SEQ ID NO:95.

[00283] En la presente memoria se proporciona un anticuerpo anti-B7-H4, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, en donde la región variable de la cadena pesada comprende SEQ ID NO:45, o una secuencia que es al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, o al menos 99 % idéntica a SEQ ID NO:45 y donde la región variable de la cadena ligera comprende SEQ ID NO:99, o una secuencia que es al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, o al menos 99 % idéntica a SEQ ID NO:99.

[00284] En la presente memoria se proporciona un anticuerpo anti-B7-H4, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, en donde la región variable de la cadena pesada comprende SEQ ID NO:45, o una secuencia que es al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al

menos 97 %, al menos 98 %, o al menos 99 % idéntica a SEQ ID NO:45 y donde la región variable de la cadena ligera comprende SEQ ID NO:103, o una secuencia que es al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, o al menos 99 % idéntica a SEQ ID NO:103.

[00285] En la presente memoria se proporciona un anticuerpo anti-B7-H4, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, en donde la región variable de la cadena pesada comprende SEQ ID NO:45, o una secuencia que es al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, o al menos 99 % idéntica a SEQ ID NO:45 y donde la región variable de la cadena ligera comprende SEQ ID NO:107, o una secuencia que es al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, o al menos 99 % idéntica a SEQ ID NO:107.

[00286] En la presente memoria se proporciona un anticuerpo anti-B7-H4, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, en donde la región variable de la cadena pesada comprende la SEQ ID NO: 45 y en donde la región variable de la cadena ligera comprende la SEQ ID NO:49.

[00287] En la presente memoria se proporciona un anticuerpo anti-B7-H4, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, en donde la región variable de la cadena pesada comprende la SEQ ID NO: 45 y en donde la región variable de la cadena ligera comprende la SEQ ID NO:87.

[00288] En la presente memoria se proporciona un anticuerpo anti-B7-H4, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, en donde la región variable de la cadena pesada comprende la SEQ ID NO: 45 y en donde la región variable de la cadena ligera comprende la SEQ ID NO:91.

[00289] En la presente memoria se proporciona un anticuerpo anti-B7-H4, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, en donde la región variable de la cadena pesada comprende la SEQ ID NO: 45 y en donde la región variable de la cadena ligera comprende la SEQ ID NO:95.

[00290] En la presente memoria se proporciona un anticuerpo anti-B7-H4, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, en donde la región variable de la cadena pesada comprende la SEQ ID NO: 45 y en donde la región variable de la cadena ligera comprende la SEQ ID NO:99.

[00291] En la presente memoria se proporciona un anticuerpo anti-B7-H4, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, en donde la región variable de la cadena pesada comprende la

SEQ ID NO: 45 y en donde la región variable de la cadena ligera comprende la SEQ ID NO:103.

[00292] En la presente memoria se proporciona un anticuerpo anti-B7-H4, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, en donde la región variable de la cadena pesada comprende la SEQ ID NO: 45 y en donde la región variable de la cadena ligera comprende la SEQ ID NO:107.

[00293] En un aspecto, se proporciona un anticuerpo anti-B7-H4, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, en donde el anticuerpo, o el fragmento de unión a antígeno del mismo, comprende una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera, en donde cada una de las regiones variables de cadena pesada y de cadena ligera comprende una CDR1, CDR2 y CDR3.

[00294] En la presente memoria se proporciona un anticuerpo anti-B7-H4, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, en donde CDR1H comprende SEQ ID NO:58, CDR2H comprende SEQ ID NO:59, CDR3H comprende SEQ ID NO:60, y en donde CDR1L comprende SEQ ID NO:134, CDR2L comprende SEQ ID NO:135, y CDR3L comprende SEQ ID NO:136.

[00295] En la presente memoria se proporciona un anticuerpo anti-B7-H4, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, en donde CDR1H comprende SEQ ID NO:58, CDR2H comprende SEQ ID NO:59, CDR3H comprende SEQ ID NO:60, y en donde CDR1L comprende SEQ ID NO:62, CDR2L comprende SEQ ID NO:63, y CDR3L comprende SEQ ID NO:64.

[00296] En la presente memoria se proporciona un anticuerpo anti-B7-H4, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, en donde CDR1H comprende SEQ ID NO:58, CDR2H comprende SEQ ID NO:59, CDR3H comprende SEQ ID NO:60, y en donde CDR1L comprende SEQ ID NO:115, CDR2L comprende SEQ ID NO:116, y CDR3L comprende SEQ ID NO:117.

[00297] En la presente memoria se proporciona un anticuerpo anti-B7-H4, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, en donde CDR1H comprende SEQ ID NO:58, CDR2H comprende SEQ ID NO:59, CDR3H comprende SEQ ID NO:60, y en donde CDR1L comprende SEQ ID NO:119, CDR2L comprende SEQ ID NO:120, y CDR3L comprende SEQ ID NO:121.

[00298] En la presente memoria se proporciona un anticuerpo anti-B7-H4, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, en donde CDR1H comprende SEQ ID NO:58, CDR2H

comprende SEQ ID NO:59, CDR3H comprende SEQ ID NO:60, y en donde CDR1L comprende SEQ ID NO:123, CDR2L comprende SEQ ID NO:124, y CDR3L comprende SEQ ID NO:125.

[00299] En la presente memoria se proporciona un anticuerpo anti-B7-H4, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, en donde CDR1H comprende SEQ ID NO:58, CDR2H comprende SEQ ID NO:59, CDR3H comprende SEQ ID NO:60, y en donde CDR1L comprende SEQ ID NO:127, CDR2L comprende SEQ ID NO:128, y CDR3L comprende SEQ ID NO:129.

[00300] En la presente memoria se proporciona un anticuerpo anti-B7-H4, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, en donde CDR1H comprende SEQ ID NO:58, CDR2H comprende SEQ ID NO:59, CDR3H comprende SEQ ID NO:60, y en donde CDR1L comprende SEQ ID NO:131, CDR2L comprende SEQ ID NO:132, y CDR3L comprende SEQ ID NO:133.

[00301] En la presente memoria se proporciona un anticuerpo anti-B7-H4, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, en donde la región variable de la cadena pesada comprende SEQ ID NO:57, o una secuencia que es al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, o al menos 99 % idéntica a SEQ ID NO:57 y donde la región variable de la cadena ligera comprende SEQ ID NO:61, o una secuencia que es al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, o al menos 99 % idéntica a SEQ ID NO:61.

[00302] En la presente memoria se proporciona un anticuerpo anti-B7-H4, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, en donde la región variable de la cadena pesada comprende SEQ ID NO:57, o una secuencia que es al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, o al menos el 99 % idéntica a SEQ ID NO:57 y donde la región variable de la cadena ligera comprende SEQ ID NO:114, o una secuencia que es al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, o al menos 99 % idéntica a SEQ ID NO:114.

[00303] En la presente memoria se proporciona un anticuerpo anti-B7-H4, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, en donde la región variable de la cadena pesada comprende SEQ ID NO:57, o una secuencia que es al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, o al menos 99 % idéntica a SEQ ID NO:57 y donde la región variable de la cadena ligera comprende SEQ ID NO:118, o una secuencia que es al menos

90 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, o al menos 99 % idéntica a SEQ ID NO:118.

[00304] En la presente memoria se proporciona un anticuerpo anti-B7-H4, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, en donde la región variable de la cadena pesada comprende SEQ ID NO:57, o una secuencia que es al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, o al menos 99 % idéntica a SEQ ID NO:57 y donde la región variable de la cadena ligera comprende SEQ ID NO:122, o una secuencia que es al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, o al menos 99 % idéntica a SEQ ID NO:122.

[00305] En la presente memoria se proporciona un anticuerpo anti-B7-H4, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, en donde la región variable de la cadena pesada comprende SEQ ID NO:57, o una secuencia que es al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, o al menos 99 % idéntica a SEQ ID NO:57 y donde la región variable de la cadena ligera comprende SEQ ID NO:126, o una secuencia que es al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, o al menos 99 % idéntica a SEQ ID NO:126. o

[00306] En la presente memoria se proporciona un anticuerpo anti-B7-H4, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, en donde la región variable de la cadena pesada comprende SEQ ID NO:57, o una secuencia que es al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, o al menos 99 % idéntica a SEQ ID NO:57 y donde la región variable de la cadena ligera comprende SEQ ID NO:130, o una secuencia que es al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, o al menos 99 % idéntica a SEQ ID NO:130.

[00307] En la presente memoria se proporciona un anticuerpo anti-B7-H4, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, en donde la región variable de la cadena pesada comprende la SEQ ID NO:57 y en donde la región variable de la cadena ligera comprende la SEQ ID NO:61.

[00308] En la presente memoria se proporciona un anticuerpo anti-B7-H4, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, en donde la región variable de la cadena pesada comprende la SEQ ID NO:57 y en donde la región variable de la cadena ligera comprende la SEQ ID NO:114.

[00309] En la presente memoria se proporciona un anticuerpo anti-B7-H4, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, en donde la región variable de la cadena pesada comprende la

SEQ ID NO:57 y en donde la región variable de la cadena ligera comprende la SEQ ID NO:118.

[00310] En la presente memoria se proporciona un anticuerpo anti-B7-H4, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, en donde la región variable de la cadena pesada comprende la SEQ ID NO:57 y en donde la región variable de la cadena ligera comprende la SEQ ID NO:122.

[00311] En la presente memoria se proporciona un anticuerpo anti-B7-H4, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, en donde la región variable de la cadena pesada comprende la SEQ ID NO:57 y en donde la región variable de la cadena ligera comprende la SEQ ID NO:126.

[00312] En la presente memoria se proporciona un anticuerpo anti-B7-H4, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, en donde la región variable de la cadena pesada comprende la SEQ ID NO:57 y en donde la región variable de la cadena ligera comprende la SEQ ID NO:130.

[00313] Las Tablas 5, 7, 9, 16-20 y 24 muestran las regiones variables de las cadenas pesada y ligera y las CDR asociadas de los anticuerpos descritos en la presente memoria, al igual que el listado de secuencias adjunto, que se incorpora por referencia en su totalidad. Como se muestra en los Ejemplos más adelante, la transposición de la cadena ligera de los anticuerpos anti-B7-H4 condujo a la identificación de variantes de anticuerpos que conferían mejoras sustanciales en la afinidad de unión a B7-H4. El análisis de las variantes reveló ciertas posiciones de CDR en las que los aminoácidos permanecieron relativamente inalterados entre los anticuerpos transpuestos de cadena ligera y otras posiciones de CDR en las que se podía introducir una variación sin abolir la unión de B7-H4.

[00314] Los anticuerpos anti-B7-H4, y los fragmentos de unión a antígeno de los mismos, descritos en la presente memoria y las proteínas de fusión descritas en la presente memoria pueden tener una o más sustituciones, supresiones, inserciones y/o adiciones de aminoácidos. En algunas realizaciones, uno o más residuos CDR o más o más residuos del marco de los anticuerpos anti-B7-H4 o fragmentos de unión a antígeno (o las proteínas de fusión que comprenden los anticuerpos anti-B7-H4 o fragmentos de unión a antígeno) descritos en la presente memoria han sido cambiados por sustitución de aminoácidos, supresión, inserción y/o adición. Las sustituciones de aminoácidos pueden ser sustituciones conservadoras o no conservadoras. La presente descripción también incluye anticuerpos anti-B7-H4, y fragmentos de unión a antígeno de los mismos, (y proteínas de fusión que comprenden los

anticuerpos anti-B7-H4 o fragmentos de unión a antígeno de los mismos), que se derivan de las secuencias de aminoácidos descritas en la presente memoria, en los que uno o más aminoácidos dentro de una o más regiones marco y/o CDR están mutados al residuo o residuos correspondientes de la secuencia de línea germinal de la que se derivó el anticuerpo, o al residuo o residuos correspondientes de otra secuencia de línea germinal humana, o a una sustitución conservadora de aminoácidos del residuo o residuos de línea germinal correspondientes (dichos cambios de secuencia se denominan en la presente memoria colectivamente "mutaciones de línea germinal"). En ciertas realizaciones, los anticuerpos anti-B7-H4 o los fragmentos de unión a los mismos (o las proteínas de fusión que comprenden los anticuerpos anti-B7-H4 o los fragmentos de unión a antígenos) comprenden una o más CDR, o uno o más dominios variables con una secuencia de aminoácidos al menos del 85 %, al menos del 90 %, al menos del 95 %, al menos del 97 %, al menos del 98 %, o al menos del 99 %, idéntica a las secuencias de CDR y/o de dominio variable expuestas en **las Tablas 5, 7, 9, 16-20, o 24.**

[00315] También se proporcionan en la presente memoria secuencias variables de cadena pesada y cadena ligera (así como emparejamientos de las mismas) que son similares, pero no idénticas a las cadenas pesadas variables y cadenas ligeras variables descritas en **las Tablas 16-20** (y emparejamientos de las mismas). Será evidente que cualquiera de los marcos descritos en la presente memoria puede utilizarse en combinación con cualquiera de las CDR y motivos de CDR descritos en la presente memoria. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-B7-H4, o el fragmento de unión a antígeno del mismo, utiliza un marco descrito en **las Tablas 16-20.**

[00316] También se proporciona en la presente memoria un receptor de antígeno quimérico (CAR) que comprende uno, dos, tres, cuatro, cinco o seis CDR de los anticuerpos anti-B7-H4 y fragmentos de unión a antígeno divulgados en la presente memoria. También se proporciona en la presente memoria un CAR que comprende las seis CDR de cualquiera de los anticuerpos anti-B7-H4 y fragmentos de unión a antígeno divulgados en la presente memoria.

[00317] Se describe una célula inmunitaria que expresa un CAR que comprende uno, dos, tres, cuatro, cinco o seis CDR de los anticuerpos anti-B7-H4 y fragmentos de unión a antígeno divulgados en la presente memoria. Se divulga una célula inmunitaria que expresa un CAR que comprende las seis CDR de cualquiera de los anticuerpos anti-B7-H4 y

fragmentos de unión a antígeno divulgados en la presente memoria. En algunas realizaciones, la célula inmunitaria es una célula T.

[00318] "Identidad" se refiere al número o porcentaje de posiciones idénticas compartidas por dos secuencias de aminoácidos o ácidos nucleicos en secuencias óptimamente alineadas después de considerar el número de huecos y la longitud de cada hueco que fueron necesarios para la alineación óptima. "Sustancialmente idéntica" se refiere a una secuencia de aminoácidos que difiere de la secuencia original sólo por sustituciones conservadoras de aminoácidos, que no destruyen la función de la proteína.

[00319] También se divulgan en la presente memoria anticuerpos anti-B7-H4 o fragmentos de unión a antígeno de los mismos o proteínas de fusión que comprenden una secuencia de aminoácidos que es al menos el 80 %, o al menos el 85 %, o al menos el 90 %, o al menos el 95 %, o al menos el 98 %, o al menos el 99 % idéntica a una secuencia de aminoácidos descrita en la presente memoria. Los métodos y programas informáticos para determinar la similitud de secuencias están disponibles públicamente, que incluye, pero sin limitarse a, el paquete de programas GCG (Devereux et al., Nucleic Acids Research 12: 387, 1984), BLASTP, BLASTN, FASTA (Altschul et al., J. Mol. Biol. 215:403 (1990), y el programa ALIGN (versión 2.0). También se puede utilizar el algoritmo de Smith Waterman para determinar la similitud. El programa BLAST está disponible públicamente en el NCBI y otras fuentes (BLAST Manual, Altschul, et al., NCBI NLM NIH, Bethesda, Md. 20894; BLAST 2.0 en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>). Al comparar las secuencias, estos métodos tienen en cuenta diversas sustituciones, eliminaciones y otras modificaciones.

[00320] En algunas realizaciones de los aspectos descritos en la presente memoria, se contempla la modificación de la secuencia de aminoácidos de los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos que se unen a B7-H4 o de las proteínas de fusión que se unen a B7-H4 descritas en la presente memoria. Las variantes de la secuencia de aminoácidos del anticuerpo anti-B7-H4, o del fragmento de unión a antígeno del mismo, o de las proteínas de fusión se preparan introduciendo cambios nucleotídicos apropiados en el ácido nucleico que codifica el anticuerpo anti-B7-H4, o el fragmento de unión a antígeno del mismo, o la proteína de fusión, o mediante síntesis de péptidos. Dichas modificaciones incluyen, por ejemplo, supresiones y/o inserciones y/o sustituciones de residuos dentro de las secuencias de aminoácidos del anticuerpo o del fragmento de unión a antígeno del mismo. Se realiza cualquier combinación de supresión, inserción y sustitución para llegar a la construcción

final, si ésta posee las características deseadas, por ejemplo, especificidad de unión, inhibición de la actividad biológica.

[00321] Las sustituciones de aminoácidos pueden realizarse, en algunos casos, seleccionando sustituciones que no difieran significativamente en su efecto sobre el mantenimiento de (a) la estructura de la espina dorsal del péptido en la zona de la sustitución, (b) la carga o la hidrofobicidad de la molécula en el lugar de destino; o (c) el volumen de la cadena lateral (variante de sustitución de aminoácidos conservadora. Estas variantes tienen al menos un residuo de aminoácido en el anticuerpo, o en el fragmento de unión a antígeno del mismo, o en la proteína de fusión, sustituido por un residuo diferente que tiene propiedades de cadena lateral similares. Los aminoácidos pueden agruparse según las similitudes en las propiedades de sus cadenas laterales (véase Lehninger, BIOCHEMISTRY (2ª ed., Worth Publishers, Nueva York, 1975):

(1) no polares: Ala (A), Val (V), Leu (L), Ile (I), Pro (P), Phe (F), Trp (W), Met (M);

(2) polares sin carga: Gly (G), Ser (S), Thr (T), Cys (C), Tyr (Y), Asn (N), Gln (Q);

(3) ácido: Asp (D), Glu (E);

(4) básico: Lys (K), Arg (R), His (H).

[00322] Como tal, un ejemplo no limitante para una sustitución conservadora de aminoácidos es aquella que reemplaza un aminoácido no polar con otro aminoácido no polar.

[00323] Alternativamente, los residuos naturales pueden dividirse en grupos basados en las propiedades comunes de las cadenas laterales:

(1) hidrófobo: Ala (A), Val (V), Leu (L), Ile (I), Met (M);

(2) hidrófilo neutro: Ser (S), Thr (T), Cys (C), Asn (N), Gln (Q);

(3) ácido: Asp (D), Glu (E);

(4) básico: Lys (K), Arg (R), His (H);

(5) residuos que influyen en la orientación de la cadena: Gly (G), Pro (P);

(6) aromático: Phe (F), Trp (W), Tyr (Y).

[00324] Las sustituciones realizadas dentro de estos grupos pueden considerarse sustituciones conservadoras. Ejemplos de sustituciones no limitantes incluyen, la sustitución de valina por alanina, lisina por arginina, glutamina por asparagina, ácido glutámico por ácido aspártico, serina por cisteína, asparagina por glutamina, ácido aspártico por ácido glutámico, prolina por glicina, arginina por histidina, leucina por isoleucina, isoleucina por leucina, arginina por lisina, leucina por metionina, leucina por fenilalanina, glicina por

prolina, treonina por serina, serina por treonina, tirosina por triptófano, fenilalanina por tirosina y/o leucina por valina.

[00325] También se contemplan las inserciones de secuencias de aminoácidos, que pueden incluir fusiones amino y/o carboxilo-terminales cuya longitud oscila entre un residuo y polipéptidos que contienen un centenar o más de residuos, así como inserciones intrasequencia de uno o varios residuos de aminoácidos.

[00326] Los ejemplos de fusiones terminales incluyen un anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, con un residuo de metionilo terminal N o un anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, fusionado a un polipéptido citotóxico (o proteínas de fusión que comprenden dicho anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo). Otros ejemplos de fusiones terminales del anticuerpo, o del fragmento de unión a antígeno del mismo, incluyen la fusión al terminal N o terminal C del anticuerpo, o del fragmento de unión a antígeno del mismo, a una enzima o a un polipéptido que aumenta la vida media en suero del anticuerpo o del fragmento de unión a antígeno del mismo, como, por ejemplo, la biotina (o proteínas de fusión que comprenden dicho anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo).

[00327] En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-B7-H4, o el fragmento de unión a antígeno del mismo, (o una proteína de fusión que comprende dicho anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo), comprende una modificación (incluyendo pero no limitándose a una modificación o sustitución de aminoácidos) que aumenta la afinidad del anticuerpo anti-B7-H4, o el fragmento de unión a antígeno del mismo, (o una proteína de fusión que comprende dicho anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo) con el FcRn. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-B7-H4, o fragmento de unión a antígeno del mismo, (o una proteína de fusión que comprende dicho anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo) comprende una sustitución de aminoácidos M428L (numeración de índice Kabat EU). En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-B7-H4, o el fragmento de unión a antígeno del mismo, (o una proteína de fusión que comprende dicho anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo) comprende una sustitución de aminoácidos N434S (numeración del índice EU de Kabat). En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-B7-H4, o el fragmento de unión a antígeno del mismo, (o una proteína de fusión que comprende dicho anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo) comprende una sustitución de aminoácidos M428L y N434S (numeración del índice EU de Kabat).

[00328] Cualquier residuo de cisteína que no participe en el mantenimiento de la conformación adecuada de los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos que se unen a B7-H4 también puede sustituirse, por ejemplo, por una serina o una alanina, para mejorar la estabilidad oxidativa de la molécula y evitar la reticulación aberrante.

[00329] A la inversa, pueden añadirse enlaces de cisteína al anticuerpo anti-B7-H4, o al fragmento de unión a antígeno del mismo, para mejorar su estabilidad (particularmente cuando el anticuerpo anti-B7-H4, o el fragmento de unión a antígeno del mismo, es un fragmento de anticuerpo como un fragmento Fv).

[00330] En algunas realizaciones, los anticuerpos anti-B7-H4, o los fragmentos de unión a antígeno de los mismos descritos en la presente memoria (o la proteína de fusión que comprende los anticuerpos anti-B7-H4, o los fragmentos de unión a antígeno de los mismos descritos en la presente memoria) tienen alteraciones de aminoácidos que alteran el patrón de glicosilación original del anticuerpo anti-B7-H4 o del fragmento de unión a antígeno del mismo. Por "alteración del patrón de glicosilación original" se entiende la supresión de uno o más fracciones de carbohidratos que se encuentran en el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo, y/o la adición de uno o más sitios de glicosilación que no están presentes en el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo. La glicosilación de los anticuerpos suele ser de tipo ligado a N o ligado a O. Ligado a N se refiere a la unión de la fracción de carbohidrato a la cadena lateral de un residuo de asparagina. Las secuencias tripéptidas asparagina-X-serina y asparagina-X-treonina, en las que X es cualquier aminoácido excepto la prolina, son las secuencias de reconocimiento para la unión enzimática de la fracción de carbohidrato a la cadena lateral de la asparagina. Así, la presencia de cualquiera de estas secuencias tripéptidas en un polipéptido crea un sitio potencial de glicosilación. La glucosilación ligada a O se refiere a la unión de uno de los azúcares N-aceilgalactosamina, galactosa o xilosa a un hidroxiaminoácido, más comúnmente serina o treonina, aunque también se puede utilizar 5-hidroxiprolina o 5-hidroxilisina. La alteración también puede realizarse mediante la adición de, o la sustitución por, uno o más residuos de serina o treonina en la secuencia del anticuerpo original, o del fragmento de unión a antígeno del mismo, (para sitios de glucosilación ligados a O).

[00331] En algunas realizaciones, los anticuerpos anti-B7-H4, o los fragmentos de unión a antígeno de los mismos, descritos en la presente memoria (o la proteína de fusión que comprende los anticuerpos anti-B7-H4, o los fragmentos de unión a antígeno de los mismos descritos en la presente memoria) pueden incluir una modificación, que incluye, pero sin

limitarse a la glicosilación, acetilación, pegilación, fosforilación, amidación, derivación por grupos protectores/bloqueantes conocidos, escisión proteolítica, unión a un ligando celular u otra proteína, etc. El proceso de realizar modificaciones químicas es conocido en la técnica, y puede incluir, pero no se limita a, la escisión química específica, acetilación, formilación, síntesis metabólica de tunicamicina, etc. Además, las moléculas pueden contener uno o más aminoácidos no clásicos.

[00332] Los anticuerpos anti-B7-H4, y los fragmentos de unión a antígeno de los mismos, descritos en la presente memoria pueden incluir anticuerpos anti-B7-H4, y fragmentos de unión a antígeno de los mismos, cuyas características de unión han sido alteradas por mutación directa, maduración de afinidad, visualización de fagos o transposición de cadenas. La afinidad y la especificidad pueden alterarse mediante la mutación de las CDR y el cribado de las CDR con las características deseadas. Los métodos de mutagénesis son conocidos por los expertos en la materia.

[00333] Unión de anticuerpos y proteínas de fusión

[00334] También se proporcionan aquí (i) anticuerpos anti-B7-H4, y fragmentos de unión a antígeno de los mismos, y (ii) proteínas de fusión que comprenden anticuerpos anti-B7-H4, o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, que se unen al mismo epítipo en B7-H4 que uno de los anticuerpos anti-B7-H4 o fragmentos de unión a antígeno de los mismos descritos en la presente memoria.

[00335] En algunas realizaciones, el (i) anticuerpo anti-B7-H4, y el fragmento de unión a antígeno del mismo, o (ii) la proteína de fusión que comprende un anticuerpo anti-B7-H4, o el fragmento de unión a antígeno del mismo, se une al dominio IgV de B7-H4. El dominio IgV está relacionado con el dominio variable de una inmunoglobulina. El dominio IgC del B7-H4 de humano y de murino se indica en **la Tabla 23** (véanse los SEQ ID NOs:162 y 162).

[00336] En algunas realizaciones, el (i) anticuerpo anti-B7-H4, y el fragmento de unión a antígeno del mismo, o (ii) la proteína de fusión que comprende un anticuerpo anti-B7-H4, o el fragmento de unión a antígeno del mismo, se une al dominio IgC de B7-H4. El dominio IgC está relacionado con el dominio constante de una inmunoglobulina. El dominio IgC del B7-H4 de humano y de murino se indica en **la Tabla 23** (véanse los SEQ ID NOs:162 y 162).

[00337] En algunas realizaciones, el (i) anticuerpo anti-B7-H4, y el fragmento de unión a antígeno del mismo, o (ii) la proteína de fusión que comprende un anticuerpo anti-B7-H4, o

el fragmento de unión a antígeno del mismo, se une al dominio IgV y al dominio IgC de B7-H4.

[00338] En algunas realizaciones, el (i) anticuerpo anti-B7-H4, y el fragmento de unión a antígeno del mismo, o (ii) la proteína de fusión que comprende un anticuerpo anti-B7-H4, o el fragmento de unión a antígeno del mismo, se une a B7-H4 murino o a un dominio del mismo. En algunas realizaciones, el (i) anticuerpo anti-B7-H4, y su fragmento de unión a antígeno, o (ii) la proteína de fusión que comprende un anticuerpo anti-B7-H4, o su fragmento de unión a antígeno, se une a B7-H4 de humano o a un dominio del mismo. En algunas realizaciones, el (i) anticuerpo anti-B7-H4, y su fragmento de unión a antígeno, o (ii) la proteína de fusión que comprende un anticuerpo anti-B7-H4, o su fragmento de unión a antígeno, se une a B7-H4 murino y humano o a un dominio del mismo.

[00339] Tal como se utiliza en la presente memoria, la "unión" de un anticuerpo o de un fragmento de unión a antígeno del mismo, o de una proteína de fusión que comprenda un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo, a B7-H4, a un epítipo de B7-H4 o, en ciertas realizaciones descritas a continuación, a residuos particulares de B7-H4, incluye la interacción selectiva del anticuerpo, o del fragmento de unión a antígeno del mismo, con B7-H4. La unión, por tanto, incluye, por ejemplo, interacciones primarias y secundarias que incluyen enlaces de hidrógeno, interacciones iónicas, puentes de sal, así como interacciones hidrofílicas e hidrofóbicas.

[00340] En ciertas realizaciones, los anticuerpos anti-B7-H4 o fragmentos de unión a antígeno de los mismos (o las proteínas de fusión que comprenden dichos anticuerpos anti-B7-H4 o fragmentos de unión a antígeno de los mismos) descritos en la presente memoria se unen a B7-H4 con una constante de equilibrio para la disociación (K_D) de 10^{-2} a 10^{-13} mol/l, 10^{-3} a 10^{-13} mol/l, 10^{-4} a 10^{-13} mol/l, 10^{-5} a 10^{-13} mol/l, 10^{-6} a 10^{-13} mol/l, 10^{-7} a 10^{-13} mol/l, 10^{-8} a 10^{-13} mol/l, 10^{-9} a 10^{-13} mol/l, 10^{-10} a 10^{-13} mol/l, 10^{-12} a 10^{-13} mol/l. En algunas realizaciones, los anticuerpos anti-B7-H4 o los fragmentos de unión a antígeno de los mismos (o las proteínas de fusión que comprenden dichos anticuerpos anti-B7-H4 o fragmentos de unión a antígeno de los mismos) descritos en la presente memoria se unen a B7-H4 con una K_D de 10^{-2} a 10^{-9} mol/l, 10^{-3} a 10^{-9} mol/l, 10^{-4} a 10^{-9} mol/l, 10^{-5} a 10^{-9} mol/l, 10^{-6} a 10^{-9} mol/l, 10^{-7} a 10^{-9} mol/l, 10^{-8} a 10^{-9} mol/l, 10^{-10} a 10^{-11} mol/l, 10^{-11} a 10^{-12} mol/l, 10^{-12} a 10^{-13} mol/l, or 10^{-12} a 10^{-14} mol/l. En una realización, los anticuerpos anti-B7-H4 o los fragmentos de unión a antígeno de los mismos (o las proteínas de fusión que comprenden dichos anticuerpos anti-

B7-H4 o fragmentos de unión a antígeno de los mismos) descritos en la presente memoria se unen a B7-H4 con un K_D de 10^{-9} a 10^{-13} mol/l.

[00341] Tal como se emplea en la presente memoria, la "afinidad", representada por la K_D de un antígeno con una proteína de unión a antígeno, es una medida de la fuerza de unión entre un determinante antigénico y un sitio de unión a antígeno en la proteína de unión a antígeno, como un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo del mismo. El valor de K_D es inversamente proporcional a la fuerza de unión entre un determinante antigénico y la molécula de unión al antígeno. Alternativamente, la afinidad también puede expresarse como la constante de asociación (K_A), que es $1/K_D$). La afinidad puede determinarse de una manera conocida per se, dependiendo del antígeno específico de interés por un experto en la materia.

[00342] El término "especificidad" se refiere aquí a la capacidad de un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo, como un anticuerpo anti-B7-H4 o fragmento de unión a antígeno del mismo, para reconocer un epítopo dentro de B7-H4, mientras que sólo tiene poca o ninguna reactividad detectable con otras porciones de B7-H4. La especificidad puede determinarse relativamente mediante ensayos de competencia o mediante técnicas de identificación/caracterización de epítopos descritas en la presente memoria o sus equivalentes conocidos en la técnica.

[00343] El término "epítopo" se refiere aquí a la diana específica a la que se une un anticuerpo. Los epítopos pueden estar formados tanto por un tramo contiguo de aminoácidos (epítopos continuos) como por una disposición tridimensional de residuos de aminoácidos que sólo existe cuando la proteína diana está plegada en una conformación particular (epítopos discontinuos). En general, un epítopo comprende al menos 3 aminoácidos, al menos 4, al menos 5 o aproximadamente 7-10 aminoácidos.

[00344] Se describen en la presente memoria anticuerpos anti-B7-H4 y fragmentos de unión a antígeno de los mismos, así como proteínas de fusión que comprenden un anticuerpo anti-B7-H4 o un fragmento de unión a antígeno del mismo, que se unen específicamente al mismo epítopo que el anticuerpo anti-B7-H4 38B2. También se divulgan en la presente memoria anticuerpos anti-B7-H4, y fragmentos de unión a antígeno de los mismos, así como proteínas de fusión que comprenden un anticuerpo anti-B7-H4, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, que se unen al mismo epítopo que el anticuerpo anti-B7-H4 31B1.

[00345] Como se utiliza en la presente memoria, un anticuerpo "bloqueador" o un anticuerpo "antagonista" es aquel que inhibe o reduce la actividad biológica del antígeno al que se une. Por ejemplo, en algunas realizaciones, un anticuerpo antagonista de B7-H4, o un

fragmento de unión a antígeno del mismo, se une a B7-H4 e inhibe la actividad de B7-H4 y/o la unión de B7-H4 a su(s) pareja(s) de unión. La inhibición de la actividad y la inhibición de la unión incluyen la inhibición parcial. Los métodos para la identificación de anticuerpos contra B7-H4 que bloquean las interacciones de B7-H4 se describen en la presente memoria y son conocidos por los expertos en la materia. Por ejemplo, los anticuerpos competidores, de bloqueo decruce y de bloqueo cruzado pueden identificarse utilizando cualquier método adecuado conocido en la técnica, incluidos los ensayos ELISA de competición o BIACORE® en los que la unión del anticuerpo competidor o de bloqueo de cruce a B7-H4 de humano impide la unión de un anticuerpo descrito en la presente memoria o viceversa.

[00346] En ciertas realizaciones, no todas las CDR participan directamente en la unión al antígeno. En una realización, cuatro de las seis CDR del anticuerpo anti-B7-H4, o fragmento de unión a antígeno del mismo, hacen contacto con el antígeno. En una realización, cinco de las seis CDR del anticuerpo anti-B7-H4, o fragmento de unión a antígeno del mismo, hacen contacto con el antígeno. En una realización, seis de las seis CDR del anticuerpo anti-B7-H4, o del fragmento de unión a antígeno del mismo, entran en contacto con el antígeno.

[00347] Los términos "selectivo" y "selectividad" se refieren aquí a la unión preferente de un anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, (es *decir*, un anticuerpo B7-H4 o fragmento de unión a antígeno del mismo), para una región, diana o péptido particular; típicamente una región o epítipo en B7-H4, en oposición a una o más moléculas biológicas, incluyendo otros miembros de la familia B7-H4.

[00348] En un aspecto, se proporcionan anticuerpos anti-B7-H4, y fragmentos de unión a antígeno de los mismos, que se unen específicamente a al menos parte del sitio de unión en B7-H4, al bloquear así las interacciones de B7-H4 con uno o más ligandos de B7-H4.

[00349] En ciertas realizaciones, el anticuerpo anti-B7-H4, o el fragmento de unión a antígeno del mismo, según la descripción, comprende un dominio Fc, compuesto por una primera y una segunda subunidad. El dominio Fc de un anticuerpo consiste en un par de cadenas polipeptídicas que comprenden dominios de cadena pesada de una molécula de inmunoglobulina. Las dos subunidades del dominio Fc forman una asociación estable. En algunas realizaciones, las dos subunidades del dominio Fc son idénticas. En otras realizaciones, las dos subunidades del dominio Fc no son idénticas. En las realizaciones, una subunidad del dominio Fc puede estar fusionada con una molécula de inmunoconjugado. En las realizaciones, el dominio Fc del anticuerpo puede ser un dominio Fc IgG, un dominio Fc

IgG₁, un dominio Fc IgG₂, un dominio Fc IgG₃, un dominio Fc IgG₄. En otra realización particular, el dominio Fc es un dominio Fc humano.

[00350] Modificaciones del dominio Fc que promueven la heterodimerización

[00351] También se contemplan modificaciones en el dominio Fc de los anticuerpos anti-B7-H4 descritos, o fragmentos de unión a antígeno, que promueven la dimerización. Una modificación puede ser una sustitución de aminoácidos, inserción, supresión o cualquier otra modificación química o física. En las realizaciones, el dominio Fc del anticuerpo anti-B7-H4, o fragmento de unión a antígeno del mismo, comprende una modificación que promueve la asociación de la primera y la segunda subunidad del dominio Fc. En una realización, dicha modificación se encuentra en el dominio CH3 del dominio Fc. En una realización específica, dicha modificación que promueve la asociación de la primera y la segunda subunidad del dominio Fc es una modificación denominada "botón en ojal", que comprende una modificación "botón" en una de las dos subunidades del dominio Fc y una modificación "ojal" en la otra de las dos subunidades del dominio Fc.

[00352] Las modificaciones "botón en ojal" son una estrategia de "protuberancia-en-cavidad", que sirve para diseñar una interfaz entre un primer y un segundo polipéptido para la hetero-oligomerización. Las "protuberancias" (es decir, los botones) se construyen sustituyendo las pequeñas cadenas laterales de aminoácidos de la interfaz del primer polipéptido por cadenas laterales más grandes. Las "cavidades" compensatorias (es decir, *los ojales*) de tamaño idéntico o similar a las protuberancias se crean opcionalmente en la interfaz del segundo polipéptido sustituyendo las cadenas laterales de aminoácidos grandes por otras más pequeñas. En una realización particular, un residuo de aminoácido en el dominio CH3 de la primera subunidad Fc se sustituye por un residuo de aminoácido que tiene un volumen de cadena lateral más grande, generando así un botón dentro del dominio CH3 de la primera subunidad Fc que es posicionable en un ojal presente dentro del dominio CH3 de la segunda subunidad Fc, generado mediante la sustitución de un residuo de aminoácido por un residuo de aminoácido que tiene un volumen de cadena lateral más pequeño en el dominio CH3 de la segunda subunidad Fc. Preferiblemente, dicho residuo de aminoácido que tiene un volumen de cadena lateral mayor se selecciona del grupo que consiste en cisteína (C), valina (V), alanina (A), fenilalanina (F), tirosina (Y), leucina (L), lisina (K), prolina (P), ácido glutámico (E) y triptófano (W). Preferentemente, dicho residuo de aminoácido que tiene un menor volumen de cadena lateral se selecciona del grupo formado por alanina (A), serina (S),

treonina (T), arginina (R), triptófano (W), cisteína (C), lisina (L), ácido glutámico (E), ácido aspártico (D) y valina (V).

[00353] Las mutaciones correspondientes al botón y al ojal pueden realizarse alterando el ácido nucleico que codifica los polipéptidos, por ejemplo, mediante mutagénesis de sitio específico, o mediante síntesis de péptidos.

[00354] En las realizaciones de la proteína de fusión, en las que sólo una cadena pesada está unida a sushi IL-15/Sushi IL-15R α , los dominios Fc del anticuerpo anti-B7-H4, o el fragmento de unión a antígeno del mismo, pueden comprender una o más sustituciones de aminoácidos que promuevan la formación de heterodímeros (es decir, la asociación la fusión de la cadena pesada con una cadena pesada que carece de la fusión). En las realizaciones, un residuo de aminoácido en el dominio CH3 de una cadena pesada (CH3-1) comprende una sustitución de aminoácido que reemplaza un aminoácido con un residuo de aminoácido que tiene un volumen de cadena lateral más grande, generando así un "botón" dentro del dominio CH3, que es posicionable en un "ojal" presente dentro del dominio CH3 de la otra cadena pesada (CH3-2), generado al reemplazar un residuo de aminoácido con un residuo de aminoácido que tiene un volumen de cadena lateral más pequeño.

[00355] En la presente memoria se proporciona un anticuerpo anti-B7-H4, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, (o una proteína de fusión que comprende dicho anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo), en donde:

- (a) en donde la primera región constante de la cadena pesada comprende una o más sustituciones de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en S354C, T366W, Y349C, T366S, L368A e Y407V (numeración del índice EU de Kabat) y en donde la segunda región constante de la cadena pesada comprende una o más sustituciones de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en S354C, T366W, Y349C, T366S, L368A e Y407V (numeración del índice EU de Kabat);
- (b) la primera región constante de la cadena pesada comprende una o más sustituciones de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en S354C y T366W (numeración del índice EU de Kabat) y la segunda región constante de la cadena pesada comprende una o más sustituciones de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en Y349C, T366S, L368A e Y407V (numeración del índice EU de Kabat);
- (c) la segunda región constante de la cadena pesada comprende una o más sustituciones de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en S354C y

- T366W (numeración del índice EU de Kabat) y la primera región constante de la cadena pesada comprende una o más sustituciones de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en Y349C, T366S, L368A e Y407V (numeración del índice EU de Kabat);
- (d) la primera región constante de la cadena pesada comprende las sustituciones de aminoácidos S354C y T366W (numeración del índice EU de Kabat) y la segunda región constante de la cadena pesada comprende las sustituciones de aminoácidos Y349C, T366S, L368A e Y407V (numeración del índice EU de Kabat); o
 - (e) la segunda región constante de la cadena pesada comprende las sustituciones de aminoácidos S354C y T366W (numeración del índice EU de Kabat) y la primera región constante de la cadena pesada comprende las sustituciones de aminoácidos Y349C, T366S, L368A e Y407V (numeración del índice EU de Kabat).

[0100] En la presente memoria se proporciona un anticuerpo anti-B7-H4, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, (o una proteína de fusión que comprende dicho anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo), en donde el anticuerpo, o el fragmento de unión a antígeno del mismo, comprende una cadena pesada que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOS:147-160 y/o una porción que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOS:147-160.

[00356] Enlazadores

[00357] En las realizaciones, las proteínas de fusión proporcionadas en la presente memoria pueden comprender uno o más enlazadores que unen componentes de las proteínas de fusión descritas en la presente memoria. Un enlazador puede estar situado (i) entre el polipéptido de IL-15 y el polipéptido de IL15R α que comprende el dominio sushi; (ii) entre una cadena pesada del anticuerpo anti-B7-H4, o fragmento de unión a antígeno del mismo, y el polipéptido de IL-15 o el polipéptido de IL15R α que comprende el dominio sushi; o (iii) ambos. En las realizaciones de la descripción, el polipéptido de IL-15 y el polipéptido de IL15R α que comprende el dominio sushi están unidos o enlazados por una primera secuencia de aminoácidos enlazadora. En las realizaciones, el polipéptido IL15R α está enlazado a un anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, descrito en la presente memoria por una segunda secuencia de aminoácidos enlazadora. El primer y el segundo enlazador pueden tener las mismas o diferentes secuencias de aminoácidos.

[00358] Las secuencias de aminoácidos enlazadores descritas en la presente memoria pueden tener una longitud suficiente para garantizar que la proteína de fusión forme estructuras secundarias y terciarias adecuadas. La longitud del aminoácido enlazador puede ser de entre 5 y 40 aminoácidos, preferiblemente de 10 a 40 aminoácidos, más preferiblemente de 15 a 40 aminoácidos, aún más preferiblemente de 20 a 40 aminoácidos, más preferiblemente de 25 a 35 aminoácidos.

[00359] Preferentemente, las secuencias enlazadoras comprenden aminoácidos casi neutros seleccionados en el grupo que comprende Gly (G), Asn (N), Ser (S), Thr (T), Ala (A), Leu (L), y Gln (Q), más preferentemente en aminoácidos seleccionados del grupo que comprende Gly (G), Asn (N), y Ser (S). Preferiblemente, las secuencias enlazadoras son ricas en glicina y serina, y en algunas realizaciones, el enlazador contiene sólo residuos de serina y glicina.

[00360] En algunas realizaciones, el enlazador comprende una porción del polipéptido IL15R α fuera del dominio sushi, que incluye, pero sin limitarse a la secuencia de SEQ ID NO:171 (IRDPALVHQRPAAPP). En algunas realizaciones, el enlazador comprende la SEQ ID NO:168 (SGGSGGGGSGGGGSLQ). En algunas realizaciones, el enlazador comprende SEQ ID NO:171 y SEQ ID NO:168. En algunas realizaciones, el enlazador comprende SEQ ID NO:170.

[00361] En algunas realizaciones, las cadenas pesadas y ligeras del anticuerpo anti-B7-H4, o el fragmento de unión a antígeno del mismo, descrito en la presente memoria, pueden conectarse en una única cadena polipeptídica (un "Fv de cadena única" o "scFv") utilizando un tercer enlazador que permite que los dominios VR y VL se asocien para formar un sitio de unión a antígeno. La secuencia de aminoácidos de los enlazadores puede ser la misma o diferente.

[00362] En una realización, un polipéptido de IL-15 o un derivado de IL-15 está unido covalentemente a un polipéptido de Sushi IL-15R α o a un derivado de Sushi IL-15R α por un enlazador.

[00363] En algunas realizaciones, un polipéptido de IL-15 o un derivado de IL-15 está unido covalentemente a un polipéptido de Sushi IL-15R α o a un derivado de Sushi IL-15R α por un primer enlazador y el polipéptido de IL-15 o el derivado de IL-15 o el polipéptido de Sushi IL-15R α o el derivado de Sushi IL-15R α está unido covalentemente a un anticuerpo anti-B7-H4, o a un fragmento de unión a antígeno del mismo, por un segundo enlazador. En algunas realizaciones, las secuencias de aminoácidos del primer y segundo enlazador son

idénticas. En otras realizaciones, las secuencias de aminoácidos del primer y del segundo enlazador son diferentes.

[00364] Conjugados

[00365] Los anticuerpos anti-B7-H4, los fragmentos de unión a antígeno de los mismos y las proteínas de fusión que se describen en la presente memoria pueden comprender además una o más moléculas funcionales. Los ejemplos de fracciones funcionales útiles incluyen, pero no se limitan a, una fracción de bloqueo, una fracción detectable, una fracción de diagnóstico, una fracción de orientación y una fracción terapéutica.

[00366] Una fracción de bloqueo puede incluir fracciones de suficiente volumen estérico y/o carga para reducir la glicosilación, por ejemplo, al bloquear la capacidad de una glicosidasa para glicosilar el anticuerpo o el fragmento de unión al antígeno. Las fracciones de bloqueo preferidas incluyen aductos de cisteína, como la cisteína, aductos de disulfuro mixto o enlaces de disulfuro, y moléculas de PEG, como el polietilenglicol ("PEG"), el polipropilenglicol ("PPG"), el glicerol polioxietilado ("POG") y otros polioles polioxietilados, el alcohol polivinílico ("PVA") y otros óxidos de polialquileno, el sorbitol polioxietilado o la glucosa polioxietilada. El PEG es una fracción preferida en las aplicaciones biológicas por varias razones. La pegilación puede mejorar el rendimiento farmacocinético de una molécula al aumentar su peso molecular aparente. El aumento del peso molecular aparente reduce la tasa de eliminación del organismo tras la administración subcutánea o sistémica. En muchos casos, la pegilación puede disminuir la antigenicidad y la inmunogenicidad. La pegilación también puede aumentar la solubilidad de una molécula biológicamente activa. Además, el PEG suele ser transparente, incoloro, inodoro, soluble en agua, estable al calor, inerte a muchos agentes químicos, no se hidroliza y no es tóxico, lo que lo convierte en una opción preferible para aplicaciones biológicas.

[00367] Los ejemplos de fracciones detectables que pueden conjugarse con el anticuerpo anti-B7-H4 o los fragmentos de unión a antígeno o las fusiones divulgadas en la presente memoria pueden incluir fracciones o etiquetas fluorescentes, agentes de formación de imágenes, fracciones radioisotópicas, moléculas radiopacas y similares, por ejemplo, etiquetas detectables como biotina, fluoróforos, cromóforos, sondas de resonancia de espín o radiomarcadores. Los ejemplos de fluoróforos incluyen tintes fluorescentes (por ejemplo, fluoresceína, rodamina y similares) y otras moléculas luminiscentes (por ejemplo, luminal). Un fluoróforo puede ser sensible al medio ambiente, de manera que su fluorescencia cambia

si se localiza cerca de uno o más residuos en la proteína modificada que sufren cambios estructurales al unirse a un sustrato (por ejemplo, sondas de dansilo). Los radiomarcadores ejemplares incluyen pequeñas moléculas que contienen átomos con uno o más núcleos de baja sensibilidad (^{13}C , ^{15}N , ^2H , ^{125}I , ^{123}I , ^{99}Tc , ^{43}K , ^{52}Fe , ^{67}Ga , ^{68}Ga , ^{111}In y similares).

[00368] Las fracciones de diagnóstico incluyen fracciones detectables adecuadas para revelar la presencia de una enfermedad o trastorno. Típicamente, una fracción de diagnóstico permite determinar la presencia, la ausencia o los niveles de una molécula, por ejemplo, un péptido, una proteína o unas proteínas diana, que se asocian con una enfermedad o un trastorno. Tales diagnósticos también son adecuados para pronosticar y/o diagnosticar una enfermedad o trastorno y su progresión.

[00369] Entre los ejemplos de moléculas terapéuticas se encuentran los agentes antiinflamatorios, los agentes anticancerígenos, los agentes antineurodegenerativos, los agentes antiinfecciosos o, en general, una terapéutica. La fracción funcional también puede tener una o más de las funciones mencionadas anteriormente. Las fracciones terapéuticas ejemplares pueden incluir un antibiótico, un segundo anticuerpo anti-B7-H4 o un anticuerpo contra otro antígeno, como un antígeno específico de un tumor, un antígeno de un tejido autoinmunitario, un antígeno de una célula infectada por un virus, un receptor Fc, un receptor de células T o un co-inhibidor de células T, o una inmunotoxina, o cualquier otra fracción terapéutica útil para tratar una enfermedad o afección, como el cáncer, una enfermedad autoinmune o una infección viral crónica. Las fracciones terapéuticas ejemplares también pueden ser citotoxinas, agentes radiactivos, citocinas, interferones, dianas o fracciones informadoras, enzimas, toxinas, péptidos o agentes terapéuticos en cualquier punto de la molécula, siempre que puedan unirse a su objetivo. Entre los ejemplos de inmunoconjugados se encuentran los conjugados anticuerpo-fármaco y las proteínas de fusión anticuerpo-toxina. En ciertas realizaciones, el anticuerpo puede conjugarse con un agente específico para una célula tumoral o una célula infectada por un virus.

[00370] Un epítipo de unión al receptor de salvamento como el descrito, por ejemplo, en la Patente de EE. UU. No. 5,739,277 también puede unirse al anticuerpo, o al fragmento de unión a antígeno del mismo, (especialmente un fragmento de anticuerpo) para aumentar la vida media de los anticuerpos o de los fragmentos de unión a antígeno descritos en la presente memoria. El término "epítipo de unión al receptor de rescate" puede referirse a un epítipo de la región Fc de una molécula IgG (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4) que es

responsable de aumentar la semivida sérica *in vivo* de la molécula IgG (por ejemplo, Ghetie et al., 18 Ann. Rev. Immunol. 739 (2000)).

[00371] Ácidos nucleicos

[00372] También se proporcionan aquí ácidos nucleicos que codifican anticuerpos anti-B7-H4, fragmentos de unión a antígeno de los mismos y proteínas de fusión descritas en la presente memoria, así como vectores, células huésped y sistemas de expresión. El término "ácido nucleico", tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere a una forma polimérica de nucleótidos de cualquier longitud, ya sean ribonucleótidos o desoxirribonucleótidos, e incluye, pero no se limita a, ADN o ARN monocatenario, bicatenario o multcatenario, ADN genómico, ADNc, híbridos de ADN-ARN, o un polímero que comprende bases de purina y pirimidina, u otras bases nucleotídicas naturales, modificadas química o bioquímicamente, no naturales o derivadas. Los ácidos nucleicos que codifican los anticuerpos anti-B7-H4, y los fragmentos de unión a antígeno de los mismos, y las proteínas de fusión que se divulgan describen en la presente memoria pueden ser, por ejemplo, ADN, ADNc, ARN, ADN o ARN producidos sintéticamente, o una molécula de ácido nucleico quimérico producida recombinantemente que comprenda cualquiera de esos polinucleótidos solos o en combinación.

[00373] El término "vector" se refiere a un vehículo que comprende una molécula de ácido nucleico que es capaz de transportar la molécula de ácido nucleico a una célula. Un "vector" incluye, pero no se limita a, un vector viral, un plásmido, un vector de ARN o una molécula de ADN o ARN lineal o circular, que puede consistir en un ácido nucleico cromosómico, no cromosómico, semisintético o sintético. En algunas realizaciones, los vectores empleados son aquellos capaces de replicarse de forma autónoma (vector episomal) y/o de expresar los ácidos nucleicos a los que están unidos (vectores de expresión). Un número de vectores adecuados son conocidos por los expertos en la materia y están disponibles comercialmente.

[00374] En la presente memoria se proporciona un ácido nucleico o un conjunto de ácidos nucleicos que codifican un anticuerpo, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, divulgado en las Tablas 1, 5, 7, 9, 16-20 o 24. **En la presente memoria se proporciona un ácido nucleico o un conjunto** de ácidos nucleicos que codifican una proteína de fusión divulgada en las **Tablas 13, 21 o 22.**

[00375] En la presente memoria se proporciona un ácido nucleico que codifica una secuencia VH descrita en **las Tablas 16-21.** En la presente memoria se proporciona un ácido

nucleico que codifica una secuencia VL descrita en las **Tablas 16-21**. El presente documento es un ácido nucleico que codifica una secuencia HC descrita en las **Tablas 21-22**. En la presente memoria se proporciona un ácido nucleico que codifica una secuencia LC descrita en las **Tablas 21-22**.

[00376] En la presente memoria se proporciona un vector o un conjunto de vectores que comprenden una o más secuencias de ácido nucleico descritas en la presente memoria.

[00377] En la presente memoria se proporciona una célula que comprende un vector o un conjunto de vectores descritos en la presente memoria. En algunas realizaciones, la célula es una célula inmune. En algunas realizaciones, la célula es una célula de mamífero. En algunas realizaciones, la célula es una célula humana. En algunas realizaciones, la célula es una célula aislada.

[00378] Sistemas de preparación y expresión de anticuerpos y proteínas de fusión

[00379] Los anticuerpos anti-B7-H4, los fragmentos de unión a antígenos o las proteínas de fusión descritos en la presente memoria se producen típicamente por expresión recombinante. Los ácidos nucleicos que codifican las regiones variables de las cadenas ligera y pesada, opcionalmente enlazadas a regiones constantes, pueden insertarse en los mismos vectores de expresión. Alternativamente, los ácidos nucleicos que codifican las regiones variables de cadena ligera y pesada, opcionalmente enlazadas a regiones constantes, se insertan en vectores de expresión diferentes. El vector de expresión puede comprender además una o más secuencias de control de la expresión, que incluyen, pero no se limitan a, promotores (por ejemplo, promotores homólogos o heterólogos), secuencias de señal, elementos potenciadores y secuencias de terminación de la transcripción. Preferiblemente, las secuencias de control de la expresión son sistemas promotores eucariotas en vectores capaces de transformar o transfectar células huésped eucariotas. Típicamente, el huésped se mantiene en condiciones adecuadas para la expresión de alto nivel de las secuencias de nucleótidos, y la recolección y purificación de los anticuerpos de reacción cruzada tras la incorporación del vector al huésped apropiado.

[00380] Normalmente, los vectores de expresión contienen marcadores de selección (por ejemplo, resistencia a la ampicilina, a la higromicina, a la tetraciclina o a la neomicina) para permitir la detección de las células transformadas con las secuencias de ADN deseadas.

[00381] El hospedador utilizado para expresar los anticuerpos anti-B7-H4, los fragmentos de unión a antígeno de los mismos o las proteínas de fusión descritos en la presente memoria

puede ser un hospedador procariota o eucariota. Los ejemplos de hospedadores adecuados incluyen hospedadores bacterianos o eucariotas, incluyendo células de levadura, insectos, hongos, aves y mamíferos *in vivo*, o *in situ*, o células hospedadoras de origen mamífero, insecto, ave o levadura. La célula o tejido de mamífero puede ser de origen humano, de primate, de hámster, de conejo, de roedor, de vaca, de cerdo, de oveja, de caballo, de cabra, de perro o de gato, pero puede utilizarse cualquier otra célula de mamífero.

[00382] Ejemplos de hospedadores bacterianos que pueden utilizarse para expresar los anticuerpos, los fragmentos de unión a antígeno o la proteína de fusión descrita en la presente memoria pueden ser *E. coli*, bacilos, como *Bacillus subtilis*, y otras enterobacterias, como *Salmonella*, *Serratia* y diversas especies de *Pseudomonas*.

[00383] Las levaduras también pueden utilizarse como huéspedes para expresar los anticuerpos, los fragmentos de unión a antígenos o la proteína de fusión descrita en la presente memoria. *Saccharomyces* y *Pichia* son huéspedes de levadura ejemplares, con vectores adecuados que tienen secuencias de control de la expresión (por ejemplo, promotores), un origen de replicación, secuencias de terminación y similares, según se desee. Los promotores típicos incluyen la 3-fosfoglicerato quinasa y otras enzimas glicolíticas. Los promotores inducibles de la levadura incluyen, entre otros, los promotores de alcohol deshidrogenasa, el isocitocromo C y las enzimas responsables de la utilización del metanol, la maltosa y la galactosa.

[00384] Las células de mamífero en cultivo también pueden utilizarse como células huésped para expresar los anticuerpos, los fragmentos de unión a antígenos o las proteínas de fusión descritas en la presente memoria. Ejemplos de estirpes celulares huésped adecuadas capaces de secretar proteínas heterólogas (por ejemplo, inmunoglobulinas intactas) que son bien conocidas en la técnica, incluyen estirpes celulares CHO, varias estirpes celulares COS, células HeLa, células 293, estirpes celulares de mieloma, células B transformadas e hibridomas. Los vectores de expresión para estas células pueden incluir secuencias de control de la expresión, como un origen de replicación, un promotor, un potenciador y los sitios de información de procesamiento necesarios, como el sitio de unión al ribosoma, el sitio de empalme del ARN y/o las secuencias de terminación transcripcional. Algunos ejemplos de secuencias de control de la expresión son el SV40, el adenovirus, el virus del papiloma bovino, el citomegalovirus y otros similares.

[00385] Los anticuerpos anti-B7-H4, los fragmentos de unión a antígeno de los mismos y las proteínas de fusión descritas en la presente memoria pueden expresarse utilizando un

único constructo o vector de expresión o múltiples constructos o vectores de expresión (por ejemplo, dos o tres constructos de expresión). Cuando las cadenas pesadas y ligeras del anticuerpo se clonan en vectores de expresión separados, los vectores se co-transfectan para obtener la expresión y el ensamblaje de las inmunoglobulinas intactas. Una vez expresados, los anticuerpos enteros, sus dímeros, las cadenas ligeras y pesadas individuales, u otras formas de inmunoglobulina descritas en la presente memoria pueden purificarse según los procedimientos estándar de la técnica, incluyendo la precipitación con sulfato de amonio, columnas de afinidad, cromatografía en columna, purificación por HPLC, electroforesis en gel, y similares (véase generalmente Scopes, Protein Purification (Springer-Verlag, N.Y., (1982)). Se prefieren las inmunoglobulinas sustancialmente puras con una homogeneidad de al menos entre el 90 y el 95 %, y entre el 98 y el 99 % o más de homogeneidad, para usos farmacéuticos.

[00386] Los anticuerpos anti-B7-H4 descritos, los fragmentos de unión a antígeno y las proteínas de fusión pueden fabricarse por cualquier método conocido en la técnica. Las técnicas generales para generar anticuerpos humanos o de ratón o moléculas de fusión son conocidas en la técnica.

[00387] Métodos para modular la actividad de B7-H4

[00388] En un aspecto, se proporcionan métodos para utilizar los anticuerpos anti-B7-H4, los fragmentos de unión a antígeno de los mismos y las proteínas de fusión descritas en la presente memoria para disminuir la interacción entre B7-H4 y su ligando afín. Dicha disminución puede incluir la internalización del receptor tras la unión del anticuerpo o una reducción de la expresión del receptor en la célula diana.

[00389] En un aspecto, se proporcionan métodos de uso de los anticuerpos anti-B7-H4, los fragmentos de unión a antígeno de los mismos y las proteínas de fusión descritas en la presente memoria para disminuir la transducción de señales que se produce como consecuencia de la unión del receptor de B7-H4 con el cognado. Dicha disminución puede ser parcial (es decir, atenuar, pero no abolir, la actividad de B7-H4) o puede abolir completamente dicha actividad (por ejemplo, neutralizar la capacidad de B7-H4 para mediar en la transducción de señales). Dicha disminución puede incluir la internalización del receptor tras la unión del anticuerpo o una reducción de la expresión del receptor en la célula diana.

[00390] En un aspecto, se proporcionan métodos para utilizar los anticuerpos anti-B7-H4, los fragmentos de unión a antígeno de los mismos y las proteínas de fusión descritas en la presente memoria para reducir la inmunosupresión, por ejemplo, la tolerancia de las células T. La inmunosupresión puede estar mediada por los receptores inhibidores de la inmunidad expresados en la superficie de una célula inmunitaria, y sus interacciones con sus ligandos. Los métodos para medir la actividad de las células T son conocidos en la técnica. A modo de ejemplo no limitativo, la tolerancia de las células T puede inducirse poniendo en contacto las células T con antígeno de recojida, anti-CD3 en ausencia de coestimulación, y/o ionomicina. Los niveles de, por ejemplo, IL-27, LDH-A, RAB10 y/o ZAP70 (tanto intracelulares como secretados) pueden monitorizarse, por ejemplo, para determinar el grado de tolerogénesis de las células T (con niveles de IL-2, interferón- γ y TNF correlacionados con un aumento de la tolerancia de las células T).

[00391] En un aspecto, se proporcionan métodos para utilizar los anticuerpos anti-B7-H4, los fragmentos de unión a antígeno de los mismos y las proteínas de fusión descritas en la presente memoria para mejorar la expansión, activación y/o proliferación de las células T. Se proporcionan métodos de uso de los anticuerpos anti-B7-H4, los fragmentos de unión a antígeno de los mismos y las proteínas de fusión descritas en la presente memoria para mejorar la proliferación de células T CD8⁺. Se proporcionan métodos para utilizar los anticuerpos anti-B7-H4, los fragmentos de unión a antígeno de los mismos y las proteínas de fusión descritas en la presente memoria para mejorar la proliferación de células T CD4⁺.

[00392] En un aspecto, se proporcionan métodos para utilizar los anticuerpos anti-B7-H4, los fragmentos de unión a antígeno de los mismos y las proteínas de fusión descritas en la presente memoria para agotar las células tumorales que expresan B7-H4 o los macrófagos asociados a tumores (TAM) en un receptor humano o en un tejido humano (*in situ* o *ex vivo*). El agotamiento de las células tumorales o de los macrófagos asociados a tumores que son positivos para B7-H4 puede controlarse mediante inmunohistoquímica (IHC) de los tejidos tumorales utilizando los anticuerpos anti-B7-H4 descritos (u otro marcador específico de tumor o de macrófagos asociados a tumores), o una reducción de los niveles de ARNm de B7-H4 mediante PCR, hibridación *in situ* u otro método conocido por un experto en la materia.

[00393] En un aspecto, se proporcionan métodos para utilizar los anticuerpos anti-B7-H4, los fragmentos de unión a antígeno de los mismos y las proteínas de fusión descritas en la

presente memoria para inducir citotoxicidad mediada por células dependientes de anticuerpos (ADCC) en una célula que exprese B7-H4 en un sujeto que lo necesite.

[00394] Por "reducir" (o "disminuir") se entiende la capacidad de causar una disminución global de aproximadamente un 20 % o más, un 30 % o más, un 40 % o más, un 45 % o más, un 50 % o más, un 55 % o más, un 60 % o más, un 65 % o más, un 70 % o más, un 75 % o más, un 80 % o más, un 85 % o más, un 90 % o más, o un 95 % o más, en comparación con un control no tratado.

[00395] Las células a las que se dirigen los anticuerpos anti-B7-H4, los fragmentos de unión a antígeno de los mismos y las proteínas de fusión descritas en la presente memoria incluyen, pero no se limitan a, células que expresan B7-H4, por ejemplo, células transformadas que típicamente no expresan B7-H4 cuando no están transformadas, o células caracterizadas por una mayor expresión en comparación con las células de control. Las células diana preferidas incluyen las células cancerosas y los macrófagos asociados a tumores.

[00396] Métodos de tratamiento

[00397] En un aspecto, la descripción proporciona anticuerpos anti-B7-H4, fragmentos de unión a antígeno de los mismos y proteínas de fusión que son útiles para el tratamiento de sujetos que los necesitan.

[00398] En los métodos descritos en la presente memoria, se administra a un mamífero que lo necesite una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo anti-B7-H4, un fragmento de unión a antígeno del mismo o una proteína de fusión descrita en la presente memoria. El término "mamífero", tal como se utiliza en la presente memoria, incluye, pero no se limita a, seres humanos, animales de laboratorio, animales domésticos y animales de granja. Preferiblemente, el mamífero es un humano. El término "cantidad terapéuticamente eficaz", tal como se describe en la presente memoria, se refiere a una cantidad de un anticuerpo anti-B7-H4, un fragmento de unión a antígeno del mismo o una proteína de fusión que, cuando se administra a un mamífero, es eficaz para producir el efecto terapéutico deseado.

[00399] En algunas realizaciones, el "sujeto" es un mamífero. En la realización, el sujeto es un no primate (por ejemplo, vacas, cerdos, caballos, gatos, perros, ratas, ratones, etc.) o un primate (por ejemplo, mono y humano). Los individuos y los pacientes también son sujetos en la presente memoria.

[00400] Los términos "trata", "tratado", "tratar" o "tratamiento", tal y como se utilizan en este documento, se refieren al tratamiento terapéutico, en donde el objetivo es ralentizar (disminuir) una condición fisiológica, trastorno o enfermedad no deseada, u obtener resultados clínicos beneficiosos o deseados. A efectos de la presente descripción, los resultados clínicos beneficiosos o deseados incluyen, entre otros, el alivio de los síntomas; la disminución de la extensión de la afección, el trastorno o la enfermedad; la estabilización (es decir, el no empeoramiento) del estado de la afección, el trastorno o la enfermedad; el retraso en la aparición o la ralentización de la progresión de la afección, el trastorno o la enfermedad; la mejora de uno o más síntomas del estado de la afección, el trastorno o la enfermedad; y la remisión (ya sea parcial o total). El tratamiento incluye la obtención de una respuesta clínicamente significativa sin niveles excesivos de efectos secundarios. El tratamiento también incluye la prolongación de la supervivencia en comparación con la esperada si no se recibe el tratamiento.

[00401] Los términos "prevenir", "prevención" y similares se refieren a actuar antes de que aparezca la enfermedad o el trastorno, para evitar que se desarrolle la enfermedad o el trastorno o para minimizar la extensión de la enfermedad o el trastorno o ralentizar su desarrollo.

[00402] Los sujetos con probabilidad de beneficiarse del tratamiento con un anticuerpo anti-B7-H4 expresarán la proteína B7-H4 diana, ya sea en el tumor o en los TAM, y esto puede evaluarse mediante IHC de muestras tumorales, FACs, hibridación in situ u otro método conocido por un experto en la materia. En las realizaciones de estaño, el sujeto tiene una expresión regulada al alza de B7-H4.

[00403] En la presente memoria se proporciona un método para tratar el cáncer en un sujeto que lo necesita, el método comprende la administración al sujeto de una cantidad eficaz de un anticuerpo anti-B7-H4, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, o una proteína de fusión descrita en la presente memoria. Se proporciona un anticuerpo anti-B7-H4, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, o una proteína de fusión para su uso en el tratamiento del cáncer en un sujeto que lo necesite. En la presente memoria se proporciona el uso de un anticuerpo anti-B7-H4, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, o una proteína de fusión para su uso en el tratamiento del cáncer en un sujeto que lo necesita. En la presente memoria se proporciona un anticuerpo anti-B7-H4, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, o una proteína de fusión para la fabricación de un medicamento para el tratamiento del cáncer en un sujeto que lo necesita.

[00404] En la presente memoria se proporciona un método para reducir el crecimiento tumoral en un sujeto que lo necesita, el método comprende la administración al sujeto de una cantidad eficaz de un anticuerpo anti-B7-H4, o de un fragmento de unión a antígeno del mismo, o de una proteína de fusión descrita en la presente memoria. Se proporciona en la presente memoria un anticuerpo anti-B7-H4, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, o una proteína de fusión para su uso en la reducción del crecimiento tumoral en un sujeto que lo necesite. Se proporciona en la presente memoria el uso de un anticuerpo anti-B7-H4, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, o una proteína de fusión para su uso en la reducción del crecimiento tumoral en un sujeto que lo necesita. Se proporciona en la presente memoria un anticuerpo anti-B7-H4, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, o una proteína de fusión en la fabricación de un medicamento para reducir el crecimiento tumoral en un sujeto que lo necesita.

[00405] En la presente memoria se proporciona un método para reducir la metástasis tumoral en un sujeto que lo necesita, el método comprende la administración al sujeto de una cantidad eficaz de un anticuerpo anti-B7-H4, o de un fragmento de unión a antígeno del mismo, o de una proteína de fusión descrita en la presente memoria. Se proporciona un anticuerpo anti-B7-H4, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, o una proteína de fusión para su uso en la reducción de la metástasis tumoral en un sujeto que lo necesite. En la presente memoria se proporciona el uso de un anticuerpo anti-B7-H4, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, o una proteína de fusión para su uso en la reducción de la metástasis tumoral en un sujeto que lo necesita. Se proporciona un anticuerpo anti-B7-H4, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, o una proteína de fusión en la fabricación de un medicamento para reducir la metástasis tumoral en un sujeto que lo necesita.

[00406] Los cánceres y trastornos relacionados que pueden tratarse o prevenirse con los anticuerpos anti-B7-H4, los fragmentos de unión a antígeno de los mismos y las proteínas de fusión que se divulgan en la presente memoria incluyen, entre otros, las siguientes leucemias que incluyen, pero sin limitarse a, leucemia aguda, leucemia linfocítica aguda, leucemias mielocíticas agudas tales como mieloblástica, promielocítica, mielomonocítica, monocítica, las leucemias eritroleucémicas y el síndrome mielodisplásico, las leucemias crónicas como, entre otras, la leucemia mielocítica crónica (granulocítica), la leucemia linfocítica crónica, la tricoleucemia; policitemia vera; linfomas tales como, pero no limitados a, la enfermedad de Hodgkin, la enfermedad no Hodgkin; mielomas múltiples tales como, pero no limitados a, el mieloma múltiple latente, el mieloma no secretor, el mieloma osteoesclerótico, la leucemia de

células plasmáticas, el plasmacitoma solitario y el plasmacitoma extramedular; macroglobulinemia de Waldenström; gammapatía monoclonal de significado indeterminado; gammapatía monoclonal benigna; enfermedad de las cadenas pesadas; sarcomas óseos y del tejido conectivo como, por ejemplo, sarcoma óseo, osteosarcoma, condrosarcoma, sarcoma de Ewing, tumor maligno de células gigantes, fibrosarcoma óseo, cordoma sarcoma perióstico, sarcomas de tejidos blandos, angiosarcoma (hemangiosarcoma), fibrosarcoma, sarcoma de Kaposi, leiomiosarcoma, liposarcoma, linfangiosarcoma, neurilemmoma, rabdomiosarcoma, sarcoma sinovial; tumores cerebrales, incluidos, pero sin limitarse a ellos, glioma, astrocitoma, glioma del tronco cerebral, ependimoma, oligodendroglioma, tumor no glial, neurinoma del acústico, craneofaringioma, meduloblastoma, meningioma, pinocitoma, pinoblastoma, linfoma cerebral primario cáncer de mama, incluidos, entre otros, adenocarcinoma, carcinoma lobular (microcítico), carcinoma intraductal, cáncer de mama medular, cáncer de mama mucinoso, cáncer de mama tubular, cáncer de mama papilar, enfermedad de Paget y cáncer de mama inflamatorio; cáncer suprarrenal, incluidos, entre otros, feocromocitoma y carcinoma adrenocortical cáncer de tiroides, como, entre otros, el cáncer papilar o folicular de tiroides, el cáncer medular de tiroides y el cáncer anaplásico de tiroides; cáncer de páncreas, como, entre otros, el insulinoma, el gastrinoma, el glucagonoma, el vipoma, el tumor secretor de somatostatina y el tumor de células de los islotes o carcinoide cánceres hipofisarios, incluidos, entre otros, la enfermedad de Cushing, el tumor secretor de prolactina, la acromegalia y la diabetes insípida; cánceres oculares, incluidos, entre otros, el melanoma ocular, como el melanoma del iris, el melanoma coroideo y el melanoma del cuerpo ciliar, y el retinoblastoma; cánceres vaginales, incluidos, entre otros, el carcinoma epidermoide, el adenocarcinoma y el melanoma cáncer de vulva, incluidos, entre otros, el carcinoma epidermoide, el melanoma, el adenocarcinoma, el carcinoma de células basales, el sarcoma y la enfermedad de Paget; cánceres de cuello uterino, incluidos, entre otros, el carcinoma epidermoide y el adenocarcinoma; cánceres de útero, incluidos, entre otros, el carcinoma de endometrio y el sarcoma uterino cánceres de ovario, incluidos, entre otros, el carcinoma epitelial de ovario, el tumor limítrofe, el tumor de células germinales y el tumor estromal; cánceres de esófago, incluidos, entre otros, el cáncer epidermoide, el adenocarcinoma, el carcinoma adenoide quístico, el carcinoma mucoepidermoide, el carcinoma adenoescamoso, el sarcoma, el melanoma, el plasmocitoma, el carcinoma verrugoso y el carcinoma de células de avena (células pequeñas) cánceres de estómago, incluidos, entre otros, el adenocarcinoma, el fungiforme (polipoide), el ulcerante, el de

extensión superficial, el de extensión difusa, el linfoma maligno, el liposarcoma, el fibrosarcoma y el carcinosarcoma; cánceres de colon; cánceres de recto cánceres de hígado, incluidos, entre otros, el carcinoma hepatocelular y el hepatoblastoma; cánceres de vesícula biliar, incluidos, entre otros, el adenocarcinoma; colangiocarcinomas, incluidos, entre otros, el papilar, el nodular y el difuso cánceres de pulmón, incluidos, entre otros, el cáncer de pulmón no microcítico, el carcinoma epidermoide (carcinoma epidermoide), el adenocarcinoma, el carcinoma de células grandes y el cáncer de pulmón microcítico, cánceres testiculares, incluidos, entre otros, el tumor germinal, el seminoma, el anaplásico, el clásico (típico), el espermatocítico, el no seminoma, el carcinoma embrionario, el carcinoma teratoma, el coriocarcinoma (tumor del saco vitelino), los cánceres de próstata, incluidos, entre otros, el adenocarcinoma, el leiomiosarcoma y el rabdomiosarcoma cánceres penales; cánceres orales, incluidos, entre otros, el carcinoma epidermoide; cánceres basales; cánceres de las glándulas salivales, incluidos, entre otros, el adenocarcinoma, el carcinoma mucoepidermoide y el carcinoma adenoide; cánceres de faringe, incluidos, entre otros, el cáncer epidermoide y el verrugoso; cánceres de piel, incluidos, entre otros, el carcinoma de células basales, el carcinoma epidermoide y el melanoma, el melanoma de extensión superficial, el melanoma nodular, el melanoma lentigo maligno y el melanoma lentiginoso acral cánceres de riñón, incluidos, entre otros, el cáncer de células renales, el adenocarcinoma, el hipernefoma, el fibrosarcoma, el cáncer de células de transición (pelvis renal y/o uterino); el tumor de Wilms; cánceres de vejiga, incluidos, entre otros, el carcinoma de células de transición, el cáncer epidermoide, el adenocarcinoma y el carcinosarcoma. Además, los cánceres incluyen el mixosarcoma, el sarcoma osteogénico, el endoteliosarcoma, el linfangioendoteliosarcoma, el mesotelioma, el sinovioma, el hemangioblastoma, el carcinoma epitelial, el cistadenocarcinoma, el carcinoma broncogénico, el carcinoma de las glándulas sudoríparas, el carcinoma de las glándulas sebáceas, el carcinoma papilar y los adenocarcinomas papilares.

[00407] Por consiguiente, los anticuerpos anti-B7-H4, los fragmentos de unión a antígeno de los mismos y las proteínas de fusión descritas en la presente memoria también son útiles en el tratamiento o la prevención de una variedad de cánceres (en particular, el de ovario, mama, próstata, gástrico, renal, tiroides y uterino) u otras enfermedades proliferativas anormales, que incluyen (pero sin limitarse a) las siguientes carcinoma, incluido el de vejiga, mama, colon, riñón, hígado, pulmón, ovario, páncreas, estómago, cuello uterino, tiroides y piel; incluido el carcinoma epidermoide; tumores hematopoyéticos de linaje linfático, que

incluye leucemia, leucemia linfocítica aguda, leucemia linfoblástica aguda, linfoma de células B, linfoma de células T, linfoma de Burkett; tumores hematopoyéticos de linaje mieloide, que incluye leucemias mielógenas agudas y crónicas y leucemia promielocítica tumores de origen mesenquimal, incluidos el fibrosarcoma y el rabdomiosarcoma; otros tumores, incluidos el melanoma, el seminoma, el tetratocarcinoma, el neuroblastoma y el glioma; tumores del sistema nervioso central y periférico, incluidos el astrocitoma, el neuroblastoma, el glioma y los tumores schwannomas de origen mesenquimal, incluidos el fibrosarcoma, el rabdomiosarcoma y el osteosarcoma; y otros tumores, incluidos el melanoma, el xenoderma pigmentosum, el queratoactinoma, el seminoma, el cáncer folicular de tiroides y el teratocarcinoma. También se contempla que los cánceres causados por aberraciones en la apoptosis también sean tratados por los métodos y composiciones descritos en la presente memoria. Dichos cánceres pueden incluir, pero no se limitan a, linfomas foliculares, carcinomas con mutaciones p53, tumores hormonodependientes de mama, próstata y ovario, y lesiones precancerosas como la poliposis adenomatosa familiar y los síndromes mielodisplásicos. En realizaciones específicas, los métodos y composiciones divulgados tratan o previenen la malignidad o los cambios disproliferativos (como metaplasias y displasias), o los trastornos hiperproliferativos, en el ovario, la vejiga, la mama, el colon, el pulmón, la piel, el páncreas o el útero. En otras realizaciones específicas, el sarcoma, el melanoma o la leucemia son tratados o prevenidos por los métodos y composiciones proporcionados.

[00408] Las células cancerosas adquieren un conjunto característico de capacidades funcionales durante su desarrollo, aunque a través de diversos mecanismos. Dichas capacidades incluyen la evasión de la apoptosis, la autosuficiencia en las señales de crecimiento, la insensibilidad a las señales anticrecimiento, la invasión/metástasis tisular, el potencial explicativo ilimitado y la angiogénesis sostenida. El término "célula cancerosa" abarca tanto las células cancerosas premalignas como las malignas. En algunas realizaciones, el cáncer se refiere a un tumor benigno, que ha permanecido localizado. En otras realizaciones, el cáncer se refiere a un tumor maligno, que ha invadido y destruido estructuras corporales vecinas y se ha extendido a sitios distantes. En otras realizaciones, el cáncer se asocia con un antígeno cancerígeno específico (por ejemplo, antígeno de pancarcinoma (KS 1/4), antígeno de carcinoma de ovario (CA125), antígeno específico de próstata (PSA), antígeno carcinoembrionario (CEA), CD19, CD20, HER2/neu, etc.).

[00409] Terapias combinadas

[00410] Los anticuerpos anti-B7-H4, los fragmentos de unión a antígenos de los mismos y las proteínas de fusión descritas en la presente memoria pueden combinarse ventajosamente con un agente terapéutico adicional. Dichos agentes adicionales incluyen, entre otros, agentes citotóxicos, agentes quimioterapéuticos, agentes inhibidores del crecimiento, agentes antiinflamatorios, agentes anticancerígenos, agentes antineurodegenerativos, agentes inmunosupresores y agentes antiinfecciosos. La administración del anticuerpo anti-B7-H4, o del fragmento de unión a antígeno del mismo, o de la proteína de fusión y del agente terapéutico adicional (o de la terapia adicional) puede ser simultánea, consecutiva o intermitente. La administración del anticuerpo anti-B7-H4, o del fragmento de unión a antígeno del mismo, o de la proteína de fusión y del agente terapéutico adicional (o de la terapia adicional) puede ser por separado o como una mezcla. Además, los métodos de tratamiento proporcionados en la presente memoria pueden referirse a un tratamiento en combinación con una o más terapias que incluyen, pero no se limitan, al grupo de la terapia con anticuerpos, la quimioterapia, la terapia con citoquinas, la terapia con células dendríticas, la terapia génica, la terapia hormonal, la terapia con luz láser y la radioterapia.

[00411] Los anticuerpos anti-B7-H4, los fragmentos de unión a antígeno de los mismos y las proteínas de fusión de la presente descripción pueden combinarse de forma sinérgica con uno o más fármacos o terapias anticancerosas utilizadas para tratar el cáncer, incluidos, entre otros, el carcinoma de células renales, el cáncer colorrectal, el glioblastoma multiforme, el carcinoma epidermoide de cabeza y cuello, el cáncer de pulmón no microcítico, el cáncer de colon, el cáncer de ovario, el adenocarcinoma, el cáncer de próstata, el glioma y el melanoma. Los ejemplos de tales agentes incluyen, pero no se limitan a, un anticuerpo contra PD-L1 (por ejemplo, nivolumab), un inhibidor de LAG-3, un inhibidor de CTLA-4 (por ejemplo, ipilimumab), un inhibidor de TIM3, un inhibidor de BTLA, un inhibidor de TIGIT, un inhibidor de CD47, un antagonista de otro co-inhibidor o ligando de células T (por ejemplo, un anticuerpo contra CD-28, 2B4, LY108, LAIR1, ICOS, CD137 o VISTA), un inhibidor de la indoleamina-2,3-dioxigenasa (IDO), un antagonista del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) (por ejemplo, un "VEGF-Trap" como el aflibercept u otra proteína de fusión inhibidora del VEGF como se establece en el documento US 7,087,411, o un anticuerpo anti-VEGF, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, (por ejemplo, bevacizumab, o ranibizumab) o una molécula pequeña inhibidora de la quinasa del receptor

del VEGF (por ejemplo, sunitinib, sorafenib o pazopanib)), un inhibidor de la Ang2 (por ejemplo, nesvacumab), un inhibidor del factor de crecimiento transformante β (TGF3), un inhibidor del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) (por ejemplo, erlotinib, cetuximab), un agonista de un receptor costimulador (por ejemplo, un agonista de la proteína relacionada con el TNFR inducida por glucocorticoides), un anticuerpo de un antígeno específico del tumor (por ejemplo, CA9, CA1 25, antígeno 3 asociado al melanoma (MAGE3), antígeno carcinoembrionario (CEA), medicamentos antivirales (por ejemplo, zidovudina, lamivudina, abacavir, ribavirina, lopinavir, efavirenz, cobicistat, tenofovir, rilpivirina y corticosteroides), vimentina, tumor-M2-PK, antígeno específico de la próstata (PSA), mucina-1, MART-1 y CA1 9-9), una vacuna (por ejemplo, Bacillus Calmette-Guerin, una vacuna contra el cáncer), un adyuvante para aumentar la presentación del antígeno (por ejemplo factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos), un anticuerpo biespecífico (por ejemplo, anticuerpo biespecífico CD3xCD20, anticuerpo biespecífico PSMAxCD3), vacunas contra el cáncer (por ejemplo, MAGE3, MUC1, EGFRv3, ALVAC-CEA), una citotoxina, un agente quimioterapéutico (por ejemplo, dacarbazina, temozolomida, ciclofosfamida, docetaxel, doxorubicina, daunorrubicina, cisplatino, carboplatino, gemcitabina, metotrexato, mitoxantrona, oxaliplatino, paclitaxel y vincristina), ciclofosfamida, radioterapia, un inhibidor de IL-6R (por ejemplo sarilumab), un inhibidor de la IL-4R (por ejemplo, dupilumab), un inhibidor de la IL-1 0, una citoquina como la IL-2, la IL-7, la IL-21 y la IL-15, un conjugado anticuerpo-fármaco (ADC) (por ejemplo anti-CD1 9-DM4 ADC, y anti-DS6-DM4 ADC), un fármaco antiinflamatorio (por ejemplo, corticosteroides y antiinflamatorios no esteroideos), un suplemento dietético como antioxidantes o cualquier cuidado paliativo para tratar el cáncer, la radioterapia, y/o un anticuerpo contra un receptor Fc en las células inmunitarias para el tratamiento de una enfermedad autoinmunitaria.

[00412] Métodos de administración

[00413] Las composiciones terapéuticas que comprenden cualquiera de los anticuerpos anti-B7-H4, los fragmentos de unión a antígeno de los mismos o las proteínas de fusión descritas en la presente memoria pueden administrarse a un sujeto que los necesite de cualquier manera conveniente, que incluye, pero sin limitarse a ello, mediante inyección, transfusión, implantación o trasplante. Las composiciones descritas en la presente memoria pueden administrarse a un sujeto que las necesite por vía subcutánea, intradérmica,

intratumoral, intranodal, intramedular, intramuscular, intracraneal, por inyección intravenosa o intralinfática, o intraperitoneal. En una realización, las composiciones celulares de la presente descripción se administran preferentemente por inyección intravenosa.

[00414] En ciertas realizaciones, el anticuerpo anti-B7-H4, el fragmento de unión a antígeno del mismo o la proteína de fusión se administran al mamífero por infusión intravenosa, es decir, *introducción del* anticuerpo anti-B7-H4, del fragmento de unión a antígeno del mismo o de la proteína de fusión en la vena de un mamífero durante un periodo determinado. En ciertas realizaciones, el periodo es de unos 5 minutos, unos 10 minutos, unos 30 minutos, unas 1 h, unas 2 h, unas 4 h o unas 8 h.

[00415] En algunas realizaciones, la composición se administra directamente al tumor o al microambiente tumoral para mejorar la localización de la composición en el sitio del tumor y reducir la toxicidad para las células no diana que expresan B7-H4.

[00416] Regímenes de administración

[00417] Los métodos según este aspecto de la descripción comprenden administrar secuencialmente a un sujeto múltiples dosis de un anticuerpo anti-B7-H4, un fragmento de unión a antígeno del mismo, o una proteína de fusión de la descripción. Como se utiliza en la presente memoria, "administrar secuencialmente" significa que cada dosis de un anticuerpo anti-B7-H4, fragmento de unión a antígeno del mismo, o una proteína de fusión de la descripción se administra al sujeto en un momento diferente, por ejemplo, en diferentes días separados por un intervalo predeterminado (por ejemplo, horas, días, semanas o meses). La presente descripción incluye métodos que comprenden la administración secuencial al paciente de una dosis inicial única de un anticuerpo anti-B7-H4, un fragmento de unión a antígeno del mismo, o una proteína de fusión de la descripción, seguida de una o más dosis secundarias de un anticuerpo anti-B7-H4, un fragmento de unión a antígeno del mismo, o una proteína de fusión de la descripción, y opcionalmente seguida de una o más dosis terciarias de un anticuerpo anti-B7-H4, un fragmento de unión a antígeno del mismo, o una proteína de fusión de la descripción. Un anticuerpo anti-B7-H4, un fragmento de unión a antígeno del mismo o una proteína de fusión de la descripción pueden administrarse a una dosis de entre 0.01 mg/kg y 100 mg/kg.

[00418] En ciertas realizaciones, una dosis de un compuesto o una composición se administra a un sujeto cada día, cada dos días, cada tres días, una vez a la semana, dos veces a la semana, tres veces a la semana, una vez cada dos semanas o una vez al

mes. En otras realizaciones, se administran dos, tres o cuatro dosis de un compuesto o una composición a un sujeto cada día, cada dos días, cada tercer día, una vez a la semana, una vez cada dos semanas o una vez al mes. En algunas realizaciones, una dosis de un compuesto o una composición se administra durante 2 días, 3 días, 5 días, 7 días, 14 días, 21 días o 28 días. En ciertas realizaciones, una dosis de un compuesto o una composición se administra durante 1 mes, 1.5 meses, 2 meses, 2.5 meses, 3 meses, 4 meses, 5 meses, 6 meses o más.

[00419] Composiciones farmacéuticas

[00420] En otro aspecto, se proporcionan composiciones farmacéuticamente aceptables que comprenden una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo anti-B7-H4, un fragmento de unión a antígeno del mismo, o una proteína de fusión de la descripción formulada junto con uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables.

[00421] La dosis del agente(s) activo(s) puede variar, dependiendo de la razón de uso, del sujeto individual y del modo de administración. La dosis puede ajustarse en función del peso del sujeto, la edad y el estado de salud del mismo, y la tolerancia al compuesto o composición.

[00422] El agente activo y el (los) excipiente(s) pueden formularse en composiciones y formas de dosificación según métodos conocidos en la técnica. Las composiciones farmacéuticas proporcionadas en la presente memoria pueden estar especialmente formuladas en forma sólida o líquida, incluidas las adaptadas para la administración parenteral, por ejemplo, por inyección subcutánea, intratumoral, intramuscular o intravenosa como, por ejemplo, una solución estéril, o una suspensión.

[00423] Las composiciones terapéuticas que comprenden anticuerpos anti-B7-H4 o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, o proteínas de fusión de los mismos, pueden formularse con uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables, que pueden ser un material, composición o vehículo farmacéuticamente aceptable, como un relleno líquido o sólido, diluyente, portador, auxiliar de fabricación (por ejemplo, lubricante, talco, magnesio, estearato de calcio o de zinc, o ácido estérico), disolvente o material de encapsulación, que interviene en el transporte del compuesto terapéutico para su administración al sujeto, agente de carga, sal, tensioactivo y/o un conservante. Algunos ejemplos de materiales que pueden servir como excipientes farmacéuticamente aceptables incluyen azúcares, como la lactosa, la glucosa y la sacarosa; almidones, como el almidón de maíz y el almidón de patata; celulosa y sus derivados, como la carboximetilcelulosa sódica, la etilcelulosa y el acetato de celulosa;

gelatina; talco; ceras; aceites, como el aceite de cacahuete, el aceite de semilla de algodón, el aceite de cártamo, el aceite de sésamo, el aceite de oliva, el aceite de maíz y el aceite de soja; glicoles, como el etilenglicol y el propilenglicol; polioles, como la glicerina, el sorbitol, el manitol y el polietilenglicol; ésteres, como el oleato de etilo y el laurato de etilo; agar; agentes amortiguadores; agua; solución salina isotónica; soluciones con pH amortiguado; y otras sustancias compatibles no tóxicas empleadas en formulaciones farmacéuticas.

[00424] Un agente de carga, tal como se menciona aquí, puede describirse como un compuesto que se añade para aumentar la masa de una composición farmacéutica y contribuir a la estructura física de la formulación en la forma liofilizada. Los ejemplos de agentes de carga pueden incluir, entre otros, manitol, glicina, polietilenglicol y sorbitol.

[00425] La composición terapéutica puede incluir opcionalmente un tensioactivo. El uso de un tensioactivo puede reducir la agregación de la proteína reconstituida y/o reducir la formación de partículas en la formulación reconstituida. Los ejemplos de tensioactivos adecuados que pueden utilizarse según la presente descripción incluyen, entre otros, polisorbatos (por ejemplo, polisorbatos 20 u 80); poloxámeros (por ejemplo poloxámero 188); Tritón; dodecil sulfato de sodio (SDS); laurel sulfato de sodio; octilglucósido de sodio; lauril-, miristilo-, linoleil- o estearil-sulfobetaina; lauril-, miristilo-, linoleil- o estearil-sarcosina; linoleil-, miristilo-, o cetil-betaína; lauroamidopropil-, cocamidopropil-, linoleamidopropil-, miristamidopropil-, palmidopropil-, o isostearamidopropil-betaína (por ejemplo, lauroamidopropil); miristamidopropil-, palmidopropil-, o isoestearamidopropil-dimetilamina; metilcoil-, o metil oleil-aurato de sodio; y polietilglicol, polipropilglicol y copolímeros de etileno y propilenglicol (p. ej., Pluronic, PF68, etc.).

[00426] Opcionalmente, puede utilizarse un conservante en la composición terapéutica descrita en la presente memoria. Entre los conservantes adecuados para su uso en la formulación proporcionada en la presente memoria se incluyen el cloruro de octadecildimetilbencilamonio, el cloruro de hexametonio, el cloruro de benzalconio (una mezcla de cloruros de alquilbencildimetilamonio en donde los grupos alquilo son compuestos de cadena larga) y el cloruro de bencetonio. Otros tipos de conservantes son los alcoholes aromáticos como el fenol, el butilo y el alcohol bencílico, los parabenos alquílicos como el metil o el propil parabeno, el catecol, el resorcinol, el ciclohexanol, el 3-pentanol y el m-cresol.

[00427] La composición terapéutica descrita en la presente memoria puede tener una concentración variable del anticuerpo anti-B7-H4, del fragmento de unión a antígeno del

mismo o de la proteína de fusión. Por ejemplo, las composiciones pueden comprender un anticuerpo anti-B7-H4, un fragmento de unión a antígeno del mismo o una proteína de fusión a una concentración de 10 mg/ml a 200 mg/ml, 25 mg/ml a 130 mg/ml, 50 mg/ml a 125 mg/ml, 75 mg/ml a 110 mg/ml, o 80 mg/ml a 100 mg/ml. Las composiciones también pueden comprender un anticuerpo anti-B7-H4, un fragmento de unión a antígeno del mismo o una proteína de fusión en aproximadamente 10 mg/ml, 20 mg/ml, 30 mg/ml, 40 mg/ml, 50 mg/ml, 60 mg/ml, 70 mg/ml, 80 mg/ml, 90 mg/ml, 100 mg/ml, 110 mg/ml, 120 mg/ml, 130 mg/ml, 140 mg/ml o 150 mg/ml. En algunas realizaciones, la composición terapéutica puede ser liofilizada y suministrada en una composición para su reconstitución antes de la administración.

[00428] Usos diagnósticos

[00429] Los anticuerpos anti-B7-H4, los fragmentos de unión a antígeno de los mismos o las proteínas de fusión de la presente descripción pueden utilizarse para detectar y/o medir B7-H4 en una muestra, por ejemplo, con fines de diagnóstico. Los anticuerpos anti-B7-H4, los fragmentos de unión a antígeno de los mismos o las proteínas de fusión de la presente descripción pueden utilizarse en un ensayo para detectar una enfermedad o trastorno como el cáncer. Los ensayos de diagnóstico ejemplares para B7-H4 pueden comprender, por ejemplo Poner en contacto una muestra, obtenida de un paciente, con un anticuerpo anti-B7-H4, un fragmento de unión a antígeno del mismo, o una proteína de fusión de la descripción, en donde el anticuerpo anti-B7-H4, el fragmento de unión a antígeno del mismo, o la proteína de fusión se marca con una etiqueta detectable o una molécula informadora o se utiliza como ligando de captura para aislar selectivamente B7-H4 de las muestras del paciente o, alternativamente, se utiliza en combinación con un anticuerpo secundario que a su vez está marcado de forma detectable. La etiqueta detectable o la molécula informadora puede ser un radioisótopo, una fracción fluorescente o quimioluminiscente como el isotiocianato de fluoresceína o la rodamina, o una enzima como la fosfatasa alcalina, la β -galactosidasa, la peroxidasa de rábano picante o la luciferasa. Entre los ensayos ejemplares específicos que pueden utilizarse para detectar o medir B7-H4 en una muestra se encuentran el ensayo inmunoenzimático (ELISA), el radioinmunoanálisis (RIA) y la clasificación celular activada por fluorescencia (FACS).

[00430] Los kits de la presente descripción pueden incluir cualquier combinación de agentes, composiciones, componentes, reactivos, dispositivos o mecanismos de

administración u otras entidades previstas en la presente memoria. Por ejemplo, un kit de la presente descripción puede incluir uno o más anticuerpos anti-B7-H4 o fragmentos de unión a antígeno de los mismos o proteínas de fusión descritas en la presente memoria y uno o más de una composición portadora, un dispositivo de administración y un agente terapéutico combinado. Los kits pueden incluir además un dispositivo para facilitar el suministro, como una jeringa para inyección o un instrumento que facilite el suministro de las composiciones terapéuticas al sujeto que las necesita. Cualquiera de los kits proporcionados en la presente memoria puede incluirse en un envase, paquete o dispensador junto con las instrucciones de administración.

[00431] Todas las demás patentes y solicitudes referenciadas se incorporan en la presente memoria por referencia en su totalidad. Además, cuando una definición o el uso de un término en una referencia, que se incorpora por referencia en la presente memoria, es inconsistente o contrario a la definición de ese término proporcionada en la presente memoria, la definición de ese término proporcionada en la presente memoria se aplica y la definición de ese término en la referencia no se aplica.

[00432] Debe entenderse que la presente descripción no se limita a las moléculas, composiciones, metodologías o protocolos particulares descritos, ya que éstos pueden variar. Cualquier método y material similar o equivalente a los descritos en la presente memoria puede utilizarse en la práctica o en la prueba de las realizaciones de la presente descripción. Además, debe entenderse que la presente descripción en esta especificación incluye todas las posibles combinaciones de dichas características particulares. Por ejemplo, cuando una característica particular se describe en el contexto de un aspecto o realización particular de la presente descripción, o de una reivindicación particular, dicha característica también puede utilizarse, en la medida de lo posible, en combinación con y/o en el contexto de otros aspectos y realizaciones particulares de la descripción, y en la descripción en general.

[00433] Cuando se hace referencia en la presente memoria a un método que comprende dos o más etapas definidas, las etapas definidas pueden llevarse a cabo en el orden enumerado, o en cualquier orden o simultáneamente (excepto cuando el contexto excluye esa posibilidad), y el método puede incluir una o más etapas más que se llevan a cabo antes de cualquiera de las etapas definidas, entre dos de las etapas definidas, o después de todas las etapas definidas (excepto cuando el contexto excluye esas posibilidades).

[00434] Para facilitar una mejor comprensión de la presente descripción, se dan los siguientes ejemplos de realizaciones específicas. Los siguientes ejemplos no deben interpretarse como una limitación o definición del alcance total de la descripción.

EJEMPLOS

[00435] **Ejemplo 1: Materiales y métodos para los ejemplos 1-21**

[00436] Generación de B7-H4-Fc de humano/ratón, dominio IgV de B7-H4 de humano/ratón y dominio IgC de B7-H4 de humano y ratón.

[00437] Se sintetizaron genes para la B7-H4 humana (# de acceso NCBI: NP_078902, Phe29-Ala258) y la B7-H4 de ratón (# de acceso NCBI: Q7TSP5, Phe29-Pro258) y se fusionaron con un gen que codifica el terminal N de la IgG1 Fc humana (# de acceso NCBI: P01587, Pro100-Lys330). Los genes que codifican las proteínas de fusión B7-H4-Fc se insertaron en un vector de expresión de mamíferos como el pcDNA 3.1 (ThermoFisher) y se transfectaron a las células Expi293F (ThermoFisher). Después de incubar las células en un incubador de CO₂ de gran capacidad (Thermo Scientific) a 30 °C durante 4-5 días, el sobrenadante claro se cargó en la columna MabSelect SuRe Protein A. La proteína purificada se eluyó con tampón de glicina de pH 3. Tras la neutralización con tampón Tris de pH 7.5, la proteína se analizó por SDS-PAGE y/o SE-HPLC. Se utilizó el mismo método para generar el dominio IgV del B7-H4-Fc humano y de ratón (Phe29-Val157) y el dominio IgC del B7-H4-Fc humano (Asp158-Ala258) o del B7-H4-Fc de ratón (Asp158-Pro258).

[00438] Identificación de anticuerpos a partir de la biblioteca de visualización de fago Superman 2.0

[00439] Los B7-H4-his humanos y de ratón se biotinilaron utilizando el EZ-Link™ NHS-PEG4-Biotin (ThermoFisher). El fago purificado de la biblioteca de visualización de fagos Superman 2.0 (Distributed Bio) se mezcló con 100 µg a 0.5 µg de B7-H4-Fc de humano/ratón o B7-H4-his biotinilado de humano/ratón. Después de incubar en RT durante 0.5 a 1 hora, la mezcla de B7-H4/fago fue capturada por microesferas magnéticas de proteína G (para B7-H4 de fusión Fc) o de estreptavidina (para B7-H4 biotinilado). El fago no unido se lavó con PBS-T y PBS y se eluyó con 100 mM de trietilamina (TEA). El fago eluido se neutralizó con tampón Tris de pH 7.5 y se utilizó para la infección de células E. coli electrocompetentes ER2738 que crecían en fase logarítmica. Tras incubar a 30 °C durante la noche, las bacterias se cosecharon y se utilizaron para inocular a 2YT con glucosa, tetraciclina y carbenicilina. Se utilizó el fago ayudante M13 para infectar las bacterias en fase logarítmica, y se cambió el medio a 2YT con kanamicina y carbenicilina para seguir amplificando el fago durante la noche. Al día siguiente, los fagos se purificaron mediante PEG y se resuspendieron en PBS. Los fagos purificados estaban listos para la siguiente ronda

de barrido. Para monitorizar el barrido, se recogieron colonias bacterianas individuales que crecieron hasta la fase logarítmica. Se añadió el fago ayudante M13 para amplificar el fago como se ha descrito anteriormente. La mezcla de fagos crudos se añadió a una placa recubierta de B7-H4. La unión se detectó utilizando un anticuerpo HRP-anti-M13. Por lo general, se realizaron 3-4 rondas de barrido hasta que la tasa de positividad alcanzó >50 %.

[00440] Para mejorar la afinidad del plomo se utilizó el método de barajar la cadena ligera. Brevemente, la nueva biblioteca de fagos se construyó emparejando la cadena pesada del plomo con el pool de cadena ligera de la biblioteca Superman 2.0. Se identificaron anticuerpos de mayor afinidad en condiciones duras como una temperatura más alta, un pH más bajo o alto y la presencia de antígenos B7-H4 adicionales en los tampones de lavado.

[00441] Conversión de IgG a partir de scFv, expresión y purificación

[00442] Los genes que codifican los dominios variables de la cadena ligera y la cadena pesada variable se fusionaron con los genes que codifican el dominio constante de la cadena ligera o la cadena pesada de la IgG1 humana, respectivamente. Las secuencias completas de codificación de la proteína (que codifican tanto los dominios variables como los constantes) se insertaron en un vector de expresión de mamíferos como el pcDNA3.1 (ThermoFisher). El vector se transfectó en una estirpe celular de expresión como HEK293, células de ovario de hámster chino (CHO) o CHO transfectadas con α 1, 6-fucosiltransferasa (FUT8) (potenciando la actividad ADCC). Los anticuerpos se purificaron utilizando una columna de proteína A y SEC-HPLC para producir anticuerpos puros con monómero >95 %.

[00443] Generación de proteínas de fusión

[00444] Se sintetizó el gen que codifica el dominio sushi del receptor de la IL-15 (residuos 33-93 del # de acceso NCBI: EAW86418.1) y la IL-15 madura (residuos 49-162 del # de acceso NCBI: P40933) y se fusionó con el extremo 3' de la secuencia que codifica una cadena pesada del anticuerpo anti-B7-H4 (dando como resultado un gen que codifica una proteína de fusión de terminal C). Se introdujeron mutaciones de las cadenas pesadas (S354C y T366W en una cadena pesada, Y349C, T366S, L368A e Y407V en la otra cadena pesada) para estabilizar el heterodímero de dos cadenas pesadas. Se introdujeron mutaciones adicionales (M428L y N434S) en la región Fc del anticuerpo para aumentar la unión del anticuerpo al FcRn a pH 6, prolongando así la vida media sérica de la proteína. La expresión y purificación de los anticuerpos de fusión se realizó como se ha descrito anteriormente.

[00445] ELISA de respuesta a la dosis

[00446] Se inmovilizaron unos 1-2 $\mu\text{g/ml}$ de B7-H4-Fc de humano o de ratón (o marcado con his) en placas ELISA (Immuno 2HB, Thermo scientific, cat # 3455) a 4 °C durante la noche. Después de bloquear las placas con PBS al 3 % + leche, se añadieron anticuerpos diluidos en serie a las placas bloqueadas y se incubaron a RT durante 1-1.5 h. Después de lavar las placas con PBS-T (0.05 %), se añadió a la placa un anticuerpo conjugado con peroxidasa de rábano (HRP) dirigido al hFab. Las señales se revelaron añadiendo 3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina (TMB) seguido de 1N de H_2SO_4 para detener la reacción. La DO a 450 nm se leyó mediante un lector de placas ELISA (Infinite M1000 de TECAN). Se utilizó GraphPad de Prism para trazar la curva de OD450 frente a la concentración de anticuerpos y para calcular los valores de EC50.

[00447] Cinética Biacore

[00448] Los experimentos de resonancia de plasmón superficial se realizaron utilizando un instrumento Biacore T200 equipado con chips sensores CM5. El sistema se equilibró en el tampón de funcionamiento HBS-EP de pH 7.4. Los ligandos se inmovilizaron mediante la química de acoplamiento de aminas. Las superficies de las celdas de flujo uno a cuatro se activaron durante 5 minutos utilizando un kit de acoplamiento de aminas a una velocidad de flujo de 10 $\mu\text{l/min}$. Los ligandos (B7-H4-Fc humano, B7-H4-hism humano y B7-H4-Fc de ratón; a una concentración de 5 $\mu\text{g/ml}$ en acetato de sodio 10 mM, pH 5.0) se inmovilizaron a una densidad de 50-100 RU en la celda de flujo 2, 3, 4 respectivamente. La celda de flujo 1 se dejó en blanco para que sirviera de superficie de referencia. Todas las superficies de las celdas de flujo se bloquearon con una inyección de 5 minutos de etanolamina 1 M, pH 8.0. Para recoger los datos de unión cinética, se inyectó el analito respectivo (diluido en tampón 1XHBS-EP, pH 7.4) en las cuatro celdas de flujo a concentraciones de 100 nM a 0.1 nM a una velocidad de flujo de 30 $\mu\text{l/min}$ y a una temperatura de 25 °C. Se dejó que el complejo proteico se asociara y disociara durante 180 segundos y 1000 o 1200 segundos, respectivamente. Las superficies se regeneraron con una inyección de 30 segundos de 1.5 M NaCl/0.05 M NaOH. Los datos se ajustaron a un modelo de interacción simple 1:1 utilizando la opción de ajuste de Langmuir disponible en el software Biaevaluation

[00449] Generación de una estirpe celular CT26 que expresa mB7-H4

[00450] La estirpe celular CT26 de carcinoma de murino (CT26.CL25, cat# CRL-2639) se obtuvo de ATCC. El ADNc del ORF de B7-H4 (Vtn1) de murino en el vector pReceiver-M68 (cat# EX-32401-M68) y su vector de control vacío pReceiver-M68 (cat# EX-NEG-M68) se adquirieron de GeneCopoeia. Las células CT26 se transfectaron con los plásmidos purificados utilizando el reactivo de transfección de ADN Lipofectamine® 2000. Tras 48-72 horas de transfección, se seleccionaron las colonias de células CT26 transfectadas y se cultivaron en un medio que contenía puomicina. El nivel de expresión de mB7-H4 de los clones seleccionados se detectó mediante la tinción con el anticuerpo PE anti-ratón B7-H4 (cat# 139406, Biolegend) utilizando el sistema Guava® FLOW Cytometry easyCyte™.

[00451] Evaluación de la unión del anticuerpo/proteína de fusión a la B7-H4 expresada por las células mediante FACS

[00452] Las células se cosecharon, se lavaron una vez y se volvieron a suspender hasta una concentración de 1×10^6 células/ml en tampón FACS enfriado con hielo. Se añadieron 25 µl de suspensión celular a cada pocillo de una placa de microlitro de fondo redondo de 96 pocillos. Se añadieron anticuerpos o proteínas de fusión diluidos en serie a cada pocillo y se incubaron durante 1 hora a 4 °C. Las células se lavaron tres veces por centrifugación a 1.500 rpm durante 5 minutos, y luego se tiñeron con el anticuerpo secundario (dilución 1:200) durante 30 minutos a 4 °C en la oscuridad. Las células se lavaron una vez, se volvieron a suspender en 100 µl de tampón PBS y se analizaron con el sistema Guava Flow Cytometry EasyCyte.

[00453] M-07e Cultivo celular y ensayo de proliferación

[00454] La estirpe celular de leucemia megacarioblástica aguda humana M-07e se cultivó en medio IMDM complementado con un 15 % de FBS inactivado por calor y un 20 % de medio condicionado de la estirpe celular 5637. Se añadieron diluciones seriadas de anticuerpos o proteínas de fusión en una placa de 96 pocillos, y a continuación se sembraron las células a 2.5×10^4 por pocillo en medio IMDM completo. Las células se incubaron a 37 °C durante 3 días y se detectó la proliferación celular mediante el kit de ensayo de viabilidad celular luminiscente CellTiter-Glo®.

[00455] Proliferación de PBMC humanas y análisis de subtipos de células T

[00456] Las PBMC humanas congeladas se descongelaron el día del experimento y se prepararon en medio IMDM completo complementado con un 10 % de FBS inactivado por calor para el ensayo de proliferación inmediatamente. Se añadieron diluciones seriadas de anticuerpos en una placa de 96 pocillos y luego se sembraron las células a 1×10^5 por pocillo. Las células se cultivaron durante 6 días a 37°C y la proliferación celular se detectó utilizando el kit de ensayo de viabilidad celular luminiscente CellTiter-Glo®.

[00457] Para el análisis de la población de células T, las células se lavaron una vez y se tiñeron con el colorante de viabilidad fijable eFluor780 durante 10 minutos a 4°C. Tras el lavado, se fijaron las células, se permeabilizaron con el conjunto de tampones de tinción del factor de transcripción Foxp3 y se tiñeron con anti-CD3-PE, anti-CD4-APC, anti-CD8α-PECy7 y anti-Ki67-FITC durante 1 hora a 4°C. Se analizó y definió la población de células T proliferativas CD4 (CD4+Ki67+) o CD8 (CD8+Ki67+) mediante el sistema EasyCyte de citometría de flujo de Guava.

[00458] Secreción de citoquinas IFN γ por parte de células T

[00459] La estirpe celular humana B7-H4 transfectada hB7-H4-CHO se sembró a 4×10^4 células por pocillo en una placa de 96 pocillos con fondo en U. Se añadieron anticuerpos diluidos en serie en cada pocillo. Se preparó una suspensión celular de células efectoras y células T humanas (aisladas de LeuPak utilizando el kit de aislamiento de células T humanas EasySep) y se sembró en una proporción deseada de células efectoras a células diana (por ejemplo, como 5:1) en cada pocillo. El cocultivo se incubó a 37 °C durante 96 horas y se recogió el medio para un ELISA de citoquinas IFN γ (I+D).

[00460] Ensayo de internalización de anticuerpos

[00461] Las células diana (como las células SK-BR-3 MDA-MB-468) se sembraron a razón de 6.000 células por pocillo en una placa de fondo plano de 96 pocillos y se incubaron durante 3 horas para permitir que las células se asentaran en una superficie plana. Se añadió en cada pocillo una mezcla de reactivo de anticuerpos/Incucyte FabFlour (Incucyte® Human Fabfluor-pH Red Labeling Dye) para el ensayo en una concentración final de 2 µg/ml. La placa de ensayo se repitió, escaneando cada hora con el sistema de análisis de células vivas Incucyte®. Las imágenes se analizaron con el software Incucyte®.

[00462] *Evaluación de la eliminación de células tumorales mediante un bioensayo ADCC de Promega*

[00463] El bioensayo ADCC Reporter utiliza células efectoras modificadas. Los ensayos se llevaron a cabo utilizando un kit de bioensayo ADCC Reporter (ADCC Reporter Bioassay G7010 para el hIgG1). Brevemente, se sembraron células diana cancerosas a 1.5×10^4 células por pozo en una placa de fondo plano de 96 pozos. Al día siguiente, se aspiró el medio de crecimiento y se añadieron en cada pocillo tampón de ensayo ADCC y series de dilución de anticuerpos. Se preparó una suspensión celular de células efectoras del Bioensayo ADCC y se sembró a una proporción deseada de células efectoras a células diana (por ejemplo, 5:1). Después de 6 horas de incubación a 37 °C, se añadió el reactivo de ensayo de luciferasa Bio-Glo™ en cada pocillo y se incubó durante 15 minutos, y se midió la señal de luminiscencia utilizando un lector de placas.

[00464] *Eliminación de células tumorales por parte de las hPBMC (ensayo de eliminación de células inmunitarias)*

[00465] Para medir la eliminación de células tumorales por parte de células inmunitarias en presencia de anticuerpos o proteínas de fusión, se estableció un modelo de cocultivo SKB-R3/hPBMC para analizar la citotoxicidad mediada por células dependientes de anticuerpos (ADCC) (análisis a corto plazo) o la eliminación de células T citotóxicas (análisis a largo plazo). Las células diana cancerosas, las células SKB-R3, se marcaron con el reactivo IncuCyte® CytoLight Red Rapid y se sembraron a razón de 5.000 células por pocillo en una placa de fondo plano de 96 pocillos. Al día siguiente, se aspiró el medio de crecimiento y se añadieron en cada pocillo IncuCyte® Annexin V Green Dye y diluciones de anticuerpos. Se preparó una suspensión celular de células efectoras, hPBMC, y se sembró en la proporción deseada de células efectoras a células diana (10:1 o 5:1). La placa de ensayo se escaneó repetidamente y las imágenes se analizaron según las instrucciones utilizando el sistema de análisis de células vivas IncuCyte® y el software IncuCyte.®

[00466] *Medición de pSTAT5 utilizando células HEK-Blue IL-2 Reporter*

[00467] Las células HEK-Blue™ IL-2 se generaron mediante la transfección estable de la estirpe celular HEK 293 de riñón embrionario humano con los genes IL-2R α , IL-2R β e IL-2R γ humanos, junto con los genes JAK3 y STAT5 humanos para obtener una vía de señalización de IL-2 totalmente funcional. Además, se introdujo un gen indicador SEAP

inducible por STAT5. Tras la estimulación de la IL-2, las células HEK-Blue™ IL-2 desencadenan la activación de STAT5 y la posterior secreción de SEAP. Los niveles de SEAP inducidos por STAT5 pueden monitorizarse fácilmente utilizando la solución QUANTI-Blue™.

[00468] Las células HEK-Blue IL-2 se mantuvieron y subcultivaron en medio DMEM completo (complementado con un 10 % de FBS inactivado por calor) con 1 µg/ml de puromicina y 1 X HEK-Blue CLR Selection. Las células se suspendieron a 2.8×10^5 /ml en medio DMEM completo para el ensayo indicador. Se añadieron primero 20 µl de los anticuerpos diluidos en serie o de los anticuerpos de fusión a cada pocillo de una placa de 96 pocillos de fondo plano y, a continuación, 180 µl de suspensión celular. Las células se incubaron a 37 °C en una incubadora de CO₂ durante 20-24 h. Los niveles de SEAP se detectaron a 630 nm siguiendo las instrucciones de la solución QUANTI-Blue™.

[00469] Nomenclatura de los anticuerpos

[00470] Un anticuerpo llamado simplemente "X" se refiere a un anticuerpo que comprende tanto una cadena variable pesada llamada "X" como una cadena variable ligera llamada "X". Por ejemplo, el anticuerpo 3F2 comprende una cadena variable ligera 3F2 y una pesada 3F2.

[00471] Un anticuerpo llamado "X/Y" comprende una cadena variable pesada llamada "X" y una cadena variable ligera "Y". Por ejemplo, el anticuerpo 3F2/50A10 comprende una cadena variable pesada 3F2 y una cadena variable ligera 50A10.

[00472] Anticuerpos de control

[00473] Se utilizaron los siguientes anticuerpos como control: (1) el anticuerpo de unión al dominio IgV de B7-H4 FPA150 (Five Prime), véase el anticuerpo "20502" en la publicación estadounidense US2019/0085080A1 ("anticuerpo 1 de control "; se une al dominio IgV de b7-H4, también denominado FPA150) (2) el anticuerpo de unión al dominio IgC de B7-H4 6H3 (Medimmune), véase el anticuerpo "6H3" en la patente estadounidense US9,574,000 ("anticuerpo 2 de control "; se une al dominio IgC de b7-H4), y (3) DP47.

[00474] **Ejemplo 2: Generación de anticuerpos anti-B7-H4 de alta afinidad**

[00475] La visualización de fagos se llevó a cabo como se ha descrito anteriormente. En primer lugar, se realizó el barrido sobre hB7-H4-Fc inmovilizado o Biotin-hB7-H4-his

capturado por microesferas de estreptavidina. Véase la Fig. 1 (Etapa 1). En esta etapa, se identificaron los siguientes anticuerpos:

[00476] (1) Anticuerpos que se unen a hB7-H4: 1A12, 1D3, 1F11, 3D1, 3F2, 4H6, 6C3, 9H2 y 4B9 (**Fig. 2** (Lote A-1)). Los anticuerpos 1A12, 1D3, 1F11, 3D1, 3F2, 4H6, 6C3 y 9H2 se unieron tanto a la hB7-H4 soluble como a la celular, específicamente al dominio IgV de la hB7-H4 (**Figs. 2-5**). 4B9 se unió fuertemente a hB7-H4-Fc pero no se unió a mB7-H4. La unión de 4B9 a hB7-H4 requirió tanto IgV como IgC (**Fig. 6**).

[00477] (2) Anticuerpos que se unen al dominio IgC del hB7-H4 de humano y de murino: 5E4, 5F4, 5G6, 9D11, 9E1, 15B11, 24B6, 24F4 y 30G4 (**Fig. 2** (Lote A-2) y **Figs. 6-7**).

[00478] (3) Anticuerpos que se unen al dominio IgV del hB7-H4 de humano y de murino: 31D7 y 39A11. Véase la **Fig. 1** (lote A-3) y la **Fig. 8**.

[00479] Las especificidades y los sitios de unión específicos de los anticuerpos aislados se resumen en la **Tabla 1**.

Tabla 1. Especificidades y sitios de unión específicos de los anticuerpos anti-B7-H4 aislados.

Anticuerpo [VH/VL]	Especificidad	Sitio de unión
1A12/1A12	Sólo hB7-H4 de humano	Dominio IgV del B7-H4 de humano
1D3/1D3	Sólo hB7-H4 de humano	Dominio IgV del B7-H4 de humano
1F11/1F11	Sólo hB7-H4 de humano	Dominio IgV del B7-H4 de humano
3D1/3D1	Sólo hB7-H4 de humano	Dominio IgV del B7-H4 de humano
3F2/3F2	Sólo hB7-H4 de humano	Dominio IgV del B7-H4 de humano
4H6/4H6	Sólo hB7-H4 de humano	Dominio IgV del B7-H4 de humano
6C3/6C3	Sólo hB7-H4 de humano	Dominio IgV del B7-H4 de humano
9H2/9H2	Sólo hB7-H4 de humano	Dominio IgV del B7-H4 de humano
4B9/4B9	Sólo hB7-H4 de humano	Los dominios IgV e IgC del B7-H4 de humano
5E4/5E4	B7-H4 de humano y de ratón	Dominio IgC de h/mB7-H4
5F4/5F4	B7-H4 de humano y de ratón	Dominio IgC de h/mB7-H4
5G6/5G6	B7-H4 de humano y de ratón	Dominio IgC de h/mB7-H4
9D11/9D11	B7-H4 de humano y de ratón	Dominio IgC de h/mB7-H4
9E1/9E1	B7-H4 de humano y de ratón	Dominio IgC de h/mB7-H4
15B11/15B11	B7-H4 de humano y de ratón	Dominio IgC de h/mB7-H4
24B6/24B6	B7-H4 de humano y de ratón	Dominio IgC de h/mB7-H4
24F4/24F4	B7-H4 de humano y de ratón	Dominio IgC de h/mB7-H4
30G4/30G4	B7-H4 de humano y de ratón	Dominio IgC de h/mB7-H4
39A11/39A11	B7-H4 de humano y de ratón	Dominio IgV de h/mB7-H4
31D7/31D7	B7-H4 de humano y de ratón	Dominio IgV de h/mB7-H4

[00480] Ejemplo 3: Cinética de unión de anticuerpos anti-B7-H4 aislados a B7-H4 soluble

[00481] La cinética de unión de los diferentes anticuerpos a sus objetivos se examinó mediante el análisis Biacore. Los resultados se resumen en **las Tablas 2-4**.

[00482] Los anticuerpos 1D3 y 3F2 se unieron fuertemente a hB7-H4 y fueron elegidos para la maduración por afinidad (transposición de la cadena ligera) (**Fig. 1** (Etapa B)). Los anticuerpos de reacción cruzada h/mB7-H4 9D11 (anticuerpo de unión al dominio IgC) y 39A11 (anticuerpo de unión al dominio IgV) se unieron fuertemente a sus objetivos y también fueron seleccionados para la maduración por afinidad (transposición de la cadena ligera) (**Fig. 1** (Etapa B)).

Tabla 2. Unión de los anticuerpos de unión al dominio IgV hB7-H4 indicados a hB7-H4-Fc y hB7-H4-his. No se observó ninguna unión para mB7-H4-Fc o mB7-H4-his. n/a = no determinado. *Los anticuerpos 1D3 y 3F2 fueron elegidos para la maduración por afinidad (transposición de la cadena ligera).

Anticuerpo	Cinética de unión del hB7-H4-Fc			Cinética de unión para hB7-H4-his		
	k_a	k_d	K_D	k_a	k_d	K_D
1A12	1.41E+05	5.04E-04	3.57E-09	2.36E+05	5.83E-04	2.47E-09
1D3*	9.02E+05	7.26E-04	8.05E-10	1.01E+06	5.58E-04	5.51E-10
1F11	1.75E+06	2.91E-03	1.66E-09	4.38E+06	4.88E-03	1.11E-09
3D1	1.12E+06	2.49E-03	2.23E-09	1.36E+05	3.88E-03	2.85E-08
3F2*	1.12E+07	1.06E-03	9.51E-11	1.19E+08	1.01E-02	8.49E-11
4B9	4.10E+05	1.18E-03	2.89E-09	4.90E+04	2.02E-04	4.13E-09
4H6	5.51E+05	1.57E-03	2.86E-09	9.03E+05	3.61E-03	4.00E-09
6C3	1.29E+05	1.40E-03	1.09E-08	3.15E+05	1.99E-03	6.30E-09
9H2	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d

Tabla 3. Unión de anticuerpos anti-h/mB7-H4 a hB7-H4-Fc y hB7-H4-his. n/a = no disponible. Se eligió el anticuerpo 39A11 para la maduración por afinidad (transposición de la cadena ligera).

Anticuerpo	Cinética de unión del hB7-H4-Fc			Cinética de unión para hB7-H4-his		
	k_a	k_d	K_D	k_a	k_d	K_D
5E4	3.87E+05	4.52E-03	1.17E-08	4.53E+05	4.55E-03	1.00E-08
5F4	1.92E+05	2.88E-03	1.50E-08	1.99E+05	3.29E-03	1.66E-08
5G6	1.87E+05	2.26E-03	1.21E-08	3.77E+05	1.96E-03	5.19E-09
9D11	3.74E+05	6.74E-04	1.80E-09	6.47E+05	5.49E-04	8.50E-10
9E1	2.72E+05	3.72E-03	1.37E-08	7.11E+05	5.62E-03	7.91E-09
15B11	1.84E+05	7.84E-04	4.26E-09	1.11E+05	5.73E-04	5.17E-09
24B6	n/d			1.49E+05	7.89E-04	5.30E-09
24F4				2.68E+04	5.20E-03	1.94E-07
30G4				1.15E+05	6.94E-04	6.05E-09

39A11*	7.27E+05	6.74E-04	9.26E-10	n/d
31D7	8.97E+05	7.66E-04	8.54E-10	

Tabla 4. Unión de anticuerpos anti-h/mB7-H4 a mB7-H4-Fc y mB7-H4-his. n/a = no determinado. Se eligió el anticuerpo 39A11 para la maduración por afinidad (transposición de la cadena ligera).

Anticuerpo	Cinética de unión para mB7-H4-Fc			Cinética de unión para mB7-H4-his		
	k_a	k_d	K_D	k_a	k_d	K_D
5E4	1.97E+05	2.79E-03	1.41E-08	1.17E+06	1.06E-02	9.09E-09
5F4	2.40E+05	2.86E-03	1.19E-08	2.56E+05	3.84E-03	1.50E-08
5G6	2.00E+05	2.61E-03	1.31E-08	2.86E+05	2.24E-03	7.83E-09
9D11	6.99E+05	4.49E-04	6.42E-10	1.85E+05	2.81E-04	1.52E-09
9E1	3.09E+05	3.28E-03	1.06E-08	2.81E+05	3.49E-03	1.24E-08
15B11	2.76E+05	9.80E-04	3.55E-09	1.18E+05	7.29E-04	6.17E-09
24B6	n/d			1.62E+05	5.52E-04	3.40E-09
24F4				1.07E+05	3.14E-03	2.92E-08
30G4				9.54E+04	6.09E-04	6.38E-09
39A11	7.30E+05	1.11E-03	1.53E-09	n/d		
31D7	8.88E+05	1.43E-03	1.61E-09			

[00483] Ejemplo 4: Maduración por afinidad de los anticuerpos anti-B7-H4 3F2 y 1D3 (anticuerpos de unión al dominio IgV del hB7-H4) mediante la transposición de la cadena ligera

[00484] La maduración por afinidad de 3F2 y 1D3 se llevó a cabo mediante el emparejamiento de cadenas ligeras. Para ello, las cadenas pesadas de 3F2 o 1D3, respectivamente, se emparejaron con una biblioteca que comprendía $>1.0 \times 10^8$ cadenas ligeras (véase **la Fig. 1** (etapas B-1 y B-2)). Las bibliotecas resultantes se analizaron en hB7-H4-Fc inmovilizado o Biotin-hB7-H4-his capturado por microesferas de estreptavidina en condiciones de dificultad como se describe en el Ejemplo 1. Las secuencias de los derivados 3F2 y 1D3 aislados se muestran en **la Tabla 5**.

[00485] Los derivados 3F2 aislados 3F2/50A10 y 3F2/49A2 tenían la misma secuencia de cadena pesada que el 3F2, pero una secuencia de cadena ligera diferente a la del 3F2 (**Fig. 1** (Lote B-1)). Al igual que su anticuerpo parental, los derivados 3F2/50A10 y 3F2/49A2 sólo se unieron al dominio IgV de hB7-H4. Los derivados 3F2/50A10 y 3F2/49A2 mostraron una mayor unión al B7-H4 de humano celular que el anticuerpo parental 3F2 (**Tabla 6**).

[00486] Los derivados 1D3 1D3/47B2 y 1D3/45A2 aislados en tenían la misma secuencia de cadena pesada que el 1D3, pero una secuencia de cadena ligera diferente a la del 1D3 (**Fig. 1** (Lote B-2)). Al igual que su anticuerpo parental, los derivados 1D3/47B2 y 1D3/45A2 sólo

se unieron al dominio IgV de hB7-H4. Los derivados 1D3/47B2 y 1D3/45A2 mostraron una mayor unión al B7-H4 de humano celular que el anticuerpo parental 1D3 (**Tabla 6**).

[00487] La unión de estos anticuerpos a B7-H4 soluble y celular se muestra en **las Figs. 9-10**.

Tabla 5. Secuencia de CDR de la cadena ligera para los anticuerpos 3F2 y 1D3 y sus respectivos derivados.

Anticuerpo VL	SEQ ID NO	LCDR1	SEQ ID NO	LCDR2	SEQ ID NO	LCDR3
3F2	20	RASQSISSYLN	21	SSLQS	22	QQSYSTPLT
50A10	70	QASQDISNYIN	71	SRLQS	72	QQSYRSPFT
49A2	66	RASQNIDTYVN	67	SRLHT	68	QQSYTSPFT
Motivos CDR de 3F2	73	X ₁ ASQX ₂ IX ₃ X ₄ YX ₅ N En el que: X ₁ es R o Q X ₂ es D, N o S X ₃ es D o S X ₄ es N, S o T X ₅ es I, L o V	74	SX ₆ LX ₇ X ₈ En el que: X ₆ es R o S X ₇ es H o Q X ₈ es S o T	75	QQSYX ₉ X ₁₀ PX ₁₁ T En el que: X ₉ es R, S o T X ₁₀ es S o T X ₁₁ es F o L
1D3	8	RASRSIYTWLA	9	STLQS	10	QQSYSTPYT
47B2	81	RASQTVYTWLA	82	TNLAT	83	QQSYSTSWT
45A2	77	RASQNIYTWLA	78	TNLPT	79	QQSYSTRWT
Motivos CDR 1D3	84	RASX ₁₂ X ₁₃ X ₁₄ YTWLA En el que: X ₁₂ es Q o R X ₁₃ es N, S o T X ₁₄ es I o V	85	X ₁₅ X ₁₆ LX ₁₇ X ₁₈ En el que: X ₁₅ es S o T X ₁₆ es N o T X ₁₇ es A, P o Q X ₁₈ es S o T	86	QQSYSTX ₁₉ X ₂₀ T En el que: X ₁₉ es P, R o S X ₂₀ es W o Y

Tabla 6. Propiedades de unión del anticuerpo 3F2 (anticuerpo de unión al dominio IgV del hB7-H4) y sus derivados y del anticuerpo 1D3 (específico para el dominio IgV del hB7-H4) y sus derivados.

Anticuerpo (VH/VL)	EC50, nM		Cinética de unión para hB7-H4			EC50, nM		Cinética de unión para mB7-H4		
	SK-BR-3	hB7-H4	K _a	K _d	K _D	mB7-H4/CT26	mB7-H4	K _a	K _d	K _D
3F2/3F2	0.84	0.048	1.59E+07	1.30E-03	8.19E-11	No es vinculante				
3F2/50A10	0.41	0.046	1.07E+07	4.13E-04	3.85E-11					
3F2/49A2	0.79	0.056	8.12E+06	1.22E-04	1.50E-11					
1D3/1D3	18.6	0.044	6.37E+05	4.94E-04	7.75E-10					
1D3/47B2	36.0	0.078	5.85E+05	1.22E-04	2.09E-10					
1D3/45A2	52.1	0.041	2.32E+05	7.36E-05	3.17E-10					

[00488] Ejemplo 5: Maduración por afinidad del anticuerpo anti-B7-H4 9D11

(anticuerpo de unión al dominio IgC h/mB7-H4) por transposición de la cadena ligera

[00489] La maduración por afinidad de la 9D11 se llevó a cabo mediante transposición de cadenas ligeras. Para ello, la cadena pesada de 9D11 se emparejó con una biblioteca que comprendía $>1.0 \times 10^8$ cadenas ligeras. Véase **la Fig. 1** (Etapa B-3). La biblioteca resultante se barrió en hB7-H4-Fc inmovilizado o Biotin-hB7-H4-his capturado por microesferas de estreptavidina en condiciones de dificultad como se describe en el Ejemplo 1. Véase **la Fig. 1** (Etapa B). Las secuencias de los derivados 9D11 aislados se muestran en **la Tabla 7**.

[00490] Los derivados aislados de 9D11 9D11/67E12, 9D11/67C3, 9D11/67C6, 9D11/67H9, 9D11/67G3 y 9D11/68F5 tienen la misma secuencia de cadena pesada que 9D11, pero una secuencia de cadena ligera diferente a la de 9D11 (**Fig. 1** (Lote B-3)). Las afinidades de unión de estos anticuerpos se muestran en **la Tabla 8**, la unión de estos anticuerpos a B7-H4 soluble y celular se muestra en **las Figs. 11-13**.

Tabla 7. Secuencias de CDR de la cadena ligera para el anticuerpo 9D11 y sus derivados.

Anticuerpo VL	SEQ ID NO	LCDR1	SEQ ID NO	LCDR2	SEQ ID NO	LCDR3
9D11	50	KSSQSVLYSSNNKNYLA	51	STRES	2	QQYFSTPS
67E12	88	KSSQSVLYSSNNKNYLA	89	SKRVS	90	QQYFDSPT
67C6	92	KSSQSVLSSSNKNYLA	93	STRQS	94	QQYYSDPT
67C3	96	KSSQSVLYSSNNKNYLA	97	STRAS	98	QQYYDTPT
68F5	108	KSSRSVLSRSNNKNYLA	109	STRQF	110	QQYYDTPT
67G3	100	KSSQSVLSSSNKNYLA	101	STRQS	102	QQYYTSPT
67H9	104	RSSQSVLYSSNNKNYLA	105	SNRKS	106	QQYYSAPT
9D11 Motivos CDR	111	X ₂₁ SSX ₂₂ SVLX ₂₃ X ₂₄ SNNKNYLA En el que: X ₂₁ es K o R X ₂₂ es Q o R X ₂₃ es S o Y X ₂₄ es R o S	112	SX ₂₅ RX ₂₆ X ₂₇ Donde: X ₂₅ es K, N, T X ₂₆ es A, E, K, Q o V X ₂₇ es F o S	113	QQYX ₂₈ X ₂₉ X ₃₀ PX ₃₁ En el que: X ₂₈ es F o Y X ₂₉ es D, S o T X ₃₀ es A, D, S o T X ₃₁ es S o T

Tabla 8. Propiedades de unión del anticuerpo 9D11 (anticuerpos de unión al dominio IgC h/mB7-H4) y sus derivados.

Anticuerpo (VH/VL)	EC50, nM		Cinética de unión para hB7-H4		
	SK-BR-3	hB7-H4	K _a	K _d	K _D
9D11/9D11	125.9	0.180	3.72E+05	2.22E-03	5.97E-09
9D11/67E12	8.08	0.203	1.04E+05	6.54E-04	6.30E-09
9D11/67C6	9.20	0.115	4.25E+04	6.36E-04	1.50E-08
9D11/67C3	4.06	0.112	3.45E+04	3.94E-04	1.14E-08
9D11/67G3	22.5	0.261	1.44E+05	1.53E-03	1.06E-08
9D11/68F5	9.53	0.778*	1.18E+05	8.42E-04	7.15E-09
9D11/68H9	24.0	0.100	1.52E+05	1.08E-03	7.09E-09
Anticuerpo (VH/VL)	EC50, nM		Cinética de unión para mB7-H4		
	mB7-H4/CT26	mB7-H4	K _a	K _d	K _D
9D11/9D11	122.4	0.104	4.28E+05	2.05E-03	4.78E-09
9D11/67E12	16.7	0.110	1.65E+05	7.67E-04	4.66E-09
9D11/67C6	45.7	0.082	3.36E+04	9.41E-05	2.80E-09
9D11/67C3	28.2	0.086	3.11E+04	3.23E-04	1.04E-08
9D11/67G3	45.3	0.162	1.91E+05	1.61E-03	8.46E-09
9D11/68F5	31.8	0.145*	1.52E+05	9.03E-04	5.96E-09
9D11/68H9	54.3	0.105	1.75E+05	1.06E-03	6.08E-09

[00491] Ejemplo 6: Maduración de la afinidad del anticuerpo anti-B7-H4 39A11

(anticuerpo de unión al dominio IgV h/mB7-H4) por transposición de la cadena ligera

[00492] La maduración por afinidad de la 39A11 se llevó a cabo mediante la transposición de cadenas ligeras. Para ello, la cadena pesada de 39A11 se emparejó con una biblioteca que comprendía $>1.0 \times 10^8$ cadenas ligeras. Véase **la Fig. 1** (etapa B-4). La biblioteca resultante se escudriñó en hB7-H4-Fc inmovilizado o Biotin-hB7-H4-his capturado por microesferas de estreptavidina en condiciones de dificultad como se describe en el Ejemplo 1 (**Fig. 1 (Etapas B)**). Las secuencias de los derivados 39A11 aislados se muestran en **la Tabla 9**.

[00493] Los derivados aislados de 39A11 39A11/57H3, 39A11/57G8, 39A11/56A9, 39A11/56H7 y 39A11/62F9 tienen la misma secuencia de cadena pesada que 39A11, pero una secuencia de cadena ligera diferente a la de 39A11 (**Fig. 1** (Lote B-4)). Al igual que el parental 39A11, todos los derivados sólo se unieron al dominio IgV del B7-H4 de humano y de ratón. Los derivados del 39A11 mostraron en general una mayor unión al B7-H4 de humano celular que el anticuerpo parental 39A11. La unión de estos anticuerpos a B7-H4 soluble y celular se muestra en **la Tabla 10** y en **las Figs. 14-15**.

Tabla 9. Secuencia de CDR de la cadena ligera para el anticuerpo 39A11 y sus derivados.

Anticuerpo VL	SEQ ID NO	LCDR1	SEQ ID NO	LCDR2	SEQ ID NO	LCDR3
39A11	62	RASQTIRSYLN	63	SHLQS	64	QQSYTTPYT
57H3	115	QASQDIRKYLN	116	STRES	117	QQYYSLPLT
57G8	119	RASQSIRSYLN	120	SSLQS	121	QQYYSTPLT
56A9	123	RASQSISSYLN	124	SIRES	125	QQYYTTPLT
56H7	127	RASQSISSYLN	128	SNLQS	129	QQYYTTPLT
62F9	131	RASQSVSSAVA	132	SIRES	133	QQYYSTPLT
Motivo CDR	134	X ₃₂ ASQX ₃₃ X ₃₄ X ₃₅ X ₃₆ X ₃₇ X ₃₈ X ₃₉ En el que: X ₃₂ es Q o R X ₃₃ es D, S o T X ₃₄ es I o V X ₃₅ es R o S X ₃₆ es K o S X ₃₇ es A o Y X ₃₈ es L o V X ₃₉ es A o N	135	SX ₄₀ X ₄₁ X ₄₂ S En el que: X ₄₀ es H, I, N, S o T X ₄₁ es L o R X ₄₂ es E o Q	136	QQX ₄₃ YX ₄₄ X ₄₅ PX ₄₆ T En el que: X ₄₃ es S o Y X ₄₄ es S o T X ₄₅ es L o T X ₄₆ es L o Y

Tabla 10. Propiedades de unión del anticuerpo 39A11 (anticuerpo de unión al dominio IgV h/mB7-H4) y sus derivados.

Anticuerpo (VH/VL)	EC50, nM		Cinética de unión para hB7-H4		
	SK-BR-3	hB7-H4	K _a	K _d	K _D
39A11/39A11	4.17	0.080	1.73E+06	1.81E-03	1.05E-09
39A11/57H3	2.07	0.086	6.16E+05	2.95E-04	4.78E-10
39A11/57G8	1.90	0.068	8.63E+05	2.61E-04	3.03E-10
39A11/56A9	2.53	0.081	5.73E+05	6.91E-04	1.21E-09
39A11/56H7	2.85	0.061	5.14E+05	4.00E-04	7.79E-10
39A11/62F9	1.31	0.079	7.33E+05	6.25E-04	8.53E-10
Anticuerpo (VH/VL)	EC50, nM		Cinética de unión para mB7-H4		
	mB7-H4/CT26	mB7-H4	K _a	K _d	K _D
39A11/39A11	6.73	0.136	5.21E+06	6.80E-02	1.30E-08
39A11/57H3	1.63	0.128	5.00E+05	6.22E-07	1.25E-12
39A11/57G8	1.22	0.096	9.69E+05	9.66E-05	9.98E-11
39A11/56A9	1.85	0.130	7.37E+05	1.02E-06	1.38E-12
39A11/56H7	1.67	0.107	6.30E+05	1.38E-07	2.19E-13
39A11/62F9	1.32	0.124	4.55E+05	8.41E-04	1.85E-09

[00494] Los tres primeros anticuerpos 3F2/50A10 (anticuerpo de unión al dominio IgV de hB7-H4), 39A11/57G8 (anticuerpo de unión al dominio IgV de h/mB7-H4) y 9D11/68F5 (anticuerpo de unión al dominio IgC de h/mB7-H4) de los **Ejemplos 3-6** fueron elegidos para una mayor caracterización.

[00495] Ejemplo 7: Unión de anticuerpos anti-B7-H4 a B7-H4 soluble y expresado en células

[00496] La unión de los anticuerpos 3F2/50A10 (anticuerpo de unión al dominio IgV del hB7-H4), 39A11/57G8 (anticuerpo de unión al dominio IgV del h/mB7-H4) y 9D11/68F5 (anticuerpo de unión al dominio IgC del h/mB7-H4) al B7-H4 soluble o al B7-H4 expresado en células se determinó mediante ELISA o citometría de flujo, respectivamente.

[00497] Los experimentos de ELISA demostraron que ambos anticuerpos 3F2/50A10 y 39A11/57G8 se unían fuertemente al dominio IgV de hB7-H4. El anticuerpo 39A11 reaccionó de forma cruzada con el mB7-H4. El anticuerpo 9D11/68F5 se unió al dominio IgC del B7-H4 de humano y de ratón (**Fig. 16**).

[00498] Los experimentos de citometría de flujo demostraron que ambos anticuerpos 3F2/50A10 y 39A11/57G8 se unieron fuertemente a la hB7-H4 celular expresada en la estirpe celular de cáncer de mama triple negativo MDA-MB-468 y en la estirpe celular de cáncer de ovario SK-BR-3. Los anticuerpos 39A11/57G8 y 9D11/68F5 también se unieron al

mB7-H4 celular expresado en la estirpe celular de cáncer de colon de ratón CT26 transfectada con mB7-H4 (**Fig. 17**).

[00499] Ejemplo 8: Los anticuerpos anti-B7-H-4 provocan la internalización de B7-H4

[00500] Los anticuerpos específicos para los antígenos de la superficie celular pueden inducir la endocitosis mediada por el antígeno del complejo anticuerpo/antígeno. Para determinar si la unión de los anticuerpos anti-B7-H-4 3F2/50A10 (anticuerpo de unión al dominio IgV del hB7-H4), 39A11/57G8 (anticuerpo de unión al dominio IgV del h/mB7-H4) y 9D11/68F5 (anticuerpo de unión al dominio IgC del h/mB7-H4) a su objetivo conduce a la internalización del complejo anticuerpo/antígeno, se utilizó un reactivo de etiquetado de anticuerpos IncuCyte® FabFluor. FabFluor es un fragmento Fab dirigido a la región Fc conjugado con una sonda fluorescente sensible al pH. Se observa una señal fluorogénica cuando el complejo Fab-Ab se internaliza y se procesa a través de los lisosomas y endosomas ácidos (pH 4.5-5.5).

[00501] El anticuerpo de dominio IgC 9D11/68F5 y el anticuerpo de dominio IgV 39A11/57G8 desencadenaron la internalización al unirse a B7-H4 (**Fig. 18**).

[00502] Ejemplo 9: Los anticuerpos anti-B7-H-4 restauran la función de las células T

[00503] La unión del B7-H4 expresado en las células a su receptor afín (desconocido) en las células T inhibe la función de secreción de citoquinas de las células T. Por consiguiente, se probó en si los anticuerpos anti-B7-H-4 3F2/50A10 (anticuerpo de unión al dominio IgV de hB7-H4), 39A11/57G8 (anticuerpo de unión al dominio IgV de h/mB7-H4) y 9D11/68F5 (anticuerpo de unión al dominio IgC de h/mB7-H4) pueden restaurar la función de secreción de citocinas de las células T (por ejemplo, la secreción de IFN γ) al interrumpir la interacción de B7-H4 con su receptor afín en las células T.

[00504] Los anticuerpos de unión a IgV 39A11/57G8 y 3F2/50A10 mostraron una gran potencia en la restauración de la función de las células T, medida por la secreción de IFN γ (**Fig. 19**).

[00505] Ejemplo 10: Los anticuerpos anti-B7-H-4 eliminan las células tumorales

[00506] Para determinar la capacidad de los anticuerpos anti-B7-H4 3F2/50A10 (anticuerpo de unión al dominio IgV de hB7-H4), 39A11/57G8 (anticuerpo de unión al dominio IgV de h/mB7-H4) y 9D11/68F5 (anticuerpo de unión al dominio IgC de h/mB7-

H4) para eliminar células tumorales, se utilizó un bioensayo de citotoxicidad mediada por células dependientes de anticuerpos (ADCC) (Promega G7010/G7018). El ensayo funciona de la siguiente manera: Cuando el receptor FcγRIIIa de la superficie celular de las células efectoras (por ejemplo, un linfocito citolítico natural) se une a la porción efectora Fc de un anticuerpo unido a su diana en, por ejemplo, una célula cancerosa, se produce la reticulación de la célula efectora y la célula cancerosa. Esto conduce a la activación de la ADCC. El ensayo indicador ADCC empleado en este experimento detecta una etapa temprana en la activación de la vía ADCC: la activación de la transcripción de genes a través de la vía NFAT (factor nuclear de células T activadas) en la célula efectora. Además, el ensayo utiliza células Jurkat modificadas que expresan de forma estable la variante V158 (alta afinidad) del receptor FcγRIIIa y un elemento de respuesta NFAT que impulsa la expresión de luciferasa de luciérnaga como células efectoras.

[00507] Los tres anticuerpos probados fueron eficaces para eliminar tanto las células SK-BR-3 como las MDA-MB-468 (**Fig. 20**).

[00508] También se evaluó la eliminación de células tumorales mediante un ensayo de eliminación de células inmunitarias IncuCyte®. Para ello, se creó un modelo de co-cultivo SKBR3/hPBMC para analizar la ADCC.

[00509] Los anticuerpos de unión al dominio IgV 3F2/50A10 y 39A11/57G8, pero no el anticuerpo de control negativo DP47, fueron eficaces para eliminar las células cancerosas SK-BR-3 cuando se mezclaron con hPBMCs (**Fig. 21**).

[00510] Ejemplo 11: Propiedades de unión de los anticuerpos anti-B7-H4 seleccionados

[00511] La cinética de unión al antígeno se determinó para los anticuerpos anti-B7-H4 3F2/50A10 (anticuerpo de unión al dominio IgV de hB7-H4), 39A11/57G8 (anticuerpo de unión al dominio IgV de h/mB7-H4) y 9D11/68F5 (anticuerpo de unión al dominio IgC de h/mB7-H4) (**Tablas 11 y 12**). Estos experimentos se realizaron como un experimento separado de los análisis Biacore descritos anteriormente.

Tabla 11. Propiedades de unión del anticuerpo 39A11 y sus derivados. El Ab1 fue el anticuerpo de unión al dominio IgV de B7-H4 FPA150 (Five Prime). El Ab2 fue el anticuerpo de unión al dominio IgC del B7-H4 6H3 (Medimmune).

Anticuerpo (VH/VL)	EC50, nM		Cinética de unión al hB7-H4		
	SK-BR-3	hB7-H4	K _a	K _d	K _D
3F2/50A10	1.18	0.082	8.67E+06	3.93E-04	4.54E-11
9D11/68F5	3.53	0.105	7.20E+04	2.13E-04	2.96E-09
39A11/57G8	2.82	0.060	9.18E+05	1.40E-04	1.52E-10
control Ab1 (+)	2.64	0.106	5.33E+05	2.66E-04	4.99E-10
control Ab2 (+)	3.37	0.222	2.04E+05	1.28E-04	6.26E-10

Tabla 12. Propiedades de unión del anticuerpo 39A11 y sus derivados. El Ab1 fue el anticuerpo de unión al dominio IgV de B7-H4 FPA150 (Five Prime). El Ab2 fue el anticuerpo de unión al dominio IgC del B7-H4 6H3 (Medimmune).

Anticuerpo (VH/VL)	EC50, nM		Cinética de unión a mB7-H4		
	mB7-H4/CT26	mB7-H4	K _a	K _d	K _D
3F2/50A10	ND	ND	8.67E+06	3.93E-04	4.54E-11
9D11/68F5	9.41	0.144	7.20E+04	2.13E-04	2.96E-09
39A11/57G8	7.82	0.051	9.18E+05	1.40E-04	1.52E-10
control Ab1 (+)	2.06	0.139	5.33E+05	2.66E-04	4.99E-10
control Ab2 (+)	18.36	0.289	2.04E+05	1.28E-04	6.26E-10

[00512] Ejemplo 12: Construcción de proteínas de fusión con anticuerpos anti-B7-H4

[00513] Se generaron varias proteínas de fusión heterodiméricas, terminal C, que comprendían anticuerpos anti-B7-H4 (**Tabla 13**). Como se ilustra en la **Fig. 1B**, las **proteínas de fusión comprendían** una primera cadena pesada (que comprendía del terminal C al terminal N una región variable y una región constante), una segunda cadena pesada (que comprendía desde el terminal N hasta el C una región variable, una región constante, un dominio sushi de IL-15Ralpha, y una IL-15), y dos cadenas ligeras. La heterodimerización se logró mediante la introducción de la mutación denominada "botones en ojales" (CW-CSAV) en la región Fc del anticuerpo, que estabiliza aún más el heterodímero. La mutación "LS" (M428L/N434S) aumenta la afinidad por el FcRn y disminuye la tasa K_{off} a pH 6, lo que permite prolongar la vida media en suero. Por último, la mutación N65S en la IL-15 reduce la capacidad de la IL-15 para estimular la proliferación de linfocitos.

Tabla 13. Estructura de las proteínas de fusión. HC1 = cadena pesada 1. HC2 = cadena pesada 2. WT = tipo silvestre. El Ab1 fue el anticuerpo de unión al dominio IgV B7-H4 FPA150 (Five Prime).

Anticuerpo utilizado en la proteína de fusión (VH/VL)	Antígeno	Proteína de fusión	HC1		HC2			Mutación de la región constante	LC	
			Nombre	SEQ ID NO	Nombre	SEQ ID NO	IL-15		Nombre	SEQ ID NO
Anticuerpo 1 de control (+) (20502)	Dominio IgV de h/m B7-H4	Ab1/IL15 (+)	20502 HC1	147	20502 HC-2	154	N65S	HC1: S354C, T366W; HC2: Y349C, T366S, L368A, Y407V	20502 LC	143
39A11/ 57G8	Dominio IgV de h/m B7-H4	39A11/57G8-IL15 (también llamado 57G8/IL15)	39A11 HC1	148	39A11-HC2	155	N65S	HC1: S354C, T366W; HC2: Y349C, T366S, L368A, Y407V	57G8 LC	144
39A11/ 57G8	Dominio IgV de h/m B7-H4	39A11/57G8-IL15-LS (también llamado 57G8/IL15-LS)	39A11 HC1-LS	149	39A11-HC2-LS	156	N65S	HC1: S354C, T366W; M428L, N434S HC2: Y349C, T366S, L368A, Y407V, M428L, N434S	57G8 LC	144
3F2/ 50A10	Dominio IgV del hB 7-H4	3F2/50A10-IL15 (también llamado 50A10/IL15)	3F2 HC1	150	3F2 HC1	157	N65S	HC1: S354C, T366W; HC2: Y349C, T366S, L368A, Y407V	50A10 LC	145
3F2/ 50A10	Dominio IgV del hB 7-H4	3F2/50A10-IL15-LS (también llamado 50A10/IL15-LS)	3F2 HC1-LS	151	3F2 HC2-LS	158	N65S	HC1: S354C, T366W; M428L, N434S HC2: Y349C, T366S, L368A, Y407V, M428L, N434S	50A10 LC	145
DP47	Antígeno de control irrelevante	DP47/IL15	DP47 HC1	152	DP47 HC2	159	N65S	HC1: S354C, T366W; HC2: Y349C, T366S, L368A, Y407V	DP47 LC	146
DP47	Antígeno de control irrelevante	DP47/IL15-LS	DP47 HC1-LS	153	DP47 HC2-LS	160	N65S	HC1: S354C, T366W; M428L, N434S HC2: Y349C, T366S, L368A, Y407V, M428L, N434S	DP47 LC	146

[00514] Ejemplo 13: Unión de proteínas de fusión que comprenden anticuerpos anti-B7-H4 a B7-H4 soluble

[00515] La unión de las proteínas de fusión 57G8/IL15 y 50A10/IL15 a la B7-H4 soluble se determinó mediante Biacore y ELISA. Los resultados del análisis de Biocore se muestran en **la Tabla 14**.

[00516] Al igual que su anticuerpo parental, la proteína de fusión 50A10/IL15 sólo se unió a hB7-H4 (dominio IgV) y 57G8/IL15 se unió a h/m B7-H4 (dominio IgV) (véase **la Tabla 14** y **las Figs. 22 y 23**). No se observó ninguna diferencia significativa para la unión a B7-H4 soluble entre el anticuerpo y el anticuerpo de fusión tanto en ELISA como en Biacore.

Tabla 14. Afinidad de unión (K_D [M]) de las proteínas de fusión que comprenden anticuerpos anti-B7-H4 para su unión a B7-H4 soluble. Ab1(+) = anticuerpo de unión al dominio IgV de B7-H4 FPA150 (Five Prime).

	Ab1 (+)	Ab/IL15 (+)	39A11/57G8	57G8/IL15	3F2/50A10	50A10/IL15
Anticuerpo	✓		✓		✓	
Proteína de fusión		✓		✓		✓
hB7-H4 Fc	4.50E-10	6.47E-10	1.07E-10	2.19E-10	4.33E-11	1.01E-10
hB7-H4 su	1.10E-10	1.80E-10	3.55E-11	4.54E-11	1.55E-11	2.59E-11
mB7-H4 Fc	5.09E-10	7.61E-10	5.18E-11	1.07E-10	No es vinculante	

[00517] Ejemplo 14: Unión de proteínas de fusión que comprenden anticuerpos anti-B7-H4 a B7-H4 expresado en células

[00518] La unión de las proteínas de fusión al B7-H4 expresado en las células se evaluó mediante FACS. El anticuerpo 3F2/50A10 y la proteína de fusión 3F2/50A10 se unieron al B7-H4 de humano expresado en SK-BR-3 (**Figs. 24A y 24C**). El anticuerpo 39A11/57G8 y la proteína de fusión 57G8/IL15 se unieron al B7-H4 de humano y de ratón expresado en el SK-BR-3 y en el mB7-H4-CT26, respectivamente (**Figs. 24B y 24D**).

[00519] Ambos anticuerpos 39A11/57G8 y 3F2/50A10 se unieron a B7-H4 expresado en la estirpe celular de cáncer de mama triple negativo MDA-MB-468 y en la estirpe celular de cáncer de mama triple negativo MX-1 (**Fig. 25 y Tabla 15**). La proteína de fusión IL-15 que comprende 39A11/57G8 o 3F2/50A10, respectivamente, también se unió a B7-H4 expresado

en MDA-MB-468 y MX-1 con una afinidad similar a la de su respectivo anticuerpo monoespecífico parental (Fig. 25 y Tabla 15).

Tabla 15. Valores EC50 para la unión de los anticuerpos y proteínas de fusión indicados a B7-H4 expresados en células MDA-MB-468 y MX-1.

	39A11/57G8	3F2/50A10	57G8/IL-15	50A10/IL-15
Anticuerpo	✓	✓		
Proteína de fusión			✓	✓
MDA-MB-468 EC50 [nM]	13.07	0.416	29.63	0.398
Células MX-1 EC50 [nM]	8.87	0.120	24.79	0.162

[00520] Ejemplo 15: Las proteínas de fusión que comprenden anticuerpos anti-B7-H4 eliminan las células tumorales en un modelo de co-cultivo de células tumorales/hPBMC

[00521] La capacidad de las proteínas de fusión que comprenden anticuerpos anti-B7-H-4 para eliminar las células tumorales se evaluó mediante un ensayo de eliminación de células inmunitarias IncuCyte®. Para ello, se estableció un modelo de co-cultivo SKBR3/hPBMC o un modelo de co-cultivo MDA-MB-468/hPBMC para analizar la ADCC. La eliminación de células tumorales se probó en una proporción menor de células efectoras y células diana (5:1); el crecimiento celular se monitorizó con Incucyte hasta 96 horas.

[00522] Las proteínas de fusión 57G8/IL15 y 50A10/IL15 mostraron una mayor eliminación que sus anticuerpos parentales 39A11/57G8 y 3F2/50A10, respectivamente. Las proteínas de fusión 50A10/IL15 y 57G8/IL15 mostraron una mayor eliminación que la fusión no dirigida DP47/IL15 (Fig. 26).

[00523] Tras un tratamiento de 7 días con las proteínas de fusión 57G8/IL15 o 50A10/IL15, respectivamente, la mayoría de las células MDA-MB-468 murieron (Fig. 26E).

[00524] Ejemplo 16: Efecto de las proteínas de fusión que comprenden anticuerpos anti-B7-H4 sobre la proliferación de hPBMC

[00525] Se determinó el efecto de los anticuerpos 39A11/57G8 y 3F2/50A10, así como de las proteínas de fusión 57G8/IL15 y 50A10/IL15 sobre la proliferación de las hPBMC. Se utilizó como control el anticuerpo DP47 y una proteína de fusión de IL-15 que incluía DP47. Todas las fusiones mostraron una capacidad similar para inducir la proliferación de linfocitos

en las PBMC humanas, que no expresan B7-H4 (**Fig. 27A**). Se expandieron más células T CD8⁺ que células T CD4⁺ (**Figs. 27B y 27C**).

[00526] Ejemplo 17: Las proteínas de fusión que comprenden anticuerpos anti-B7-H4 activan la vía de señalización STAT5

[00527] Se examinó la capacidad de las proteínas de fusión 57G8/IL15 y 50A10/IL115 para activar la vía de señalización p-STAT5 a través de los receptores de IL-2. Se utilizó como control una proteína de fusión de IL-15 que incluía DP47. Todas las fusiones mostraron una potencia similar para activar la vía STAT5 secuencia abajo del IL-2R $\beta\gamma$ (**Fig. 28**).

[00528] Ejemplo 18: Las proteínas de fusión que comprenden anticuerpos anti-B7-H4 eliminan las células tumorales en un bioensayo de Promega

[00529] La capacidad de las proteínas de fusión 57G8/IL15 y 50A10/IL115 para eliminar células tumorales se evaluó mediante un bioensayo de citotoxicidad mediada por células dependientes de anticuerpos (ADCC) (Promega).

[00530] Los anticuerpos 39A11/57G8 y 3F2/50A10, así como las proteínas de fusión 57G8/IL15 y 50A10/IL15 desencadenaron la ADCC mediada por B7-H4 de las células SK-Br-3 y MDA-MB-468 (**Fig. 29**). En las células MDA-MB-468, 3F2/50A10 y 50A10/IL-15 mostraron una función ADCC más fuerte que 39A11/57G8 y 57G8/IL-15 debido a la mayor unión del anticuerpo a B7-H4 expresado en las células MDA-MB-468.

[00531] Ejemplo 19: Unión de proteínas de fusión (que comprenden anticuerpos anti-B7-H4 y una mutación LS) a B7-H4 soluble

[00532] La mutación "LS" (M428L/N434S) en la región constante de un anticuerpo aumenta la afinidad por el FcRn y disminuye la tasa K_{off} a pH 6, lo que conduce a una mayor vida media en suero.

[00533] Las proteínas de fusión 57G8/IL-15, 57G8/IL-15_LS, 50A10/IL-15 y 50A10/IL-15_LS se unieron al B7-H4Fc de humano soluble y al B7-H4his de humano. No se observaron diferencias en la unión de estas cuatro proteínas de fusión (**Figs. 30A y 30C**). Sólo las proteínas de fusión 57G8/IL-15 y 57G8/IL-15_LS se unieron al B7-H4Fc soluble de ratón y al B7-H4his de ratón. No se observaron diferencias en la unión de 57G8/IL-15_LS y 57G8/IL-15 (**Figs. 30B y 30D**).

[00534] Ejemplo 20: Unión de proteínas de fusión (que comprenden anticuerpos anti-B7-H4 y una mutación LS) a B7-H4 expresado en células

[00535] La unión de las proteínas de fusión a la B7-H4 expresada en las células se evaluó mediante FACS.

[00536] Las proteínas de fusión 57G8/IL-15, 57G8/IL-15_LS, 50A10/IL-15 y 50A10/IL-15_LS se unieron a la célula tumoral humana expresada B7-H4. Las proteínas de fusión 50A10/IL-15 y 50A10/IL-15_LS muestran una mayor unión a las células SK-BR-3 que las proteínas de fusión 57G8/IL-15 o 57G8/IL-15_LS (**Fig. 31A**). Las proteínas de fusión 57G8/IL-15 y 57G8/IL-15_LS se unieron al B7-H4 de ratón transfectado en la estirpe celular tumoral murina CT-26 (**Fig. 31B**). No se observó ninguna diferencia en la unión de 57G8/IL-15_LS en comparación con 57G8/IL-15 o de 50A10/IL-15_LS en comparación con 50A10/IL-15 (**Fig. 31**).

[00537] Ejemplo 21: Capacidad de las proteínas de fusión (que comprenden anticuerpos anti-B7-H4 y una mutación LS) para inducir la proliferación de células M07e dependientes de IL-2

[00538] Se determinó la capacidad de las proteínas de fusión 57G8/IL-15, 57G8/IL-15_LS, 50A10/IL-15 y 50A10/IL-15_LS para inducir la proliferación de las células M07e dependientes de IL-2. Todas las fusiones fueron capaces de inducir la proliferación de las células M07e (**Fig. 32**).

[0100] Secuencias

Tabla 16. Anticuerpos que se unen al dominio IgV del B7H4 de humano (3F2 y derivados)

Tipo	3F2	Tipo	3F2	49A2	50A10	3F2 motivo CDR
	SEQ ID NO:		SEQ ID NO:	SEQ ID NO:	SEQ ID NO:	SEQ ID NO:
VH	15	VL	19	65	69	
CDR1H	16	CDR1L	20	66	70	73
CDR2H	17	CDR2L	21	67	71	74
CDR3H	18	CDR3L	22	68	72	75

Tabla 17. Anticuerpos que se unen al dominio IgV del B7H4 de humano (1D3 y derivados)

Tipo	1D3	Tipo	1D3	45A2	47B2	Motivo CDR 1D3
	SEQ ID NO:		SEQ ID NO:	SEQ ID NO:	SEQ ID NO:	SEQ ID NO:
VH	3	VL	7	76	80	
CDR1H	4	CDR1L	8	77	81	84
CDR2H	5	CDR2L	9	78	82	85
CDR3H	6	CDR3L	10	79	83	86

Tabla 18. Anticuerpos que se unen al dominio IgC del hB7-H4 de humano y de murino (9D11 y derivados)

Tipo	9D11	Tipo	9D11	67E12	67C6	67C3	67G3	67H9	68F5	9D11 Motivo CDR
	SEQ ID NO:		SEQ ID NO:	SEQ ID NO:	SEQ ID NO:	SEQ ID NO:	SEQ ID NO:	SEQ ID NO:	SEQ ID NO:	SEQ ID NO:
VH	45	VL	49	87	91	95	99	103	107	
CDR1H	46	CDR1L	50	88	92	96	100	104	108	111
CDR2H	47	CDR2L	51	89	93	97	101	105	109	112
CDR3H	48	CDR3L	52	90	94	98	102	106	110	113

Tabla 19. Anticuerpos que se unen al dominio IgV del hB7-H4 de humano y de murino (39A11 y derivados)

Tipo	39A11	Tipo	39A11	57H3	57G8	56A9	56H7	62F9	39A11 Motivo CDR
	SEQ ID NO:		SEQ ID NO:	SEQ ID NO:	SEQ ID NO:	SEQ ID NO:	SEQ ID NO:	SEQ ID NO:	SEQ ID NO:
VH	57	VL	61	114	118	122	126	130	
CDR1H	58	CDR1L	62	115	119	123	127	131	134
CDR2H	59	CDR2L	63	116	120	124	128	132	135
CDR3H	60	CDR3L	64	117	121	125	129	133	136

Tabla 20. Secuencias de anticuerpos.

Anticuerpo	Descripción	SEQ ID NO:	Secuencia
Unión de anticuerpos a dominio IgV de B7H4 de humano			
1A12	VH	1	EVQLLESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDDSKNTLYLQMN SLKTEDTAVYYCARHGWDAFDIWGQGT LVTVSS
1A12	VL	2	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISNRLNWFYQQKPGKAPKLLIYLASSLQGGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFA TYYCQQAISFPLTFGGGTKVEIK
1D3	VH	3	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAAS GFTFNTHAMH WVRQAPGKGLEWVSA ISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDISKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCAR LLGRFGEYGM DVWGQGT TTVTVSS
1D3	CDR1H	4	GFTFNTHAMH
1D3	CDR2H	5	AISGSGGSTYYADSVKG
1D3	CDR3H	6	LLGRFGEYGM DV
1D3	VL	7	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRAS RSIYTWLAWY QQKPGKAPKLLIYDAST LQ SGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFA TYYC QQSYSTPYT TFGGGTKVEIK
1D3	CDR1L	8	RASRSIYTWLA
1D3	CDR2L	9	STLQ S
1D3	CDR3L	10	QQSYSTPYT
1F11	VH	11	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGDTFTTYQIHWVRQAPGGGLEWMGGIMPIFGTTKYAQNFQGRVTITADESTSTAYMELS SLRSED TAVYYCARRNYGMDVWGQGT TTVTVSS
1F11	VL	12	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLYRPVNKNFLAWYQQKPGQPPKLLIYWASTRSGVPDRFSGSGSGTDFTLTISL QAEDVATYFCQQYYSTPITFGQGTKVEIK
3D1	VH	13	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGYSFISYAITWVRQAPGGGLEWIGGINPIFGTAKYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELS SLRSED TAVYYCAKGQALIQHWGQGT LVTVSS
3D1	VL	14	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLSSNNKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISL QAEDVAVYYCQQYYSTPLAFGQGTKVEIK
3F2	VH	15	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKAS GYTFTAQYMY WVRQAPGGGLEWMGRIN PTSGNTVYAQKLQGRVTMTRDTSTSTVYMELS SLRSED TAVYYCARGIN WFD PWGQGT LVTVSS
3F2	CDR1H (Numeración de índice EU)	16	GYTFTAQYMY

Anticuerpo	Descripción	SEQ ID NO:	Secuencia
3F2	CDR2H (Numeración de índice EU)	17	RINPTSGNTVYAQKLQG
3F2	CDR3H (Numeración de índice EU)	18	GINWFDP
3F2	CDR1H (Numeración de índice EU de Kabat)	172	AQYMY
3F2	CDR2H (Numeración de índice EU de Kabat)	173	RINPTSGNTVYAQKLQG
3F2	CDR3H (Numeración de índice EU de Kabat)	174	GINWFDP
3F2	CDR1H (IGMT)	178	GYTFTAQY
3F2	CDR2H (IGMT)	179	INPTSGNT
3F2	CDR3H (IGMT)	180	ARGINWFDP
3F2	CDR1H (Chothia)	184	GYTFTAQ
3F2	CDR2H (Chothia)	185	PTSG

Anticuerpo	Descripción	SEQ ID NO:	Secuencia
3F2	CDR3H (Chothia)	186	INWFD
3F2	VL	19	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFA TYYCQQSYSTPLTFGGGKVEIK
3F2	CDR1L	20	RASQSISSYLN
3F2	CDR2L	21	SSLQS
3F2	CDR3L	22	QQSYSTPLT
4H6	VH	23	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTSSYGMHWVRQAPGKLEWVSGISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCARTQWRASLDPWGQGTLVNVSS
4H6	VL	24	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDISYWLAWYQQKPGKAPKLLIYGASTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFA TYYCQQTTMSPYTFGGGKVEIK
6C3	VH	25	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTSSYAMHWVRQAPGKLEWVASISGTGFTTRYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCARGGWFRDTPVDYWGGTTLTVSS
6C3	VL	26	DIVMTQSPSLPVTGPGEPAISCRSSQSLLHSNGYNYLDWYLQKPGQSPQLLIYGASSLRSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVE AZDVGYYCMQASHWPPTFGGTRLEIK
9H2	VH	27	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVCKASGGTFSTYAINWVRQAPGGLEWMGGINPMFGTARYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELS SLRSED TAVYYCARGRLHRHWGGTTLTVSS
9H2	VL	28	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSL QAEDVAVYYCQQYYTTPITFGGTRLEIK
Unión de anticuerpos tanto de dominio IgV como IgC de B7H4 de humano			
4B9	VH	29	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVCKASGYTFTSYMHWRQAPGGLEWMGMNPN SGNTGYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELS SLRSED TAVYYCARGQGRYLNYYMDVWGKGT TTVSS
4B9	VL	30	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRVSQGISNYLAWYQQKPGKAPKLLIYDASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFA TYYCQQSYSTPFTFGPGTKVDIK
Unión de anticuerpos al dominio IgC de hB7-H4 de humano y de murino			
15B11	VH	31	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVCKASGYTFTGYYIHWRQAPGGLEWMGMNPHSGHTGYAQN LQGRVTMTRDTSTSTVYMELS SLRSED TAVYYCARVKVTTGFDYWGGTTLTVSS
15B11	VL	32	DIVMTQSPSLPVTGPGEPAISCRSSQSLLHSNGYNYLDWYLQKPGQSPQLLIYLG SNRASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVE AEDVGYYCMQGTHWPPTFGGKLEIK
24B6	VH	33	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVCKASGYTFTGYYMHWRQAPGGLEWIGWMNPN SGTGYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELS SLRSED TAVYYCAKVGAYGGMDVWG GTTVTVSS

Anticuerpo	Descripción	SEQ ID NO:	Secuencia
24B6	VL	34	DIVMTQSPLSLPVTGPGEPAISCRSSQSLLSHNGYNYLDWYLQKPGQSPQLLIYGGSNRASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQGTHWPPTFGPGTKVDIK
24F4	VH	35	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGYRFTGDYIHWRQAPGQGLEWMGWMNPNSGNTGLAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSLRSEDTAVYYCARVLGFGSGMDVWGQGTITVTVSS
24F4	VL	36	DIVMTQSPLSLPVTGPGEPAISCRSSQSLLSHNGYNYLDWYLQKPGQSPQLLIYAASSLRSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQGTHWPPTFGQGTKLEIK
30G4	VH	37	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFSSYYMHWRQAPGQGLEWMGWMNPNSGDTGYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSLRSEDTAVYYCARVPETGGMDVWGQGTITVTVSS
30G4	VL	38	DIVMTQSPLSLPVTGPGEPAISCRSSQSLLSHNGYNYLDWYLQKPGQSPQLLIYGASSLHSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQGTHWPPTFGQGTKVEIK
5E4	VH	39	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTSYDINWRQAPGQGLEWMGWMNPNSGNTGYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSLRSEDTAVYYCARGELWFGEDYDDYYGMDVWGQGTITVTVSS
5E4	VL	40	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASQSISSYLNWYQKPKGKAPKLLIYGASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQADRIPFTFGRGTKVEIK
5F4	VH	41	EVQLLESGLLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMHWVRQAPGKGLEWVSAIGGSGRTTYADSVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCARERGSYGQIDYWGQGTITVTVSS
5F4	VL	42	DIVMTQSPLSLPVTGPGEPAISCRSSQSLLSHNGYNYLDWYLQKPGQSPQLLIYAASSLQSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQGAHWPLTFGQGTKVEIK
5G6	VH	43	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTSYMHWRQAPGQGLEWLGVNPNNTGTTTFAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSLRSEDTAVYYCARDANYYYGMDVWGQGTMTVTVSS
5G6	VL	44	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVATYYCQKYNALPITFGQGTREIK
9D11	VH	45	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTSYGISWVRQAPGQGLEWGVINPNGGTTTYAQTFQGGRVTMTRDTSTSTVYMELSLRSEDTAVYYCARTGYSSGWAFFDYWGRGTLTVTVSS
9D11	CDR1H	46	GYTFTSYGIS
9D11	CDR2H	47	VINPNGGTTTYAQTFQG
9D11	CDR3H	48	TGYSSGWAFFDY
9D11	VL	49	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQYFSTPSFGQGTKVEIK
9D11	CDR1L	50	KSSQSVLYSSNNKNYLA
9D11	CDR2L	51	STRES

Anticuerpo	Descripción	SEQ ID NO:	Secuencia
9D11	CDR3L	52	QQYFSTPS
9E1	VH	53	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYLHWVRQAPGGGLEWMGWINPNSGGTNSAQRFAQGRVTMTTRDTSTSTVYMELS SLRSEDVAVYYCARVRGYEGGMDVWGQGTITVTVSS
9E1	VL	54	DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLLHSGNYLDWYLQKPGQSPQLLIYLGSNRASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVE AEDVGVYYCMQGSHPPTFGQGTREIK
Unión de anticuerpos al dominio IgV de hB7-H4 de humano y de murino			
31D7	VH	55	EVQLLESGGGLVQPGGSXRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVSSISSSSSYIYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCARIGSGGSLDYWGQGTITVTVSS
31D7	VL	56	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASQISINWLAWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFA TYYCQQSYTIPITFGQGTREIK
39A11	VH	57	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAAS GFTFSSYGMH WVRQAPGKGLEWVA SISSSSGYIYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCAR ASSGMDV WGQGTITVTVSS
39A11	CDR1H	58	GFTFSSYGMH
39A11	CDR2H	59	SISSSSGYIYYADSVKG
39A11	CDR3H	60	ASSGMDV
39A11	VL	61	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITIC RASQTIRSYLN WYQQKPGKAPKLLIYAAS HLQ SGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFA TYYC QQSYTTPYTF GQGTREIK
39A11	CDR1L	62	RASQTIRSYLN
39A11	CDR2L	63	SHLQS
39A11	CDR3L	64	QQSYTTPYT
Union de anticuerpos a derivados hB7-H4: 3F2			
49A2	VL	65	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITIC RASQNIDTYVN WYQQKPGKAPKLLIYAAS RSLHT VPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFAT YYC QQSYTSPFT FGGGTKVEIK
49A2	CDR1L	66	RASQNIDTYVN
49A2	CDR2L	67	SRLHT
49A2	CDR3L	68	QQSYTSPFT
50A10	VL	69	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITIC QASQDISNYIN WYQQKPGKAPKLLIYAAS RSLQSG VPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFA TYYC QQSYRSPFT FGQGTREIK

Anticuerpo	Descripción	SEQ ID NO:	Secuencia
50A10	CDR1L (Numeración de índice EU)	70	QASQDISNYIN
50A10	CDR2L (Numeración de índice EU)	71	SRLQS
50A10	CDR3L (Numeración de índice EU)	72	QQSYRSPFT
50A10	CDR1L (Numeración de índice EU de Kabat)	175	SQDISNY
50A10	CDR2L (Numeración de índice EU de Kabat)	176	AAS
50A10	CDR3L (Numeración de índice EU de Kabat)	177	SYRSPF
50A10	CDR1L (IGMT)	181	SQDISNY
50A10	CDR2L (IGMT)	182	AAS
50A10	CDR3L (IGMT)	183	SYRSPF
50A10	CDR1L (Chothia)	187	QASQDISNYIN

Anticuerpo	Descripción	SEQ ID NO:	Secuencia
50A10	CDR2L (Chothia)	188	AASRLQS
50A10	CDR3L (Chothia)	189	QQSYRSPFT
Motivo CDR 3F2	CDR1L	73	X ₁ ASQX ₂ IX ₃ X ₄ YX ₅ N En donde: X ₁ es R o Q X ₂ es D, N, o S X ₃ es D o S X ₄ es N, S, o T X ₅ es I, L, o V
Motivo CDR 3F2	CDR2L	74	SX ₆ LX ₇ X ₈ En donde: X ₆ es R o S X ₇ es H o Q X ₈ es S o T
Motivo CDR 3F2	CDR3L	75	QQSYX ₉ X ₁₀ PX ₁₁ T En donde: X ₉ es R, S, o T X ₁₀ es S o T X ₁₁ es F o L
Union de anticuerpos a derivados de hB7-H4: 1D3			
45A2	VL	76	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQNIYTWLAWYQQKPGKAPKLLIYDATNLPTGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC QQSYSTRWT FGGGTKVEIK
45A2	CDR1L	77	RASQNIYTWLA
45A2	CDR2L	78	TNLPT
45A2	CDR3L	79	QQSYSTRWT
47B2	VL	80	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQTVYTWLAWYQQKPGKAPKLLIYDATNLATGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC QQSYSTSWT FGGGTKVEIK

Anticuerpo	Descripción	SEQ ID NO:	Secuencia
47B2	CDR1L	81	RASQTVYTWLA
47B2	CDR2L	82	TNLAT
47B2	CDR3L	83	QQSYSTSWT
Motivo CDR 1D3	CDR1L	84	RASX ₁₂ X ₁₃ X ₁₄ YTWLA En donde: X ₁₂ es Q o R X ₁₃ es N, S, o T X ₁₄ es I o V
Motivo CDR 1D3	CDR2L	85	X ₁₅ X ₁₆ LX ₁₇ X ₁₈ En donde: X ₁₅ es S o T X ₁₆ es N o T X ₁₇ es A, P, o Q X ₁₈ es S o T
Motivo CDR 1D3	CDR3L	86	QQSYSTX ₁₉ X ₂₀ T En donde: X ₁₉ es P, R, o S X ₂₀ es W o Y
Union de anticuerpos a dominio IgC de derivados hB7-H4: 9D11 de humano y de murino			
67E12	VL	87	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWASKRVS ~~SGVPDR~~ FSGSGSGTDFTLTIS SLQAEDVAVYYCQQYFDSPTFGQGTKVEIK
67E12	CDR1L	88	KSSQSVLYSSNNKNYLA
67E12	CDR2L	89	SKRVS
67E12	CDR3L	90	QQYFDSPT
67C6	VL	91	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLSSSNKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWASTRQS ~~SGVPDR~~ FSGSGSGTDFTLTIS SLQAEDVAVYYCQQYYSDPTFGQGTKVEIK
67C6	CDR1L	92	KSSQSVLSSSNKNYLA
67C6	CDR2L	93	STRQS
67C6	CDR3L	94	QQYYSDPT
67C3	VL	95	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWASTRAS ~~SGVPDR~~ FSGSGSGTDFTLTIS SLQAEDVAVYYCQQYYDTPTFGQGTKVEIK

Anticuerpo	Descripción	SEQ ID NO:	Secuencia
67C3	CDR1L	96	KSSQSVLYSSNNKNYLA
67C3	CDR2L	97	STRAS
67C3	CDR3L	98	QQYYDTPT
67G3	VL	99	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLSSSNNKNYLA ^{WY} QQKPGQPPKLLIYWASTRQSGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQ AEDVAVYYC QQYYTSPT FGGQTKVEIK
67G3	CDR1L	100	KSSQSVLSSSNNKNYLA
67G3	CDR2L	101	STRQS
67G3	CDR3L	102	QQYYTSPT
67H9	VL	103	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRSSQSVLYSSNNKNYLA ^{WY} QQKPGQPPKLLIYWASNRKSGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQ AEDVAVYYC QQYYSAPT FGGQTKVEIK
67H9	CDR1L	104	RSSQSVLYSSNNKNYLA
67H9	CDR2L	105	SNRKS
67H9	CDR3L	106	QQYYSAPT
68F5	VL	107	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSRSVLSRSNNKNYLA ^{WY} QQKPGQPPKLLIYWASTRQFGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQ AEDVAVYYC QQYYDTPT FGGQTKVEIK
68F5	CDR1L	108	KSSRSVLSRSNNKNYLA
68F5	CDR2L	109	STRQF
68F5	CDR3L	110	QQYYDTPT
Motivo CDR 9D11	CDR1L	111	$X_{21}SSX_{22}SVLX_{23}X_{24}SNNKNYLA$ En donde: X_{21} es K o R X_{22} es Q o R X_{23} es S o Y X_{24} es R o S
Motivo CDR 9D11	CDR2L	112	$SX_{25}RX_{26}X_{27}$ En donde: X_{25} es K, N, T X_{26} es A, E, K, Q, o V X_{27} es F o S
Motivo CDR 9D11	CDR3L	113	QQYX ₂₈ X ₂₉ X ₃₀ PX ₃₁

Anticuerpo	Descripción	SEQ ID NO:	Secuencia
			En donde: X_{28} es F o Y X_{29} es D, S, o T X_{30} es A, D, S, o T X_{31} es S or T
Union de anticuerpos a dominio IgV de derivados hB7-H4: 39A11 de humano y de murino			
57H3	VL	114	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC QASQDIRKYL NWYQQKPGKAPKLLIYAAS TRES GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFA TYYC QQYYSLPL TFGQGTKLEIK
57H3	CDR1L	115	QASQDIRKYLN
57H3	CDR2L	116	STRES
57H3	CDR3L	117	QQYYSLPLT
57G8	VL	118	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC RASQSIRSYL NWYQQKPGKAPKLLIYYA SSLQ SGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFA TYYC QQYYSTPL TFGQGTKVEIK
57G8	CDR1L	119	RASQSIRSYLN
57G8	CDR2L	120	SSLQS
57G8	CDR3L	121	QQYYSTPLT
56A9	VL	122	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC RASQSISSYL NWYQQKPGKAPKLLIYAAS SIRES GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFA TYYC QQYYTTPL TFGQGTKLEIK
56A9	CDR1L	123	RASQSISSYLN
56A9	CDR2L	124	SIRES
56A9	CDR3L	125	QQYYTTPLT
56H7	VL	126	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC RASQSISSYL NWYQQKPGKAPKLLIYAAS SNLQ SGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFA TYYC QQYYTTPL TFGQGTKLEIK
56H7	CDR1L	127	RASQSISSYLN
56H7	CDR2L	128	SNLQS
56H7	CDR3L	129	QQYYTTPLT
62F9	VL	130	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC RASQSVSSAVA WYQQKPGKAPKLLIYAAS SIRES GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFA TYYC QQYYSTPL TFGQGTKLEIK
62F9	CDR1L	131	RASQSVSSAVA
62F9	CDR2L	132	SIRES

Anticuerpo	Descripción	SEQ ID NO:	Secuencia
62F9	CDR3L	133	QQYYSTPLT
Motivo CDR 39A11	CDR1L	134	$X_{32}ASQX_{33}X_{34}X_{35}X_{36}X_{37}X_{38}X_{39}$ En donde: X_{32} es Q o R X_{33} es D, S, o T X_{34} es I o V X_{35} es R o S X_{36} es K o S X_{37} es A o Y X_{38} es L o V X_{39} es A o N
Motivo CDR 39A11	CDR2L	135	$SX_{40}X_{41}X_{42}S$ En donde: X_{40} es H, I, N, S, o T X_{41} es L o R X_{42} es E o Q
Motivo CDR 39A11	CDR3L	136	$QQX_{43}YX_{44}X_{45}PX_{46}T$ En donde: X_{43} es S o Y X_{44} es S o T X_{45} es L o T X_{46} es L o Y
Anticuerpos de control			
Anticuerpo 1 de control (anticuerpo 20502 descrito en el documento US20190085080A1)	VH	137	QLQLQESGPGGLVVKPSETLSLTCTVSGGSIKSGSYYWGWIRQPPGKGLEWIGNIYYSGSTYYNPSLRSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAREG SYPNQFDPWGQGTLTVSS

Anticuerpo	Descripción	SEQ ID NO:	Secuencia
Anticuerpo 1 de control (anticuerpo 20502 descrito en el documento US20190085080A1)	VL	138	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSNLAWYQQKPGQAPRLLIYGASTRATGIPARFSGSGSGTEFTLTISSLQSEDFAVYYCQQYHSFPFTFGGGTKVEIK
Anticuerpo 2 de control (anticuerpo 6H3 descrito en el documento US9,574,000)	VH	139	EVQLQQSGPVLVKPGTSVKMSCKASGYFTDYIMNWKQSHGKSLEWIGVINPYNGDTTYNQKFKGKATLTVDKSSSTAYMEVNSLTFEDSAVYYCARYPESTYWGQGLTVTSA
Anticuerpo 2 de control (anticuerpo 6H3 descrito en el documento US9,574,000)	VL	140	DVVMQTPLSLPVSLGDAQISCRSSQSLVHINGNTYLHWYLQKPGQSPKVLIIYKVSNRFSGVPDFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYFCSQSTHVPLTFGAGTKLELK
DP47	VH	141	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWWSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGSQFDYWGQGLTVTVSS
DP47	VL	142	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPLTFGQGTKVEIK

Table 21. Secuencias de proteínas de fusión.

Proteína de fusión	VH		VL		HC1		HC2		LC	
	Nombre	SEQ ID NO	Nombre	SEQ ID NO	Nombre	SEQ ID NO	Nombre	SEQ ID NO	Nombre	SEQ ID NO
Ab1/IL15 (+)	20502 VH	137	20502 VL	138	20502 HC1	147	20502 HC-2	154	20502 LC	143
39A11/57G8-IL15 (también llamado 57G8/IL15)	39A11 VH	57	57G8 VL	118	39A11 HC1	148	39A11-HC2	155	57G8 LC	144
39A11/57G8-IL15-LS (también llamado 57G8/IL15-LS)	39A11 VH	57	57G8 VL	118	39A11 HC1-LS	149	39A11-HC2-LS	156	57G8 LC	144
3F2/50A10-IL15 (también llamado 50A10/IL15)	3F2 VH	15	50A10 VL	69	3F2 HC1	150	3F2 HC1	157	50A10 LC	145
3F2/50A10-IL15-LS (también llamado 50A10/IL15-LS)	3F2 VH	15	50A10 VL	69	3F2 HC1-LS	151	3F2 HC2-LS	158	50A10 LC	145
DP47/IL15	DP47 VH	141	DP47 VL	142	DP47 HC1	152	DP47 HC2	159	DP47 LC	146
DP47/IL15-LS	DP47 VH	141	DP47 VL	142	DP47 HC1-LS	153	DP47 HC2-LS	160	DP47 LC	146

Table 22. Secuencias de proteínas de fusión.

Descripción	Utilizado en proteína de fusión	Tipo	Anotación	SEQ ID NO:	Secuencia
20502 LC (anticuerpo 1 de control)	Ab1/IL15 (+)	LC	<u>20502 VL</u>	143	<u>EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSNLAWYQQKPGQAPRLLIYGASTRATGIPARFSGSGSGTEFTLT</u> <u>ISSLQSEDFAVYYCQYHSPFTFGGGTKVEIK</u> RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQW KVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
57G8 LC	39A11/57G8-IL15 y	LC	<u>57G8 VL</u>	144	<u>DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSIRSYLNWYQQKPGKAPKLLIYYASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLT</u> <u>ISSLQPEDFATYYCQYYSTPLTFGGGTKVEIK</u> RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQW KVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Descripción	Utilizado en proteína de fusión	Tipo	Anotación	SEQ ID NO:	Secuencia
	39A11/57G8-IL15-LS				
50A10 LC	3F2/50A10-IL15 y 3F2/50A10-IL15-LS	LC	<u>50A10 VL</u>	145	<u>DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCQASQDISNYINWYQQKPGKAPKLLIYAASRLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYRSPFTFGQGTKLEIK</u> RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
DP47 LC	DP47/IL15 y DP47/IL15-LS	LC	<u>DP47 VL</u>	146	<u>EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGGSSPLTFGQGTKEIK</u> RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
20502 HC1	Ab1/IL15 (+)	HC1	<u>20502 VH</u>	147	<u>QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSIKSGSYWGWIROPKGLWIGNIYYSGSTYYNPSLRSVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAREGSYPNQFDPWGQGLVTVSS</u> ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
39A11 HC1	39A11/57G8-IL15	HC1	<u>39A11 VH</u>	148	<u>EVQLLESQGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLWVASISSSSGYIYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARASSGMDVWGQGTITVTVSS</u> ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Descripción	Utilizado en proteína de fusión	Tipo	Anotación	SEQ ID NO:	Secuencia
39A11 HC1-LS	39A11/57G8-IL15-LS	HC1	<u>Mutación LS</u> <u>39A11 VH</u>	149	<i>EVQLLES GGG L V Q P G G S L R L S C A A S G F T F S S Y G M H W R Q A P G K G L E W V A I S S S S G Y I Y Y A D S V K G R F T I S R D N S</i> <i>K N T L Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A R A S S G M D V W G Q G T T V T V S S</i> ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTWNSGALTSKVHFFPAVLQSSGLYSLSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVLHEALHSHYTKQKSLSPGK
3F2 HC1	3F2/50A10-IL15	HC1	<u>3F2 VH</u>	150	<i>QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTF TAQYMYWVRQAPGQGLEWMGRINPTSGNTVYAQKLQGRVTMTRDTS</i> <i>TSTVYME L S S L R S E D T A V Y Y C A R G I N W F D P W G Q G T L V T V S S</i> ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTWNSGALTSKVHFFPAVLQSSGLYSLSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH EALHNHYTQKSLSPGK
3F2 HC1-LS	3F2/50A10-IL15-LS	HC1	<u>Mutación LS</u> <u>3F2 VH</u>	151	<i>QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTF TAQYMYWVRQAPGQGLEWMGRINPTSGNTVYAQKLQGRVTMTRDTS</i> <i>TSTVYME L S S L R S E D T A V Y Y C A R G I N W F D P W G Q G T L V T V S S</i> ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTWNSGALTSKVHFFPAVLQSSGLYSLSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVLHEALHSHYTKQKSLSPGK
DP47 HC1	DP47/IL15	HC1		152	<i>EVQLLES GGG L V Q P G G S L R L S C A A S G F T F S S Y A M S W R Q A P G K G L E W S A I S G S G G S T Y Y A D S V K G R F T I S R D N S</i> <i>K N T L Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A K G S G F D Y W G Q G T L V T V S S A S T K G P S V F P L A P S S K S T S G G T A A L G C L V K D Y F P E</i> <i>P V T V S W N S G A L T S G V H T F P A V L Q S S G L Y S L S S V T V P S S S L G T Q T Y I C N V N H K P</i>

Descripción	Utilizado en proteína de fusión	Tipo	Anotación	SEQ ID NO:	Secuencia
					SNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQS LWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSL SPGK
DP47 HC1-LS	DP47/IL15-LS	HC1	<u>Mutación LS</u>	153	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVASISGGSGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTL YLQMNSLRAEDTAVYYCAKSGGFDYWGQGT LTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPS VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPV LSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVLHEALHSHYTKSLSLSPGK
20502 HC-2	Ab1/IL15 (+)	HC2	<u>20502 VH</u> <u>Dominio sushi IL-15Ra</u> <u>Enlazador</u> IL-15	154	<u>QLQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSIKSGSYWGWIRPPGKGLEWIGNIYYSGSTYYNPSLRSRVTISVDTSKNQ</u> <u>FSLKLSSVTAADTAVYYCAREGSYPNQFDPWGQGT LTVVSS</u> ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELL LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW LNKKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSPRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGSCPPPMSEHADIWVKSYSLYSRER <u>YICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHWTPSLKC</u> IRDPALVHQRPAAPSGGSGGGSGGGSGGGSLQNWVNVISD LKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLELQVISLES GDASIHDTVESLIILANNSLSSNGNVTESGCKE CEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS
39A11-HC2	fusión de 39A11/57G8-IL15	HC2	<u>39A11 VH</u> <u>Dominio sushi IL-15Ra</u> <u>Enlazador</u>	155	<u>EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVASISSSSGYIYYADSVKGRFTISRDNKNTL</u> <u>YLQMNSLRAEDTAVYYCARASSGMDVWGQGT VTVVSS</u> ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHK

Descripción	Utilizado en proteína de fusión	Tipo	Anotación	SEQ ID NO:	Secuencia
			IL-15		PSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP IEKTIKAKGQPREPQVCTLPSPRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGSCPPPMSEHA <u>DIWVKSYSLSRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHWTTPSLKC</u> IRDPALVHQRPA PPSGSGGGGSGGGSGGGSLQNWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMK CFLLELQVISLESGDASIHDVTVESLIILANNSLSSNGNVTESGCKECELEEKNIKEFLQSFV HIVQMFINTS
39A11-HC2-LS	fusión de 39A11/57G8- IL15-LS	HC2	<u>Mutación LS</u> <u>39A11 VH</u> <u>Dominio sushi</u> <u>IL-15Rα</u> <u>Enlazador</u> IL-15	156	<u>EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTSSYGMHWVRQAPGKGLEWVASISSSGYIYYADS</u> <u>VKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARASSGMDVWGQGTITVTVSS</u> ASTKGPSVFP LAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPS SSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSPRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVLHEALHSHYTQKSLS LSPGSCPPPMSEHAD <u>IWVKSYSLSRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHWTTPS</u> <u>LKC</u> IRDPALVHQRPAAPPSSGSGGGGSGGGSGGGSLQNWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLY TESDVHPSCKVTAMKCFLLELQVISLESGDASIHDVTVESLIILANNSLSSNGNVTESGCKECE ELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS
3F2 HC1	fusión de 3F2/50A10- IL15	HC2	<u>3F2 VH</u> <u>Dominio sushi</u> <u>IL-15Rα</u> <u>Enlazador</u> IL-15	157	<u>QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTAQYMYWVRQAPGQGLEWMGRINPTSGNTVYAQK</u> <u>LQGRVTMTTRDTSTSTVYMESSLRSEDTAVYYCARGINWFDPWGQGTITVTVSS</u> ASTKGPSVFP LAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPS SSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSPRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLS LSPGSCPPPMSEHAD <u>IW</u>

Descripción	Utilizado en proteína de fusión	Tipo	Anotación	SEQ ID NO:	Secuencia
					VKSYSLYSRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHWTTPSLKC IRDPALV HQRPAAPSGGGSGGGSGGGSGGGSLQNWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTE SDVHPSCKVTAMKCFLELQVISLES GDASIHDTVESLIILANNSLSSNGNVTES GCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS
3F2 HC2-LS	39A11/57G8-IL15-LS	HC2	<u>Mutación LS</u> <u>3F2 VH</u> <u>Dominio sushi</u> <u>IL-15Rα</u> <u>Enlazador</u> IL-15	158	<u>QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTAQYMYWVRQAPGQGLEWMGRINPTS</u> <u>GNTVYAQKLQGRVTMTRDTSTSTVYMESSLRSED TAVYYCARGINWFDPWGQGT</u> <u>LVTVSS</u> ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCD KTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP IEKTISKAKGQPREPQVCTLPSSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTTPVLDSGDSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVLHEALHSHYTQKSL SLSPGSCPPPMSEHADIWVKSYSLYSRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKAT NVAHWTTPSLKC IRDPALVHQRPAAPSGGGSGGGSGGGSGGGSLQNWVNVISDL KKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLELQVISLES GDASIHDTVE SLIILANNSLSSNGNVTESGCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS
DP47 HC2	DP47/IL15	HC2	<u>DP47 VH</u> <u>Dominio sushi</u> <u>IL-15Rα</u> <u>Enlazador</u> IL-15	159	<u>EVQLLES GGLVQPGGSLRLS CAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSG</u> <u>GSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKSGGFDYWGGTL</u> <u>VTVSS</u> ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV HTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDK THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVCTLPSSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTTPVLDSGDSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLS LSPGSCPPPMSEHADIWVKSYSLYSRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATN VAHWTTPSLKC IRDPALVHQRPAAPSGGGSGGGSGGGSGGGSLQNWVNVISDLK KIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLELQVISLES GDASIHDTVES LIILANNSLSSNGNVTESGCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS

Descripción	Utilizado en proteína de fusión	Tipo	Anotación	SEQ ID NO:	Secuencia
DP47 HC2-LS	DP47/IL15-LS	HC2	<u>Mutación LS</u> <u>Dominio sushi</u> <u>IL-15Rα</u> <u>Enlazador</u> IL-15	160	EVQLEESGGGLVQPGGSRLESCAAAGPTFSSTAMSWVRQAPGKGLLEWVSAISGSG GSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGGGFDYWGQGT VTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV HTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDK THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVCTLPSSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTTPVLDSGSSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFCSVLHEALHSHYTKSLS LSPGSCPPPMSEHADIWVKSYSLSRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATN VAHWTTPSLKCIRDPALVHQRAPPSSGGSGGGSGGGSGGGSLQNWNVISDLK KIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCCKVTAMKCFLELQVISLESGLDASIHDTVES LIILANNSLSSNGNVTESGCKECELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS

Tabla 23. Otras secuencias de proteínas.

Proteína	SEQ ID NO:	Secuencia
B7-H4 de humano (# de acceso NCBI: NP_078902) <u>péptido señal</u> Dominio IgV Dominio IgC región de transmembrana	161	<u>MASLGQILFWSIISIILLAGAIALIIGFGISGRHSITVTTVASAGNIGEDGILSCTFEPDIKL</u> <u>SDIVIQWLKEGVLGLVHEFKEGKDELSEQDEMFRGRTAVFADQVIVGNASRLKNVQLTDAGTYK</u> <u>CYIITSKGGKGNANLEYKTGAFSMPEVNVNASSSETLRCEAPRWFPQPTVWASQVDQGANFSEV</u> <u>SNTSFELNSENVTMKVSVLYNVTINNTYSCMIENDIAKATGDIKVTSEIKRRSHLQLLNSKAS</u> <u>LCVSSFFAISWALLPLSPYMLK</u>
B7-H4 de murino (# de acceso NCBI: Q7TSP5, Phe29-Pro258) <u>péptido señal</u> Dominio IgV	162	<u>MASLGQIIFWSIINIILLAGAIALIIGFGISGKHFITVTTFTSAGNIGEDGTLSCCTFEPDIKL</u> <u>NGIVIQWLKEGIKGLVHEFKEGKDDLQQHEMFRGRTAVFADQVVVGNASRLKNVQLTDAGTYT</u> <u>CYIRTSKGGKGNANLEYKTGAFSMPEINVNASSSESLRCEAPRWFPQPTVAWASQVDQGANFSEV</u> <u>SNTSFELNSENVTMKVSVLYNVTINNTYSCMIENDIAKATGDIKVTSEVKRRSQLQLLNSGSP</u> <u>PCVFSSAFVAGWALLSLSCCLMLR</u>

Proteína	SEQ ID NO:	Secuencia
Dominio IgC región de transmembrana		
IgG1 Fc (# de acceso NCBI: P01857) subrayado Pro100-Lys330	163	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV DKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
IL-15 de humano de longitud completa (# de acceso NCBI: P40933) <u>proteína madura</u>	164	MRISKPHLRISISIQCYLCLLLNSHFLTEAGIHVFILGCF SAGLPKTEANWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCCKVTAMKCFLE LQVISLESGDASIHDTVENLIILANNSLSSNGNVTESGCKECEEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS
IL-15 de humano (proteína madura, el residuo N65 está en negrita)	165	NWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCCKVTAMKCFLELQVISLESGDASIHDTVENLIILANNSLSSNGNVTESGCKECEEELEEK NIKEFLQSFVHIVQMFINTS
IL-15 de humano N65S (proteína madura, el residuo N65S está en negrita)	166	NWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCCKVTAMKCFLELQVISLESGDASIHDTVESLIILANNSLSSNGNVTESGCKECEEELEEK NIKEFLQSFVHIVQMFINTS
Dominio sushi IL-15Rα (residuos 33-93 de # de acceso NCBI: EAW86418.1)	167	CPPPMSVEHADIWVKSYSLSYRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHWTTPSLKC
Secuencia artificial	168	SGGSGGGSGGGSGGGGSLQ
Dominio sushi IL-15Rα + Enlazador + IL-15 N65S <u>Dominio sushi IL-15Rα</u> <u>Enlazador</u> IL-15	169	CPPPMSVEHADIWVKSYSLSYRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHWTTPSLKC IRDPALVHQRAPPSSGGSGGGSGGGSGGGGSL QNWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCCKVTAMKCFLELQVISLESGDASIHDTVESLIILANNSLSSNGNVTESGCKECEEELE EKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS
Secuencia artificial	170	IRDPALVHQRAPPSSGGSGGGSGGGSGGGGSLQ
Secuencia artificial	171	IRDPALVHQRAPP

Tabla 24. Ejemplos de CDR de anticuerpos que se unen al dominio IgV de B7H4 de humano (3F2 y 50A10)

		Numeración de índice EU	Alternativa de numeración de índice EU Kabat	IMGT	Chothia
3F2	CDR1H	GYTFTAQYMY (SEQ ID NO: 16)	AQYMY (SEQ ID NO: 172)	GYTFTAQY (SEQ ID NO: 178)	GYTFTAQ (SEQ ID NO: 184)
3F2	CDR2H	RINPTSGNTVYAQKLQG (SEQ ID NO: 17)	RINPTSGNTVYAQKLQG (SEQ ID NO: 173)	INPTSGNT (SEQ ID NO: 179)	PTSG (SEQ ID NO: 185)
3F2	CDR3H	GINWFDP (SEQ ID NO: 18)	GINWFDP (SEQ ID NO: 174)	ARGINWFDP (SEQ ID NO: 180)	INWFD (SEQ ID NO: 186)
50A10	CDR1L	QASQDISNYIN (SEQ ID NO: 70)	SQDISNY (SEQ ID NO: 175)	SQDISNY (SEQ ID NO: 181)	QASQDISNYIN (SEQ ID NO: 187)
50A10	CDR2L	SRLQS (SEQ ID NO: 71)	AAS (SEQ ID NO: 176)	AAS (SEQ ID NO: 182)	AASRLQS (SEQ ID NO: 188)
50A10	CDR3L	QQSYRSPFT (SEQ ID NO: 72)	SYRSPF (SEQ ID NO: 177)	SYRSPF (SEQ ID NO: 183)	QQSYRSPFT (SEQ ID NO: 189)

