

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **036591**

(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2020.11.26

(21) Номер заявки
201690080

(22) Дата подачи заявки
2014.06.20

(51) Int. Cl. *A61K 38/00* (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
C07K 1/00 (2006.01)
C12N 5/07 (2010.01)
C12N 5/16 (2006.01)

(54) СПОСОБ ИНГИБИРОВАНИЯ, ЗАМЕДЛЕНИЯ ИЛИ УМЕНЬШЕНИЯ РОСТА РАКОВОЙ ОПУХОЛИ У СУБЪЕКТА

(31) 61/839,170; 61/874,241; 61/884,771;
61/907,845

(32) 2013.06.25; 2013.09.05; 2013.09.30;
2013.11.22

(33) US

(43) 2016.06.30

(86) PCT/US2014/043466

(87) WO 2014/209802 2014.12.31

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ВЭКСИНЕКС, ИНК. (US)

(72) Изобретатель:
**Эванс Элизабет Э., Смит Эрнест С.,
Заудерер Морис (US)**

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(56) US-A1-20100285036
US-A1-20120064035
US-A1-20090181035
WITHERDEN, DA et al. The CD100 Receptor
Interacts With Its Plexin B2 Ligand To Regulate
Epidermal gd T Cell Function. *Immunity*. 24 August
2012, Vol. 37, pages 314-327; page 314, column 1,
paragraph 1; page 315, column 1, paragraph 2; column
2, paragraph 1; figure 1.
US-A1-20120082663

(57) Изобретение относится к способу ингибирования, замедления или уменьшения роста раковой опухоли у субъекта, включающий введение субъекту эффективного количества выделенного антитела или его антиген-связывающего фрагмента, которое специфично к семафрину-4D (SEMA4D), и эффективного количества по меньшей мере одного другого иммуномодулирующего агента, выбранного из адоптивных Т-лимфоцитов, ингибитора блокады иммунных контрольных точек и модулятора регуляторных Т-лимфоцитов (Трег). Способ согласно изобретению обеспечивает повышенную терапевтическую эффективность по сравнению с применением только одного из указанных агентов.

B1

036591

036591

B1

Ссылка на список последовательностей, представленный в электронном виде

Содержание представленного в электронном виде списка последовательностей в текстовом файле (название: 58008J33124_SEQ_LST.txt; размер: 37,171 байт; дата создания: 20 июня 2014), подаваемом вместе с настоящей заявкой, полностью включено в нее путем ссылки.

Уровень техники

Семафорин-4D (SEMA4D), также известный как CD100, представляет собой трансмембранный белок (например, SEQ ID NO: 1 (человеческий); SEQ ID NO: 2 (мышинный)), который принадлежит к семейству генов семафорина. SEMA4D экспрессируется на поверхности клетки в виде гомодимера, но при активации клетки SEMA4D может высвобождаться с клеточной поверхности путем протеолитического расщепления с образованием растворимой формы белка sSEMA4D, которая также является биологически активной. См. Suzuki et al., *Nature Rev. Immunol.* 3:159-167 (2003); Kikutani et al., *Nature Immunol.* 9:17-23 (2008).

SEMA4D экспрессируется на высоком уровне в лимфоидных органах, включая селезенку, тимус и лимфатические узлы, а также в нелимфоидных органах, таких как головной мозг, сердце и почки. В лимфоидных органах SEMA4D в большом количестве экспрессируется в покоящихся Т-лимфоцитах, но лишь слабо экспрессируется в покоящихся В-лимфоцитах и антигенпрезентирующих клетках (АПК), таких как дендритные клетки (ДК). Однако его экспрессия активируется в этих клетках после их активации различными иммунологическими стимулами. Высвобождение растворимого SEMA4D из иммунных клеток также увеличивается при активации клеток. SEMA4D вовлечен в развитие некоторых видов рака (Ch'ng et al., *Cancer* 110:164-72 (2007); Campos et al., *Oncology Letters*, 5: 1527-35 (2013); ato et al., *Cancer Sci.* 102: 2029-37 (2011)), и в нескольких работах сделано предположение о том, что одним из механизмов этого влияния является роль SEMA4D в стимулировании ангиогенеза опухоли (Conrotto et al., *Blood* 105: 4321-4329 (2005). Basile et al., *J Biol. Chem.* 282: 34888-34895 (2007); Sierra et al. *J. Exp. Med.* 205:1673 (2008); Zhou et al., *Angiogenesis* 15: 391-407 (2012)). Рост и метастазирование опухолей включают в себя сложный процесс взаимодействия опухолевых клеток, стромы и иммунного инфильтрата, а также эндотелиальных клеток и сосудистой системы. SEMA4D сверхэкспрессируется в широком спектре типов опухолей, а также продуцируется воспалительными клетками, рекрутируемыми в микроокружение опухоли. Вопрос о том, какую роль SEMA4D может играть в миграции, выживании, дифференцировке и организации различных типов клеток, составляющих строму опухоли, пока остается без ответа.

Сущность изобретения

Изобретение направлено на удовлетворение потребности в безопасных и эффективных способах лечения рака, которые применяются или в качестве единственного агента, который ингибирует, уменьшает, подавляет, предотвращает, замедляет или задерживает прогрессирование опухоли, сокращает или непосредственно атакует опухолевые клетки, или которые могут действовать в комбинации с другими иммуномодулирующими терапиями для усиления их терапевтического эффекта. В частности, было показано, что SEMA4D играет определенную роль в инфильтрации, созревании и организации иммунных клеток и макрофагов, которые или стимулируют или ингибируют рост опухоли, и это может внести свой вклад в разработку эффективных способов уменьшения роста и метастазирования опухолей у субъекта, страдающего раком.

В некоторых аспектах настоящее изобретение относится к способу ингибирования, замедления или уменьшения роста раковой опухоли у субъекта, включающий введение субъекту эффективного количества выделенного антитела или его антиген-связывающего фрагмента, которое специфично к семафору-4D (SEMA4D), и эффективного количества по меньшей мере одного другого иммуномодулирующего агента, выбранного из адоптивных Т-лимфоцитов, ингибитора блокады иммунных контрольных точек и модулятора регуляторных Т-лимфоцитов (Трег).

В некоторых вариантах осуществления изобретения ингибитор блокады иммунных контрольных точек представляет собой антитело к белку 4, ассоциированному с цитотоксическими Т-лимфоцитами (анти-CTLA4), антитело к белку 1 запрограммированной клеточной смерти (анти-PD-1), антитело к лиганду белка 1 запрограммированной клеточной смерти (анти-PD-L1), антитело к лимфоцит-активирующему гену 3 (LAG3), анти-B7-H3 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент. В одном из вариантов осуществления изобретения модулятор Трег представляет собой циклофосфамид.

В некоторых вариантах осуществления изобретения адоптивные Т-лимфоциты представляют собой опухоль-инфильтрирующие лимфоциты (ОИЛ), выделенные из удаленной у субъекта опухоли. В одном из вариантов осуществления изобретения ОИЛ получены размножением *in vitro*. В предпочтительном варианте осуществления изобретения размножение *in vitro* включает инкубирование выделенных ОИЛ с аллореактивными питающими клетками, интерлейкином-2 (IL-2) и анти-CD3 антителом.

В некоторых вариантах осуществления изобретения адоптивные Т-лимфоциты представляют собой Т-клетки, трансфицированные гибридным рецептором антигена. В одном из вариантов осуществления изобретения гибридный рецептор антигена является реактивным в отношении целевого опухолевого антигена.

В некоторых вариантах осуществления изобретения анти-SEMA4D антитело и другой иммуномодулирующий агент вводят раздельно. В некоторых вариантах осуществления изобретения анти-SEMA4D

антитело и другой иммуномодулирующий агент вводят одновременно.

В некоторых вариантах осуществления изобретения субъект имеет повышенный уровень В-лимфоцитов и/или Т-лимфоцитов по сравнению с другими субъектами с раковой опухолью. В одном из вариантов осуществления изобретения уровень В-лимфоцитов и/или Т-лимфоцитов на микролитр крови субъекта приблизительно от 1,5 приблизительно до 5 раз выше, чем среднее количество В-лимфоцитов и/или Т-лимфоцитов в кровотоке других субъектов с раковой опухолью. В другом варианте осуществления изобретения уровень В-лимфоцитов и/или Т-лимфоцитов находится в диапазоне значений здоровых субъектов или превышает его.

В некоторых вариантах осуществления изобретения анти-SEMA4D антитело или его фрагмент ингибирует взаимодействие SEMA4D со своим рецептором. В одном из вариантов осуществления изобретения рецептор представляет собой плексин В1. В одном из вариантов осуществления изобретения анти-SEMA4D антитело или его фрагмент ингибирует опосредованную SEMA4D передачу сигнала через плексин В1.

В некоторых вариантах осуществления изобретения анти-SEMA4D антитело или его фрагмент включает вариабельную тяжелую цепь (VH), содержащую VHCDRs 1-3, включающие SEQ ID NO: 6, 7 и 8, соответственно, и вариабельную легкую цепь (VL), содержащую VLCDRs 1-3, включающие SEQ ID NO: 14, 15 и 16, соответственно. В одном из вариантов осуществления изобретения VH и VL содержат, соответственно, SEQ ID NO: 9 и SEQ ID NO: 17 или SEQ ID NO: 10 и SEQ ID NO: 18.

В некоторых вариантах осуществления изобретения рак выбран из карциномы, лимфомы, бластомы, саркомы, лейкоза, плоскоклеточного рака, мелкоклеточного рака легкого, немелкоклеточного рака легкого, аденокарциномы легкого, плоскоклеточной карциномы легкого, рака брюшной полости, гепатоцеллюлярного рака, рака желудочно-кишечного тракта, рака желудка, рака поджелудочной железы, нейроэндокринного рака, глиобластомы, рака шейки матки, рака яичников, рака печени, рака мочевого пузыря, рака головного мозга, гепатомы, рака молочной железы, рака толстой кишки, колоректального рака, эндометриальной или маточной карциномы, рака пищевода, карциномы слюнных желез, рака почки, рака печени, рака предстательной железы, рака вульвы, рака щитовидной железы, рака головы и шеи, и их комбинации. В некоторых вариантах осуществления изобретения клетки рака экспрессируют Her2 и либо плексин В1, либо плексин В2.

Краткое описание чертежей/фигур

Фиг. 1А-1В - результат измерения объема опухоли у мышей с имплантированными сингенными опухолевыми клетками Colon26. На фиг. 1А показан результат измерения объема опухоли Colon26 у мышей линий Balb/c и SCID, дважды в неделю получавших или 1 мг (50 мг/кг) анти-SEMA4D антитела (Ab) 67, или изотипический контрольный иммуноглобулин 2B8 (2B8 Контрольный Ig). На фиг. 1В показана продолжительность выживания, как определено ниже в примере 1, у мышей линий Balb/c и SCID, дважды в неделю получавших или анти-SEMA4D Ab 67, или 2B8 Контрольный Ig.

Фиг. 2 - показан результат измерения объема опухоли Colon26 у мышей с имплантированными опухолевыми клетками, получавших сначала анти-CD8 истощающие антитела (клон 2.43, BioXCell) или контрольный крысиный Ig (150 мг/кг), а затем получавших или 2B8 Контрольный Ig или анти-SEMA4D Ab 67, как на фиг. 1А.

Фиг. 3А-3В - результат измерения плотности иммунных клеток в опухоли Colon26 у мышей, которым она была трансплантирована. На фиг. 3А показана плотность CD8+ Т-лимфоцитов, определенная по % площади опухоли, окрашенному анти-CD8 антителами, после получения Контрольного Ig или анти-SEMA4D Ab 67. На фиг. 3В показана плотность CD20+ В-лимфоцитов, определенная по % площади опухоли, окрашенной анти-CD20 антителами, после получения Контрольного Ig или анти-SEMA4D Ab 67.

Фиг. 4А-4Д - результат измерения распределения макрофагов и CD8+ Т-лимфоцитов в передней кромке опухоли у мышей с имплантированной Colon26. На фиг. 4А показаны изображения репрезентативных опухолей Colon26 мышей, которым эта опухоль была трансплантирована за 27 дней до этого, и которые получали или Контрольный Ig или анти-SEMA4D Ab 67, как показано на фиг. 1. На фиг. 4В показан результат измерения плотности макрофагов типа М1 в передней кромке опухоли, которая соответствует области шириной в 300 пикселей (250 микрон) от края опухоли. Плотность определяли как % пикселей области, окрашенных анти-F4/80 антителами. На фиг. 4С показан результат измерения плотности макрофагов типа М2 в передней кромке опухоли, определенной по % пикселей области, окрашенных анти-CD206 антителами. На фиг. 4Д показан результат измерения плотности CD8+ Т-лимфоцитов в передней кромке опухоли, определенной по % пикселей области, окрашенных антиантителами к цитотоксическим CD8+ Т-лимфоцитам.

Фиг. 5А-5Д - результат измерения объема опухоли у мышей с имплантированными сингенными опухолевыми клетками Colon26. На фиг. 5А показан результат измерения объема опухоли Colon26 у мышей линии Balb/c, получавших или контрольный мышинный IgG1/2B8 или анти-SEMA4D/MAb 67-2 (50 мг/кг, внутривенно, раз в неделю), с или без анти-CTLA4/Mab UC10-4F10-1 1 (100 мкг в день 8 и 50 мкг в дни 11 и 14 после инокуляции опухоли), и анти-PD1/RMP1-14 (100 мкг в день 3, дважды в неделю) в комбинации с анти-CTLA4/Mab UC10-4F 10-1 1. На фиг. 5В показана продолжительность выживания у мышей линии Balb/c, получавших или контрольный мышинный IgG1/2B8 или анти-SEMA4D/MAb

67-2, с или без анти-CTLA4/Mab UC10-4F10-1 1, и анти-PD1/RMP1-14 (100 мг в день 3, дважды в неделю) в комбинации с анти-CTLA4/Mab UC10-4F 10-11. На фиг. 5C показана частота регрессии опухоли у мышей линии Balb/c, получавших или контрольный мышиный IgG1/2B8 или анти-SEMA4D/MAb 67-2, с или без анти-CTLA4/Mab UC10-4F 10-1 1, и анти-PD1/RMP1-14 (100 мг в день 3, дважды в неделю) в комбинации с анти-CTLA4/Mab UC10-4F10-11 (значения p, *0,05 и **0,01). На фиг. 5D показаны результаты измерений провоспалительных цитокинов ИФН γ в опухоль-инфильтрирующих лимфоцитах у мышей, получавших комбинацию анти-SEMA4D/MAb 67-2 и анти-CTLA4/Mab UC10-4F10-1 1, по сравнению или с контрольным мышиным IgG1/2B8 или с монотерапией (или анти-SEMA4D/MAb 67-2 или анти-CTLA4/Mab UC10-4F10-1 1). На фиг. 5E показана частота секретирующих пептид-специфичный ИФН γ иммунокомпетентных клеток среди опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов, выделенных из селезенки мышей, получавших комбинацию анти-SEMA4D/MAb 67-2 и анти-CTLA4/Mab UC10-4F10-1 1, по сравнению или с контрольным мышиным IgG1/2B8 или с монотерапией (или анти-SEMA4D/MAb 67-2 или анти-CTLA4/Mab UC10-4F10-1 1).

Фиг. 6A-6E - результат измерения влияния анти-SEMA4D антител на инфильтрацию опухоли цитотоксическими CD8+ Т-лимфоцитами. На фиг. 6A показан результат измерения секретирующих ИФН γ клеток у мышей, получавших Mab 67, как в присутствии, так и в отсутствии пептида. На фиг. 6B показаны репрезентативные изображения, полученные методом иммуноферментных пятен (ELISPOT). На фиг. 6C показаны результаты измерений противоопухолевых цитокинов, таких как ИФН γ и ФНО α , в опухоль-инфильтрирующих лимфоцитах (ОИЛ). На фиг. 6D показаны результаты измерений провоспалительных цитокинов ИФН γ и ФНО α в ОИЛ у мышей, получавших анти-SEMA4D/MAb 67 антитела. На фиг. 6E показана частота секретирующих пептид-специфичный ИФН γ иммунокомпетентных клеток в опухоль-инфильтрирующих лимфоцитах у мышей, получавших анти-SEMA4D/MAb 67 антитела.

Фиг. 7A-7D - результат измерения объема опухоли у мышей с имплантированными сингенными опухолевыми клетками Colon26. На фиг. 7A показан результат измерения объема опухоли Colon26 у мышей линии Balb/c, получавших или контрольный мышиный IgG1/2B8 или анти-SEMA4D/MAb 67-2 (50 мг/кг, внутривенно, раз в неделю), вместе или с контрольным крысиным Ig или с крысиным анти-PD1/MAbRMP1-14 (10 мг дважды в неделю в течение 2 недель, начиная с третьего дня после инокуляции опухоли). На фиг. 7B показана продолжительность выживания у мышей линии Balb/c, получавших или контрольный мышиный IgG1/2B8 или анти-SEMA4D/MAb 67-2, вместе или с контрольным крысиным Ig или с крысиным анти-PD1/MAbRMP1-14. На фиг. 7C и 7D показана частота регрессии опухоли у мышей линии Balb/c, получавших или контрольный мышиный IgG1/2B8 или анти-SEMA4D/MAb 67-2, вместе или с контрольным крысиным Ig или с крысиным анти-PD1/MAbRMP1-14.

Фиг. 8A-8E - результат измерения объема опухоли у мышей с имплантированными сингенными опухолевыми клетками Colon26. На фиг. 8A показано среднее значение измерений объема опухоли Colon26 у мышей линии Balb/c, получавших или контрольный мышиный IgG1/2B8 или анти-SEMA4D/MAb 67-2 (50 мг/кг, внутривенно, раз в неделю), с или без циклофосфамида (CY) (50 мг/кг, внутривенно). На фиг. 8B показано медианное значение измерений объема опухоли Colon26 у мышей линии Balb/c, получавших или контрольный мышиный IgG1/2B8 или анти-SEMA4D/MAb 67-2 (50 мг/кг, внутривенно, раз в неделю), с или без циклофосфамида (CY) (50 мг/кг, внутривенно). На фиг. 8C показана продолжительность выживания у мышей линии Balb/c, получавших или контрольный мышиный IgG1/2B8 или анти-SEMA4D/MAb 67-2, с или без циклофосфамида. На фиг. 8D и 8E показана частота регрессии опухоли у мышей линии Balb/c, получавших или контрольный мышиный IgG1/2B8 или анти-SEMA4D/MAb 67-2, с или без циклофосфамида (CY).

Фиг. 9A-9C - результат измерения объема опухоли у мышей с имплантированными опухолевыми клетками Tubo.A5. На фиг. 9A показан результат измерения объема опухоли у мышей линии Balb/c, получавших или контрольный мышиный IgG1/2B8 или анти-SEMA4D/MAb 67-2 (50 мг/кг, внутривенно, раз в неделю), с или без анти-Neu/Mab7.16.4 (aNeu) (200 мкг, внутривенно, еженедельно $\times 2$, начиная с того момента, когда объем опухоли (ОО) достигал приблизительно 200 мм³, в дни 21 и 28). На фиг. 9B показана продолжительность выживания у мышей линии Balb/c, получавших или контрольный мышиный IgG1/2B8 или анти-SEMA4D/MAb 67-2, с или без анти-Neu/Mab7.16.4 (aNeu). На фиг. 9C показана частота регрессии опухоли у мышей линии Balb/c, получавших или контрольный мышиный IgG1/2B8 или анти-SEMA4D/MAb 67-2, с или без анти-Neu/Mab7.16.4 (aNeu).

Фиг. 10A-10E - результат измерения объема опухоли у мышей с имплантированными опухолевыми клетками Tubo.A5. На фиг. 10A показан результат измерения объема опухоли у мышей линии Balb/c, получавших или контрольный мышиный IgG1/2B8 или анти-SEMA4D/MAb 67-2 (50 мг/кг, внутривенно, раз в неделю). На фиг. 10B показана продолжительность выживания у мышей линии Balb/c, получавших или контрольный мышиный IgG1/2B8 или анти-SEMA4D/MAb 67-2. На фиг. 10C-10E показана частота регрессии опухоли в опухолевой модели Tubo.A5. В частности, на фиг. 10C показаны контрольные мыши с имплантированной опухолью Tubo.A5. На фиг. 10D показаны мыши, у которых происходило отторжение имплантированной опухоли Tubo.A5 после введения им анти-SEMA4D/MAb 67-2, и которые были повторно заражены опухолью Tubo.A5 в день 90 после первого заражения. На фиг. 10E пока-

заны исходные мыши, зараженные тем же типом опухоли, что и на фиг. 10D, чтобы показать жизнеспособность опухоли *in vivo*.

Фиг. 11A-11B - результат измерения инфильтрации Т-лимфоцитов и МСК в опухолевой модели Tubo.A5. На фиг. 11A показан результат измерения CD3+ Т-лимфоцитов в опухолях мышей линии Balb/c, получавших или контрольный мышинный IgG1/2B8 или анти-SEMA4D/MAb 67-2 (50 мг/кг, внутривенно, раз в неделю). На фиг. 11B показан результат измерения CD11b+Gr1+ МСК в опухолях мышей линии Balb/c, получавших или контрольный мышинный IgG1/2B8 или анти-SEMA4D/MAb 67-2 (50 мг/кг, внутривенно, раз в неделю).

Фиг. 12A-12D - результат измерения объема опухоли у мышей с имплантированными опухолевыми клетками Colon26 или Tubo.A5. На фиг. 12A показан результат измерения объема опухоли у мышей линии Balb/c, получавших или контрольный мышинный IgG1/2B8.IE7 (50 мг/кг, внутривенно, еженедельно ×6) или различные количества анти-SEMA4D/MAB 67-2 (1, 10 или 50 мг/кг, внутривенно, еженедельно ×6). На фиг. 12B показана продолжительность выживания у мышей линии Balb/c, получавших или контрольный мышинный IgG1/2B8.IE7 (50 мг/кг, внутривенно, еженедельно ×6) или различные количества анти-SEMA4D/MAB 67-2 (1, 10 или 50 мг/кг, внутривенно, еженедельно ×6). На фиг. 12C показан результат измерения объема опухоли Colon26 у мышей линии Balb/c, получавших контрольный мышинный IgG1/2B8.IE7 (50 мг/кг, внутривенно, еженедельно ×5), анти-SEMA4D/MAB 67-2 (50 мг/кг, внутривенно, еженедельно ×5), анти-CTLA4/Mab UC10-4F10-11 (5 мг/кг, внутривенно, еженедельно ×5), или комбинацию анти-CTLA4/Mab UC10-4F10-11 (5 мг/кг, внутривенно, еженедельно ×5) и различных количеств анти-SEMA4D/MAB 67-2 (0,3, 3, 10 или 50 мг/кг, внутривенно, еженедельно ×5). На фиг. 12D показана продолжительность выживания у мышей линии Balb/c, получавших контрольный мышинный IgG1/2B8.IE7 (50 мг/кг, внутривенно, еженедельно ×5), анти-SEMA4D/MAB 67-2 (50 мг/кг, внутривенно, еженедельно ×5), анти-CTLA4/Mab UC10-4F10-11 (5 мг/кг, внутривенно, еженедельно ×5), или комбинацию анти-CTLA4/Mab UC10-4F10-11 (5 мг/кг, внутривенно, еженедельно ×5) и различных количеств анти-SEMA4D/MAB 67-2 (0,3, 3, 10 или 50 мг/кг, внутривенно, еженедельно ×5).

Фиг. 13 - обобщенные результаты экспериментов, показанных на вышеупомянутых фигурах, показывающие регрессию и рост опухоли после повторного заражения опухолью в опухолевых моделях Colon26 и Tubo.A5.

Подробное описание изобретения

I. Определения.

Следует отметить, что использование для обозначения предмета единственного числа существительного относится как к одному, так и к нескольким таким предметам; например, термин "полинуклеотид" относится к одному или нескольким полинуклеотидам. Таким образом, термины, употребленные в единственном числе, а также термины "один или несколько" и "по меньшей мере один" могут использоваться в настоящем изобретении как взаимозаменяемые.

Кроме того, используемый здесь термин "и/или" следует рассматривать как конкретное раскрытие каждого из двух указанных признаков или компонентов как вместе, так и отдельно друг от друга. Таким образом, предполагается, что термин "и/или", используемый в настоящем изобретении в такой фразе как "А и/или В", включает в себя "А и В", "А или В", (только) "А" и (только) "В". Аналогичным образом, предполагается, что термин "и/или", используемый в такой фразе как "А, В и/или С", включает в себя каждый из следующих вариантов: А, В и С; А, В или С; А или С; А или В; В или С; А и С; А и В; В и С; (только) А; (только) В; и (только) С.

Если не указано иное, то все используемые здесь технические и научные термины имеют то же значение, которое обычно вкладывается в них средним специалистом в той области техники, к которой относится настоящее изобретение. Например, the Concise Dictionary of Biomedicine and Molecular Biology, Juo, Pei-Show, 2nd ed., 2002, CRC Press; The Dictionary of Cell and Molecular Biology, 3rd ed., 1999, Academic Press; и the Oxford Dictionary Of Biochemistry And Molecular Biology, Revised, 2000, Oxford University Press являются словарями, обеспечивающими специалиста в данной области техники многими терминами, используемыми в настоящем изобретении.

Единицы, префиксы и символы приводятся в форме, принятой в Международной системе единиц (СИ). Диапазоны числовых значений включают в себя числовые значения, определяющие этот диапазон. Если не указано иное, то аминокислотные последовательности записаны слева направо в ориентации от аминоконца к карбоксильному концу. Содержащиеся в настоящем описании заголовки не ограничивают различные аспекты вариантов осуществления настоящего изобретения, которые могут быть охарактеризованы ссылкой на все описание в целом. Таким образом, термины, определение которых дано непосредственно ниже, более полно определены путем ссылки на настоящее описание во всей его полноте.

В тех случаях, когда варианты осуществления изобретения описываются термином "содержащий", другие аналогичные варианты осуществления изобретения, описанные терминами "состоящий из" и/или "в основном состоящий из", также предполагаются.

В настоящем изобретении аминокислоты обозначаются их общеизвестными трехбуквенными сим-

волами или однобуквенными символами, рекомендованными Комиссией по биохимической номенклатуре ИЮПАК-МБС. Нуклеотиды также обозначаются их общепринятым однобуквенным кодом.

Используемые в настоящем изобретении термины "рак" и "раковый" относятся или описывают физиологическое состояние у млекопитающих, при котором группа клеток характеризуется неконтролируемым клеточным ростом. Примеры рака включают в себя без ограничений карциному, лимфому, бластому, саркому и лейкоз. Более конкретные примеры таких раковых заболеваний включают в себя плоскоклеточный рак, мелкоклеточный рак легкого, немелкоклеточный рак легкого, аденокарциному легкого, плоскоклеточную карциному легкого, рак брюшной полости, гепатоцеллюлярный рак, рак желудочно-кишечного тракта, рак желудка, рак поджелудочной железы, глиобластому, рак шейки матки, рак яичников, рак печени, рак мочевого пузыря, рак головного мозга, гепатому, рак молочной железы, рак толстой кишки, колоректальный рак, эндометриальную или маточную карциному, рак пищевода, карциному слюнных желез, рак почки, рак печени, рак предстательной железы, рак вульвы, рак щитовидной железы, карциному печени и различные типы рака головы и шеи.

В некоторых вариантах осуществления изобретения метастатический рак, который подлежит лечению при помощи предложенных здесь способов, включает в себя без ограничений метастатические саркомы, карциномы молочной железы, рак яичников, рак головы и шеи и рак поджелудочной железы. В некоторых вариантах осуществления изобретения метастатический рак или опухолевые клетки, которые подлежат лечению при помощи предложенных здесь способов, экспрессируют рецепторы SEMA4D плексин В1 и/или плексин В2.

Термин "ангиогенез" относится к сложному многоступенчатому морфогенетическому событию, во время которого эндотелиальные клетки, стимулированные главными детерминантами сосудистого ремоделирования, динамично изменяют свои контакты клетка-клетка и клетка-матрикс и направленно перемещаются, чтобы быть преобразованными в зрелую сосудистую сеть (Bussolino et al., *Trends Biochem Sci.* 22: 251-256 (1997); Risau, *Nature* 386: 671-674 (1997); Jain, *Nat. Med.* 9: 685-693 (2003)). Образование новых кровеносных сосудов является ключевым этапом во время эмбрионального развития, но оно также имеет место у взрослых организмов при таких физиологических и патологических состояниях, как ретинопатия, ревматоидный артрит, ишемия и, в частности, при росте и метастазировании опухолей (Carmeliet, *Nat. Med.* 9: 653-660 (2003)).

Используемый здесь термин "клиническая лаборатория" относится к учреждению для исследования или обработки материалов, полученных от живого субъекта, например, человека. Неограничивающие примеры обработки включают в себя биологическое, биохимическое, серологическое, химическое, иммуногематологическое, гематологическое, биофизическое, цитологическое, патологическое, генетическое или другое исследование материалов, полученных из организма человека, с целью получения информации, например, для диагностики, предотвращения или лечения любого заболевания или патологического расстройства или для оценки состояния здоровья живых субъектов, например, людей. Эти исследования также могут включать в себя процедуры по сбору или иному получению образца, подготовку, определение, измерение или иное описание наличия или отсутствия различных веществ в организме живого субъекта, например, человека, или в образце, полученном из организма живого субъекта, например, человека.

Термины "пролиферативное нарушение" и "пролиферативное заболевание" относятся к нарушениям, связанным с ненормальной клеточной пролиферацией, таким как рак.

Используемые здесь термины "опухоль" и "новообразование" относятся к любой массе ткани, которая образуется в результате избыточного роста или пролиферации клеток, как доброкачественной (нераковой), так и злокачественной (раковой), включая предраковые состояния. В некоторых вариантах осуществления изобретения описанные здесь опухоли экспрессируют плексин В1 и/или плексин В2 и могут экспрессировать SEMA4D и активированный Met.

Используемый здесь термин "поставщик медицинского обеспечения" включает в себя отдельные стороны, организации или группы, обеспечивающие, предоставляющие, предлагающие, оплачивающие полностью или частично, или иначе связанные с предоставлением пациенту доступа к одному или нескольким видам медицинского обеспечения, программам льгот при медицинском обслуживании, медицинскому страхованию и/или программам по оплате расходов на медицинскую помощь.

Термин "иммуномодулирующая терапия" или "иммунотерапия" относится к лечению, которое оказывает влияние на заболевание или нарушение у субъекта путем индуцирования или усиления иммунного ответа у этого субъекта. Иммуномодулирующие терапии включают в себя противораковые вакцины, иммуностимулирующие агенты, терапию адоптивными Т-лимфоцитами или антителами и блокаду иммунных контрольных точек (Lizee et al. 2013. *Harnessing the Power of the Immune System to Target Cancer. Annu. Rev. Med.* Vol. 64 No. 71-90).

Термин "иммуномодулирующий агент" относится к активным агентам иммунотерапии. Иммуномодулирующие агенты включают в себя широкий спектр рекомбинантных, синтетических и натуральных препаратов. Примеры иммуномодулирующих агентов включают в себя без ограничений интерлейкины, такие как IL-2, IL-7, IL-12; цитокины, такие как гранулоцитарный колониестимулирующий фактор (ГКСФ), интерфероны; различные хемокины, такие как CXCL13, CCL26, CXCL7; антагонисты блокады

иммунных контрольных точек, такие как анти-CTLA-4, анти-PD1 или анти-PD-L1 (лиганд PD-1), анти-LAG3, анти-B7-H3, синтетические цитозин фосфат-гуанозин (CpG) олигодезоксинуклеотиды, глюканы; и модуляторы регуляторных Т-лимфоцитов (Трег), такие как циклофосфамид.

Используемые здесь термины "метастаз", "метастазы", "метастатический" и другие их грамматические эквиваленты относятся к раковым клеткам, которые распространяются или передаются от места их возникновения (например, первичная опухоль) в другие области организма с развитием аналогичного ракового поражения на новом месте. "Метастатическая" или "метастазирующая" клетка представляет собой клетку, которая теряет адгезионные контакты с соседними клетками и мигрирует с кровотоком или лимфой из области первичной локализации заболевания, чтобы проникнуть в соседние структуры организма. Эти термины также относятся к процессу метастазирования, который включает в себя без ограничений отделение раковых клеток от первичной опухоли, проникновение этих опухолевых клеток в кровоток, их выживание и миграцию в отдаленную область, прикрепление и выход из кровотока в новую область локализации, и микроколониацию этой отдаленной области, и рост и развитие опухоли в этой отдаленной области.

Термин "терапевтически эффективное количество" относится к количеству антитела, полипептида, полинуклеотида, малой органической молекулы или другого лекарственного средства, эффективному для "лечения" заболевания или нарушения у субъекта или млекопитающего. В случае рака терапевтически эффективное количество лекарственного средства может уменьшать количество раковых клеток; замедлять или останавливать деление раковых клеток, уменьшать или замедлять увеличение размера опухоли; ингибировать, например, подавлять, замедлять, предотвращать, останавливать, задерживать или обращать вспять инфильтрацию раковых клеток в периферические органы, включая, например, распространение рака в мягкие ткани и кости; ингибировать, например, подавлять, замедлять, предотвращать, сокращать, останавливать, задерживать или обращать вспять метастазирование опухоли; ингибировать, например, подавлять, замедлять, предотвращать, останавливать, задерживать или обращать вспять рост опухоли; облегчать в некоторой степени один или несколько из симптомов, связанных с раком, уменьшать тяжесть течения заболевания и смертность; повышать качество жизни; или обеспечивать комбинацию таких эффектов. В тех случаях, когда лекарственное средство предотвращает рост и/или уничтожает существующие раковые клетки, оно может называться цитостатическим и/или цитотоксическим.

Такие термины, как "лечебное воздействие" или "лечение" или "лечить" или "облегчение" или "облегчать" относятся как к 1) терапевтическим мероприятиям, которые излечивают, замедляют, уменьшают симптомы, обращают вспять и/или останавливают прогрессирование диагностированного патологического состояния или нарушения, так и к 2) профилактическим или превентивным мероприятиям, которые предотвращают и/или замедляют развитие соответствующего патологического состояния или нарушения. Таким образом, к числу тех, кто нуждается в лечении, относятся те, кто уже имеет нарушение; те, кто предрасположен к возникновению нарушения; и те, у кого нарушение необходимо предотвратить. Субъект успешно проходит "лечение" способами настоящего изобретения, если у этого пациента наблюдаются один или несколько из следующих эффектов: уменьшение количества или полное отсутствие раковых клеток; уменьшение размера опухоли; или замедление или обращение вспять роста опухоли, ингибирование, например, подавление, предотвращение, замедление, сокращение, задержка или обращение вспять метастазирования, например, инфильтрации раковых клеток в периферические органы, включая, например, распространение рака в мягкие ткани и кости; ингибирование, например, подавление, замедление, предотвращение, сокращение, обращение вспять, задержка или отсутствие метастазирования опухоли; ингибирование, например, подавление, замедление, предотвращение, сокращение, обращение вспять, задержка или отсутствие роста опухоли; облегчение одного или нескольких симптомов, связанных с конкретным видом рака; уменьшенная тяжесть течения заболевания и смертность; повышение качества жизни; или любая комбинация этих эффектов. Благоприятные или желаемые клинические результаты включают в себя без ограничений облегчение симптомов, уменьшение тяжести заболевания, стабилизацию (т.е. отсутствие ухудшения) стадии заболевания, задержку или замедление прогрессирования заболевания, улучшение или временное облегчение течения заболевания и ремиссию (частичную или полную), как обнаруживаемую, так и необнаруживаемую. Термин "лечение" также может означать увеличение продолжительности выживания по сравнению с ожидаемой продолжительностью выживания без получения лечения. К числу тех, кто нуждается в лечении, относятся те, кто уже имеет патологическое состояние или нарушение, а также те, кто предрасположен к возникновению патологического состояния или нарушения, или те, у кого патологическое состояние или нарушение необходимо предотвратить.

Под термином "субъект" или "индивид" или "животное" или "пациент" или "млекопитающее" имеется в виду любой субъект, в частности млекопитающий субъект, которому необходимы диагностика, прогноз или терапия. Млекопитающие субъекты включают в себя человека, домашних животных, сельскохозяйственных животных, спортивных животных и животных, содержащихся в зоопарках и лабораториях, например, собаки, кошки, морские свинки, кролики, крысы, мыши, лошади, крупный рогатый скот, коровы, медведи и так далее.

В используемых здесь фразах, таких как "субъект, который получает благоприятное воздействие от введения анти-SEMA4D антитела в виде одного агента или в комбинации по меньшей мере с одной другой иммуномодулирующей терапией" и "животное, нуждающееся в лечении" имеются в виду субъекты, такие как млекопитающие субъекты, которые получают благоприятное воздействие от введения анти-SEMA4D антитела в виде одного агента или в комбинации по меньшей мере с одной другой иммуномодулирующей терапией.

Используемый в настоящем изобретении термин "связывающаяся молекула" или "антигенсвязывающаяся молекула" относится в самом широком смысле к молекуле, которая специфично связывается с антигенной детерминантой. В одном варианте осуществления изобретения связывающаяся молекула специфично связывается с SEMA4D, например, с трансмембранным полипептидом SEMA4D размером приблизительно 150 кДа или растворимым полипептидом SEMA4D размером приблизительно 120 кДа (обычно обозначаемым sSEMA4D). В другом варианте осуществления изобретения связывающаяся молекула настоящего изобретения представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент. В другом варианте осуществления изобретения связывающаяся молекула настоящего изобретения содержит по меньшей мере одну тяжелую или легкую цепь определяющей комплементарности области (CDR) молекулы антитела. В другом варианте осуществления изобретения связывающаяся молекула настоящего изобретения содержит по меньшей мере две CDRs из одной или нескольких молекул антител. В другом варианте осуществления изобретения связывающаяся молекула настоящего изобретения содержит по меньшей мере три CDRs из одной или нескольких молекул антител. В другом варианте осуществления изобретения связывающаяся молекула настоящего изобретения содержит по меньшей мере четыре CDRs из одной или нескольких молекул антител. В другом варианте осуществления изобретения связывающаяся молекула настоящего изобретения содержит по меньшей мере пять CDRs из одной или нескольких молекул антител. В другом варианте осуществления изобретения связывающаяся молекула настоящего изобретения содержит по меньшей мере шесть CDRs из одной или нескольких молекул антител. В другом варианте осуществления изобретения связывающаяся молекула настоящего изобретения может представлять собой антагонист рецептора SEMA4D плексина V1. Под термином "антагонист" подразумевается связывающаяся молекула, которая препятствует осуществлению рецептором функции передачи сигнала. Антагонист может конкурентно блокировать связывание природного лиганда, но не способен запускать нормальный физиологический ответ. Связывающиеся молекулы могут представлять собой антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, как описано выше, или могут представлять собой другие биологические препараты или низкомолекулярные лекарственные средства, которые действуют как конкурентные ингибиторы или препятствуют передаче сигнала с участием природных лигандов. Настоящее изобретение относится к способу ингибирования роста и метастазирования опухолей у субъекта, например страдающего раком пациента, включающему в себя введение этому субъекту анти-SEMA4D связывающейся молекулы, например антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, варианта или производного, в качестве единственного агента или в комбинации по меньшей мере с одной другой иммуномодулирующей терапией. Если специально не указаны полноразмерные антитела, такие как встречающиеся в природе антитела, то термин "анти-SEMA4D антитело" включает в себя полноразмерные антитела, а также антигенсвязывающие фрагменты, варианты, аналоги или производные таких антител, например, встречающиеся в природе антитела или молекулы иммуноглобулинов или сконструированные молекулы антител или фрагменты, которые связываются с антигеном таким же способом, как и молекулы антител. Также к числу SEMA4D связывающихся молекул относятся другие биологические препараты или малые молекулы, которые связываются и ингибируют активность SEMA4D или его рецептора плексина V1.

Используемые здесь термины "человеческие" или "полностью человеческие" антитела включают в себя антитела, имеющие аминокислотную последовательность иммуноглобулина человека, и включают в себя антитела, выделенные из библиотек иммуноглобулинов человека или полученные от животных, трансгенных по одному или нескольким иммуноглобулинам человека, как описано ниже и, например, в патенте США No.5939598 авторов Kucherlapati et al. Термины "человеческие" или "полностью человеческие" антитела также включают в себя антитела содержащие, по меньшей мере, переменный домен тяжелой цепи или, по меньшей мере, переменные домены тяжелой цепи и легкой цепи, где этот переменный домен(ы) имеет аминокислотную последовательность переменного домена(ов) иммуноглобулина человека.

Термины "человеческие" или "полностью человеческие" антитела включают в себя "человеческие" или "полностью человеческие" антитела, как описано выше, которые содержат, в основном состоят из или состоят из вариантов (включая производные) описанных здесь молекул антител (например, областей VH и/или областей VL), где эти антитела или их фрагменты иммуноспецифично связываются с полипептидом SEMA4D или его фрагментом или вариантом. Стандартные методики, известные специалистам в данной области техники, могут быть использованы для введения мутаций в нуклеотидную последовательность, кодирующую человеческое анти-SEMA4D антитело, включая без ограничений сайтнаправленный мутагенез и ПЦР-опосредованный мутагенез, которые приводят к заменам в аминокислотной последовательности. В некоторых аспектах варианты (включая производные) кодируют менее 50 аминокислотных замен, менее 40 аминокислотных замен, менее 30 аминокислотных замен, менее 25 аминокис-

лотных замен, менее 20 аминокислотных замен, менее 15 аминокислотных замен, менее 10 аминокислотных замен, менее 5 аминокислотных замен, менее 4 аминокислотных замен, менее 3 аминокислотных замен или менее 2 аминокислотных замен по сравнению с областью VH, VHCDR1, VHCDR2, VHCDR3, областью VL, VLCDR1, VLCDR2 или VLCDR3.

В некоторых вариантах осуществления изобретения аминокислотные замены представляют собой консервативную аминокислотную замену, обсуждаемую ниже. В альтернативном варианте мутации могут быть введены случайным образом по всей длине или в части кодирующей последовательности, например, путем насыщающего мутагенеза, и полученные таким образом мутанты могут быть подвергнуты скринингу на биологическую активность для выявления мутантов, которые сохраняют активность (например, способность связываться с полипептидом SEMA4D, например, с человеческим, мышинным или как с человеческим, так и с мышинным SEMA4D). Такие варианты (или их производные) "человеческих" или "полностью человеческих" антител также могут называться человеческие или полностью человеческие антитела, которые "оптимизированы" или "оптимизированы для связывания с антигеном", и они включают в себя антитела, которые обладают улучшенным средством к антигену.

Термины "антитело" и "иммуноглобулин" используются в настоящем изобретении взаимозаменяемо. Антитело или иммуноглобулин содержит, по меньшей мере, вариабельный домен тяжелой цепи и в нем содержит, по меньшей мере, вариабельные домены тяжелой цепи и легкой цепи. Основные структуры иммуноглобулинов у позвоночных сравнительно хорошо изучены. См., например, Harlow et al. (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual* (2nd ed.; Cold Spring Harbor Laboratory Press).

Используемый здесь термин "иммуноглобулин" включает в себя различные большие классы полипептидов, которые можно различить биохимически. Специалистам в данной области техники известно, что тяжелые цепи классифицируются как гамма, мю, альфа, дельта или эпсилон (γ , μ , α , δ , ϵ), с выделением среди них нескольких подклассов (например, $\gamma 1$ - $\gamma 4$). Эти обозначения соответствуют природе этой цепи, которая определяет "класс" антитела как IgG, IgM, IgA, IgG или IgE, соответственно. Подклассы иммуноглобулинов (изотипы), например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, и т.д. хорошо охарактеризованы, и известно, что они придают функциональную специализацию. Модифицированные варианты каждого из этих классов и изотипов легко различимы для специалиста в данной области техники с учетом настоящего описания и, таким образом, включены в объем настоящего изобретения. Все классы иммуноглобулинов явным образом включены в объем настоящего изобретения, последующее обсуждение будет в основном относиться к молекулам иммуноглобулинов класса IgG. Что касается IgG, то стандартная молекула иммуноглобулина содержит два идентичных полипептида легкой цепи с молекулярной массой приблизительно 23000 Дальтон, и два идентичных полипептида тяжелой цепи с молекулярной массой 53000-70000. Эти четыре цепи, как правило, соединены дисульфидными связями в "Y" конфигурации, где легкие цепи связываются с тяжелыми цепями, начиная с устья "Y" и продолжаясь через вариабельную область.

Легкие цепи классифицируются или как каппа или как лямбда (κ , λ). Тяжелые цепи каждого класса могут быть связаны или с каппа или с лямбда легкой цепью. Как правило, легкая и тяжелая цепи ковалентно связаны друг с другом, и "хвостовые" части двух тяжелых цепей связаны друг с другом ковалентными дисульфидными связями или нековалентными связями, когда иммуноглобулины синтезируются или гибридомами, В-лимфоцитами или генетически модифицированными клетками-хозяевами. В тяжелых цепях аминокислотные последовательности расположены от N-конца в вилкообразных концах Y-конфигурации к C-концу внизу каждой цепи.

Как легкие, так и тяжелые цепи разделены на области структурной и функциональной гомологии. Термины "константный" и "вариабельный" используются функционально. В связи с этим, следует понимать, что вариабельные домены частей как легкой (VL или VK), так и тяжелой (VH) цепи определяют распознавание антигена и специфичность. В противоположность этому, константные домены легкой цепи (CL) и тяжелой цепи (CH1, CH2 или CH3) придают важные биологические свойства, такие как секреция, трансплацентарная подвижность, связывание с Fc-рецептором, связывание с комплементом и тому подобное. По установленному правилу порядковый номер константного домена увеличивается по мере его удаления от антигенсвязывающего сайта или аминоконца антитела. N-концевая часть представляет собой вариабельную область, а C-концевая часть представляет собой константную область; домены CH3 и CL фактически соответствуют карбоксильному концу тяжелой и легкой цепи, соответственно.

Как указано выше, вариабельная область позволяет антителу избирательно распознавать и специфично связываться с эпитопами антигенов. То есть, домен VL и домен VH и группа определяющих комплементарность областей (CDRs) внутри этих вариабельных доменов антитела объединяются с образованием вариабельной области, которая определяет трехмерный антигенсвязывающий сайт. Эта четвертичная структура антитела образует антигенсвязывающий сайт, расположенный на конце каждого плеча Y-структуры. В частности, антигенсвязывающий сайт определяется тремя CDRs на каждой из VH и VL цепей. В некоторых случаях, например, когда некоторые молекулы иммуноглобулинов получены из верблюжьих или сконструированы на основе верблюжьих иммуноглобулинов, целая молекула иммуноглобулина может состоять из только из тяжелых цепей, совсем не имея легких цепей. См., например,

Hamers-Casterman et al., Nature 363: 446-448 (1993).

В существующих в природе антителах шесть "определяющих комплементарность областей" или "CDRs", присутствующих в каждом антигенсвязывающем домене, представляют собой короткие, несмежные последовательности аминокислот, которые расположены определенным образом, чтобы образовывать антигенсвязывающий домен, когда антитело принимает свою трехмерную конфигурацию в водной среде. Остальные аминокислоты в антигенсвязывающих доменах, именуемые "каркасными" областями, обладают меньшей межмолекулярной вариабельностью. Каркасные области в большинстве случаев принимают конформацию β -складчатого слоя, и CDRs образуют петли, которые соединяют и в некоторых случаях образуют часть β -складчатой структуры. Таким образом, каркасные области действуют, образуя основу, которая обеспечивает расположение CDRs в правильной ориентации за счет нековалентных взаимодействий между цепями. Антигенсвязывающий домен, образованный сориентированными CDRs определяет поверхностную комплементарность к эпитопу иммунореактивного антигена. Эта комплементарная поверхность стимулирует нековалентное связывание антитела с распознаваемым им эпитопом. Аминокислоты, образующие CDRs и каркасные области, соответственно, легко могут быть идентифицированы средним специалистом в данной области техники для любого конкретного вариабельного домена тяжелой или легкой цепи, так как они были точно охарактеризованы (см. ниже).

В случае, когда существует два или более определений термина, который используется и/или принят в данной области техники, предполагается, что определение термина, используемого в настоящем изобретении, включает в себя все такие значения, если явно не указано противоположное. Конкретным примером является использование термина "определяющая комплементарность область" ("CDR") для описания несмежных антигенсвязывающих сайтов, обнаруженных в вариабельной области полипептидов как тяжелой, так и легкой цепи. Эта конкретная область была описана в работах Kabat et al. (1983) U.S. Dept. of Health and Human Services, "Sequences of Proteins of Immunological Interest" и Chothia and Lesk, J. Mol. Biol. 196: 901-917 (1987), которые включены в настоящее изобретение путем ссылки, в них определения включают в себя перекрывание или группы аминокислотных остатков, при сравнении друг с другом. Тем не менее, предполагается, что применение каждого определения для обозначения CDR антитела или его варианта включено в объем термина, определенного и используемого в настоящем изобретении. Соответствующие аминокислотные остатки, которые образуют CDRs, как указано в обоих процитированных выше источниках, приведены ниже в табл. 1 в сравнении. Точные номера остатков, которые образуют конкретную CDR, будут изменяться в зависимости от последовательности и размера CDR. Специалисты в данной области техники легко смогут определить какие остатки образуют конкретную CDR данной аминокислотной последовательности вариабельной области антитела.

Таблица 1. Определения CDR¹

	Kabat	Chothia
VH CDR1	31-35	26-32
VH CDR2	50-65	52-58
VH CDR3	95-102	95-102
VL CDR1	24-34	26-32
VL CDR2	50-56	50-52
VL CDR3	89-97	91-96

¹Нумерация всех определений CDR в табл. 1 соответствует нумерации, принятой в работе Kabat et al. (см. ниже).

В работе Kabat et al. также определена система нумерации последовательностей вариабельных доменов, которая применима к любому антителу. Специалист в данной области техники может однозначно применять эту систему нумерации по Kabat к любой последовательности вариабельных доменов, без получения каких-либо экспериментальных данных кроме самой последовательности. Используемый здесь термин "нумерация по Kabat" относится к системе нумерации, описанной в Kabat et al. (1983) U.S. Dept. of Health and Human Services, "Sequence of Proteins of Immunological Interest". Если не указано иное, то ссылки на нумерацию положения конкретного аминокислотного остатка в анти-SEMA4D антителе или его антигенсвязывающем фрагменте, варианте или производном в настоящем описании сделаны в соответствии с системой нумерации по Kabat.

Антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, варианты или производные настоящего изобретения включают в себя без ограничений поликлональные, моноклональные, мультиспецифичные, биспецифичные, человеческие, гуманизированные, приматизированные или гибридные антитела, одноцепочечные антитела, эпитопсвязывающие фрагменты, например, Fab, Fab' и F(ab')₂, Fd, Fvs, одноцепочечные Fvs (scFv), связанные дисульфидной связью Fvs (sdFv), фрагменты, содержащие или домен VL или домен VH, фрагменты, получаемые экспрессией библиотеки Fab, и антиидиотипические (анти-Id) антитела (включая, например, анти-Id антитела к анти-SEMA4D антителам, раскрытым в настоящем изобретении). Молекулы scFv известны из уровня техники и описаны, например, в патенте США No.5892019. Молеку-

лы иммуноглобулина или антитела настоящего изобретения могут быть молекулами иммуноглобулина любого типа (например, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA и IgY), класса (например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и IgA2, и т.д.) или подкласса.

Используемый здесь термин "часть тяжелой цепи" включает в себя аминокислотные последовательности, полученные из тяжелой цепи иммуноглобулина. В некоторых вариантах осуществления изобретения полипептид, содержащий часть тяжелой цепи, содержит по меньшей мере один из следующих доменов: домен VH, домен CH1, шарнирный домен (например, верхнюю, среднюю и/или нижнюю шарнирную область), домен CH2, домен CH3 или его вариант или фрагмент. Например, связывающийся полипептид для применения в настоящем изобретении может содержать полипептидную цепь, содержащую домен CH1; полипептидную цепь, содержащую домен CH1, по меньшей мере часть шарнирного домена и домен CH2; полипептидную цепь, содержащую домен CH1 и домен CH3; полипептидную цепь, содержащую домен CH1, по меньшей мере часть шарнирного домена и домен CH3, или полипептидную цепь, содержащую домен CH1, по меньшей мере часть шарнирного домена, домен CH2 и домен CH3. В другом варианте осуществления изобретения полипептид настоящего изобретения содержит полипептидную цепь, содержащую домен CH3. Кроме того, у связывающегося полипептида для применения в настоящем изобретении может отсутствовать по меньшей мере часть домена CH2 (например, весь или часть домена CH2). Как указано выше, среднему специалисту в данной области техники будет понятно, что эти домены (например, части тяжелой цепи) могут быть модифицированы таким образом, что они будут отличаться по аминокислотной последовательности от существующей в природе молекулы иммуноглобулина.

В некоторых раскрытых здесь анти-SEMA4D антителах или их антигенсвязывающих фрагментах, вариантах или производных части тяжелой цепи одной полипептидной цепи мультимера являются идентичными таким частям второй полипептидной цепи мультимера. В альтернативном варианте содержащие часть тяжелой цепи мономеры настоящего изобретения не являются идентичными. Например, каждый мономер может содержать различный целевой сайт связывания, образуя, например, биспецифичное антитело. Биспецифичное антитело представляет собой искусственный белок, который состоит из фрагментов двух различных моноклональных антител и, следовательно, связывается с двумя различными типами антигена. Предполагается, что варианты формата биспецифичных антител включены в объем настоящего изобретения. Биспецифичные антитела могут быть получены с использованием методик, хорошо известных из уровня техники, например, см., например, Ghayur et al., *Expert Review of Clinical Pharmacology* 3.4 (July 2010): p491; Lu et al., *J. Biological Chemistry* Vol. 280, No. 20, p. 19665-19672 (2005); Marvin et al., *Acta Pharmacologica Sinica* 26(6): 649-658 (2005); и Milstein C et al., *Nature* 1983; 305: 537-40; 30 Brennan M et al., *Science* 1985; 229: 81-3; Thakur et al., *Curr Opin Mol Ther.* 2010 Jun; 12(3): 340-9; и публикацию заявки на Патент США No.2007/0004909.

Части тяжелой цепи связывающейся молекулы для применения в раскрытых здесь способах могут быть получены из различных молекул иммуноглобулинов. Например, часть тяжелой цепи полипептида может содержать домен CH1, полученный из молекулы IgG1 и шарнирную область, полученную из молекулы IgG3. В другом примере часть тяжелой цепи может содержать шарнирную область, часть которой получена из молекулы IgG1, а часть из молекулы IgG3. В другом примере часть тяжелой цепи может содержать гибридную шарнирную область, часть которой получена из молекулы IgG1, а часть из молекулы IgG4.

Используемый здесь термин "часть легкой цепи" включает в себя аминокислотные последовательности, полученные из тяжелой цепи иммуноглобулина, например из каппа или лямбда легкой цепи. В некоторых аспектах часть легкой цепи содержит по меньшей мере один из доменов VL или CL.

Раскрытые здесь анти-SEMA4D антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, варианты или производные могут быть описаны или охарактеризованы путем указания эпитопа(ов) или части(ей) антигена, например, раскрытого здесь целевого полипептида (например, SEMA4D), которые они распознают или с которыми специфично связываются. Часть целевого полипептида, которая специфично взаимодействует с антигенсвязывающим доменом антитела представляет собой "эпитоп" или "антигенную детерминанту". Целевой полипептид может содержать один эпитоп, но, как правило, содержит по меньшей мере два эпитопа, и может включать в себя любое количество эпитопов, в зависимости от размера, конфигурации и типа антигена. Кроме того, следует отметить, что "эпитоп" целевого полипептида может представлять собой или может включать в себя неполипептидные элементы, например, эпитоп может включать в себя боковую углеводную цепь.

Считается, что минимальный размер пептидного или полипептидного эпитопа для антитела составляет приблизительно от четырех до пяти аминокислот. Пептидные или полипептидные эпитопы могут содержать по меньшей мере семь, по меньшей мере девять и в некоторых случаях, по меньшей мере, от приблизительно 15 до приблизительно 30 аминокислот. Так как CDR может распознавать антигенный пептид или полипептид в его третичной форме, аминокислоты, образующие эпитоп, могут не быть следующими друг за другом, и в некоторых случаях они могут даже не находиться в одной пептидной цепи. Пептидный или полипептидный эпитоп, распознаваемый анти-SEMA4D антителами настоящего изобретения, может содержать последовательность, состоящую по меньшей мере из 4, по меньшей мере 5, по

меньшей мере 6, по меньшей мере 7, по меньшей мере 8, по меньшей мере 9, по меньшей мере 10, по меньшей мере 15, по меньшей мере 20, по меньшей мере 25 или от приблизительно 15 до приблизительно 30 следующих друг за другом или не следующих друг за другом аминокислот белка SEMA4D.

Термин "специфично связывается", как правило, означает, что антитело связывается с эпитопом через свой антигенсвязывающий домен, и что это связывание влечет за собой некоторую комплементарность между антигенсвязывающим доменом и эпитопом. В соответствии с этим определением антитело "специфично связывается" с эпитопом, когда оно связывается с этим эпитопом через свой антигенсвязывающий домен более легко, чем оно связывалось бы со случайным не родственным эпитопом. Термин "специфичность" используется в настоящем изобретении для описания относительного сродства, с которым определенное антитело связывается с определенным эпитопом. Например, антитело "А" может рассматриваться как имеющее более высокое сродство к данному эпитопу, по сравнению с антителом "В", или можно сказать, что антитело "А" связывается с эпитопом "С" с более высокой специфичностью или сродством, чем оно связывается с родственным эпитопом "D".

Термин "предпочтительно связывается" означает, что антитело специфично связывается с эпитопом более легко, чем оно связывалось бы с родственным, сходным, гомологичным или аналогичным эпитопом. Таким образом, антитело, которое "предпочтительно связывается" с данным эпитопом, с большей вероятностью связывается с этим эпитопом, чем с родственным эпитопом, даже если такое антитело может перекрестно реагировать с этим родственным эпитопом.

В качестве неограничивающего примера, можно считать, что антитело предпочтительно связывается с первым эпитопом, если оно связывается с указанным первым эпитопом с константой диссоциации (КД), которая меньше, чем КД антитела для второго эпитопа. В другом неограничивающем примере можно считать, что антитело предпочтительно связывается с первым антигеном, если оно связывается с первым эпитопом с аффинностью, которая по меньшей мере на один порядок величины меньше, чем КД антитела для второго эпитопа. В другом неограничивающем примере можно считать, что антитело предпочтительно связывается с первым эпитопом, если оно связывается с этим первым эпитопом с аффинностью, которая по меньшей мере на два порядка величины меньше, чем КД антитела для второго эпитопа.

В другом неограничивающем примере можно считать, что антитело предпочтительно связывается с первым эпитопом, если оно связывается с этим первым эпитопом со скоростью диссоциации (k_{off}), которая меньше, чем k_{off} антитела для второго эпитопа. В другом неограничивающем примере можно считать, что антитело предпочтительно связывается с первым эпитопом, если оно связывается с этим первым эпитопом с аффинностью, которая по меньшей мере на один порядок величины меньше, чем k_{off} антитела для второго эпитопа. В другом неограничивающем примере можно считать, что антитело предпочтительно связывается с первым эпитопом, если оно связывается с этим первым эпитопом с аффинностью, которая по меньшей мере на два порядка величины меньше, чем k_{off} антитела для второго эпитопа.

Считается, что антитело конкурентно ингибирует связывание эталонного антитела с данным эпитопом, если оно предпочтительно связывается с этим эпитопом в такой мере, что оно в некоторой степени блокирует связывание эталонного антитела с этим эпитопом. Конкурентное ингибирование может быть определено любым способом, известным из уровня техники, например, методом конкурентного ИФА. Считается, что антитело конкурентно ингибирует связывание эталонного антитела с данным эпитопом, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 60%, или по меньшей мере на 50%.

Используемый здесь термин "аффинность" относится к мере прочности связывания отдельного эпитопа с CDR молекулы иммуноглобулина. См., например, Harlow et al. (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed.) страницы 27-28. Используемый здесь термин "авидность" относится к общей стабильности комплекса между группой иммуноглобулинов и антигеном, то есть к функциональной прочности объединения смеси иммуноглобулинов с антигеном. См., например, Harlow страницы 29-34. Термин "авидность" относится как к аффинности отдельной молекулы иммуноглобулина в группе к конкретному эпитопу, так и к валентностям иммуноглобулинов и антигена. Например, взаимодействие между двухвалентным моноклональным антителом и антигеном с высоко повторяющейся эпитопной структурой, таким как полимер, с высокой степенью вероятности будет высоко авидным.

Раскрытые здесь анти-SEMA4D антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, варианты или производные также могут быть описаны или охарактеризованы путем указания их перекрестной реактивности. Используемый здесь термин "перекрестная реактивность" относится к способности антитела, специфичного по отношению к одному антигену, реагировать со вторым антигеном; и является мерой родства между двумя различными антигенными веществами. Таким образом, антитело является перекрестно реактивным, если оно связывается с эпитопом, отличным от того, который вызывает его образование.

Перекрестно реактивный эпитоп, как правило, имеет многие из тех структурных признаков комплементарности, которыми обладает индуцирующий эпитоп, и в некоторых случаях он фактически может обладать лучшей комплементарностью, чем оригинал.

Например, некоторые антитела обладают некоторой степенью перекрестной реактивности, при ко-

торой они связываются с родственными, но не идентичными эпитопами, например, с эпитопами, обладающими, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 55% и по меньшей мере 50% идентичности (вычисленной при помощи способов, известных из уровня техники и описанных в настоящем изобретении) с эталонным эпитопом. Можно считать, что антитело обладает небольшой или совсем не обладает перекрестной реактивностью, если оно не связывается с эпитопами, обладающими менее 95%, менее 90%, менее 85%, менее 80%, менее 75%, менее 70%, менее 65%, менее 60%, менее 55% и менее 50% идентичности (вычисленной при помощи способов, известных из уровня техники и описанных в настоящем изобретении) с эталонным эпитопом. Антитело может считаться "высоко специфичным" по отношению к конкретному эпитопу, если оно не связывается с любым другим аналогом, ортологом или гомологом этого эпитопа.

Раскрытые здесь анти-SEMA4D связывающиеся молекулы, например антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, варианты или производные, также могут быть описаны или охарактеризованы путем указания их аффинности связывания с полипептидом настоящего изобретения, например, SEMA4D, например, человеческим, мышинным или как человеческим, так и мышинным SEMA4D. В некоторых аспектах аффинность связывания включает в себя связывание с константой диссоциации или Кд менее 5×10^{-2} М, 10^{-2} М, 5×10^{-3} М, 10^{-3} М, 5×10^{-4} М, 10^{-4} М, 5×10^{-5} М, 10^{-5} М, 5×10^{-6} М, 10^{-6} М, 5×10^{-7} М, 10^{-7} М, 5×10^{-8} М, 10^{-8} М, 5×10^{-9} М, 10^{-9} М, 5×10^{-10} М, 10^{-10} М, 5×10^{-11} М, 10^{-11} М, 5×10^{-12} М, 10^{-12} М, 5×10^{-13} М, 10^{-13} М, 5×10^{-14} М, 10^{-14} М, 5×10^{-15} М или 10^{-15} М. В некоторых вариантах осуществления изобретения раскрытая здесь анти-SEMA4D связывающаяся молекула, например антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, связывается с SEMA4D человека с Кд от приблизительно 5×10^{-9} до приблизительно 6×10^{-9} . В другом варианте осуществления изобретения раскрытая здесь анти-SEMA4D связывающаяся молекула, например антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, связывается с мышинным SEMA4D с Кд от приблизительно 1×10^{-9} до приблизительно 2×10^{-9} .

Используемый здесь термин "гибридное антитело" относится к любому антителу, в котором иммунореактивная область или сайт получена или происходит от первого вида, а константная область (которая может быть интактной, частичной или модифицированной) получена от второго вида. В некоторых вариантах осуществления изобретения целевая связывающаяся область или сайт будет получена из организм, не являющегося человеком, (например, мышь или примат), а константная область является человеческой.

Используемый здесь термин "сконструированное антитело" относится к антителу, в котором переменный домен или в тяжелой или в легкой цепи или в них обеих изменен путем, по меньшей мере, частичной замены одной или нескольких CDRs из антитела с известной специфичностью и, при необходимости, путем частичной замены каркасной области и изменения последовательности. Хотя CDRs могут быть получены из антитела того же класса или даже подкласса, что и антитело, из которого получены каркасные области, предполагается, что CDRs будут получены из антитела другого класса или из антитела из другого вида. Сконструированное антитело, в котором одна или несколько "донорных" CDRs из нечеловеческого антитела известной специфичности встроена в человеческую каркасную область легкой или тяжелой цепи, в настоящем изобретении именуется "гуманизованное антитело". В некоторых аспектах не является необходимым заменять все CDRs полными CDRs из донорного переменного домена для передачи антигенсвязывающей активности одного переменного домена другому. Вместо этого, могут быть перенесены только те остатки, которые необходимы для поддержания активности связывающего сайта в отношении целевого антигена.

Также допускается, что каркасные области внутри переменного домена в тяжелой или легкой цепи или в них обеих гуманизованного антитела могут содержать только остатки человеческого происхождения, и в этом случае эти каркасные области гуманизованного антитела именуется "полностью человеческие каркасные области" (например, Mab VX15/2503, раскрытое в публикации заявки на Патент США No.2010/0285036, как Mab 2503, полностью включенной в настоящее изобретение путем ссылки). В альтернативном варианте один или несколько остатков каркасной области(ей) донорного переменного домена могут быть встроены в соответствующее положение человеческой каркасной области(ей) переменного домена в тяжелой или легкой цепи или в них обеих гуманизованного антитела, если это необходимо для поддержания надлежащего связывания или для усиления связывания с антигеном SEMA4D. Человеческая каркасная область, которая была сконструирована с использованием такого подхода, таким образом, будет содержать смесь человеческих и донорных каркасных областей, и в настоящем изобретении она именуется "частично человеческая каркасная область".

Например, гуманизация анти-SEMA4D антитела может быть в основном выполнена способом, предложенном Winter и коллегами (Jones et al., Nature 321: 522-525 (1986); Riechmann et al., Nature 332: 323-327 (1988); Verhoeven et al., Science 239: 1534-1536 (1988)), путем замены неизменных или мутантных последовательностей CDRs или CDR грызунов соответствующими последовательностями анти-SEMA4D антитела человека. См. также Патенты США Nos. 5225539; 5585089; 5693761; 5693762; 5859205, включенные в настоящее изобретение путем ссылки. Полученное гуманизованное анти-

SEMA4D антитело будет содержать по меньшей мере одну неизмененную или мутантную CDR грызунов внутри полностью человеческих каркасных областей вариабельного домена тяжелой и/или легкой цепи гуманизированного антитела. В некоторых случаях остатки в пределах каркасных областей одного или нескольких вариабельных доменов гуманизированного анти-SEMA4D антитела заменены соответствующими нечеловеческим (например, свойственными грызунам) остатками (см., например, Патенты США Nos. 5585089; 5693761; 5693762 и 6180370), в этом случае получаемое гуманизированное анти-SEMA4D антитело будет содержать частично человеческие каркасные области внутри вариабельного домена тяжелой и/или легкой цепи. Аналогичные способы могут быть использованы для гуманизации анти-VEGF антитела.

Кроме того, гуманизированные антитела могут содержать остатки, которые не обнаружены в реципиентном антителе или в донорном антителе. Эти модификации проводят для дальнейшего улучшения характеристик антитела (например, для получения необходимой аффинности). Как правило, гуманизированное антитело будет содержать практически все по меньшей мере из одного и, как правило, двух вариабельных доменов, в которых все или практически все CDRs соответствуют CDRs нечеловеческого иммуноглобулина, и все или практически все каркасные области соответствуют каркасным областям последовательности иммуноглобулина человека. Гуманизированное антитело при необходимости также содержит по меньшей мере часть константной области иммуноглобулина (Fc), как правило, человеческого иммуноглобулина. Для более подробной информации см. Jones et al., *Nature* 331: 522-525 (1986); Riechmann et al., *Nature* 332: 323-329 (1988); и Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2: 593-596 (1992); включенные в настоящее изобретение путем ссылки. Соответственно, такие "гуманизированные" антитела могут включать в себя антитела, в которых практически интактный человеческий вариабельный домен заменен соответствующей последовательностью из вида, не являющегося человеком. На практике гуманизированные антитела, как правило, представляют собой человеческие антитела, в которых некоторые остатки в CDR и возможно некоторые остатки в каркасной области замещены остатками из аналогичных участков антител грызунов. См., например, Патент США No.6180370 и публикацию Международной патентной заявки No. WO 01/27160, в которых описаны гуманизированные антитела и способы получения гуманизированных антител, имеющих улучшенную аффинность к определенному антигену.

II. Описание целевого полипептида SEMA4D.

Используемые здесь термины "семафорин-4D", "SEMA4D" и "полипептид SEMA4D" применяются взаимозаменяемо, как и "SEMA4D" и "Sema4D". В некоторых вариантах осуществления изобретения SEMA4D экспрессируется на клеточной поверхности или секретируется клеткой. В другом варианте осуществления изобретения SEMA4D является мембраносвязанным. В другом варианте осуществления изобретения SEMA4D является растворимым, например, sSEMA4D. В другом варианте осуществления изобретения SEMA4D может включать в себя полноразмерный SEMA4D или его фрагмент, или вариант полипептида SEMA4D, где фрагмент SEMA4D или вариант полипептида SEMA4D сохраняет некоторые или все функциональные свойства полноразмерного SEMA4D.

Полноразмерный белок SEMA4D человека представляет собой гомодимерный трансмембранный белок, состоящий из двух полипептидных цепей массой 150 кДа. SEMA4D принадлежит к семафориновому семейству рецепторов клеточной поверхности, и также именуется как CD100. Как человеческий, так и мышинный SEMA4D/Sema4D протеолитически отщепляется от своей трансмембранной формы, с образованием растворимой формы массой 120 кДа, что приводит к образованию двух изоформ Sema4D (Kumanogoh et al., *J. Cell Science* 116(7): 3464 (2003)). Семафорины состоят из растворимого и мембраносвязанного белков, которые первоначально были определены как факторы аксонального наведения, которые играют важную роль в установлении точных связей между нейронами и соответствующими им мишенями. Структурно охарактеризованный семафорин класса IV SEMA4D состоит из аминокотерминальной сигнальной последовательности, за которой следует характерный домен "Sema", состоящий из 17 консервативных остатков цистеина, Ig-подобный домен, богатая лизином последовательность, гидрофобная трансмембранная область и цитоплазматический конец.

Полипептид SEMA4D включает в себя сигнальную последовательность из приблизительно 13 аминокислот, за которой следует домен семафорина из приблизительно 512 аминокислот, иммуноглобулин-подобный (Ig-подобный) домен из приблизительно 65 аминокислот, богатая лизином последовательность из 104 аминокислот, гидрофобная трансмембранная область из приблизительно 19 аминокислот и цитоплазматический конец из 110 аминокислот. Наличие в цитоплазматическом конце консенсусного сайта для фосфорилирования тирозина подтверждает предполагаемое наличие связи SEMA4D с тирозинкиназой (Schlossman et al., Eds. (1995) *Leucocyte Typing V* (Oxford University Press, Oxford).

Известно, что SEMA4D имеет по меньшей мере три функциональных рецептора: плексин B1, плексин B2 и CD72. Плексин B1 экспрессируется в нелимфоидных тканях, и было показано, что этот рецептор обладает высоким средством к SEMA4D (1 nM) (Tamagnone et al., *Cell* 99: 71-80 (1999)). Было показано, что стимуляция SEMA4D передачи сигнала через плексин B1 вызывает коллапс конусов роста нейронов и индуцирует процесс расширения коллапса и апоптоза олигодендроцитов (Giraudon et al., *J. Immunol.* 172:1246-1255 (2004); Giraudon et al., *NeuroMolecular Med.* 7: 207-216 (2005)). После связывания с SEMA4D сигнал через плексин B1 опосредует инактивацию R-Ras, что приводит к уменьшению интег-

ринопосредованного прикрепления к внеклеточному матриксу, а также активацию RhoA, что приводит к клеточному коллапсу в результате реорганизации цитоскелета. См. Kruger et al., *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 6: 789-800 (2005); Pasterkamp, *TRENDS in Cell Biology* 15: 61-64 (2005)). Плексин B2 имеет промежуточное сродство к SEMA4D, и в недавних работах было показано, что PLXNB2 экспрессируется на кератиноцитах и активирует SEMA4D-положительные $\gamma\delta$ Т-лимфоциты, что стимулирует восстановление эпителия (Witherden et al., *Immunity*. 2012 Aug 24;3 (2): 314-25).

В лимфоидных тканях CD72 играет роль рецептора SEMA4D с низким сродством (300 нм) (Kumanogoh et al., *Immunity* 13: 621-631 (2000)). В-лимфоциты и антигенпрезентирующие клетки (АПК), экспрессирующие CD72, и анти-CD72 антитела обладают многими из тех же свойств, которыми обладает sSEMA4D, например, усиливают CD40-индуцированный В-клеточный ответ и выделение CD23 В-лимфоцитами. Считается, что CD72 действует как отрицательный регулятор В-клеточного ответа за счет рекрутирования тирозинфосфатазы SHP-1, которая связана со многими ингибиторными рецепторами. Взаимодействие SEMA4D с CD72 приводит к диссоциации SHP-1 и прекращению этого отрицательного сигнала активации. Было показано, что SEMA4D активирует стимуляцию Т-лимфоцитов и агрегацию и выживание В-лимфоцитов *in vitro*. Добавление SEMA4D-экспрессирующих клеток или sSEMA4D усиливает CD40-индуцированную пролиферацию В-лимфоцитов и синтез иммуноглобулинов *in vitro*, и ускоряет образование антител *in vivo* (Ishida et al., *Inter. Immunol.* 15: 1027-1034 (2003); Kumanogoh and H. Kukutani, *Trends in Immunol.* 22: 670-676 (2001)). sSEMA4D усиливает CD40-индуцированное созревание ДК, включая активацию костимулирующих молекул и повышенную секрецию IL-12. Кроме того, sSEMA4D может ингибировать миграцию иммунных клеток, которая может быть обращена путем добавления блокирующих анти-SEMA4D мышинных антител (Elhabazi et al., *J. Immunol.* 166: 4341-4347 (2001); Delaire et al., *J. Immunol.* 166: 4348-4354 (2001)).

Sema4D экспрессируется на высоком уровне в лимфоидных органах, включая селезенку, тимус и лимфатические узлы, а также в нелимфоидных органах, таких как головной мозг, сердце и почки. В лимфоидных органах Sema4D в большом количестве экспрессируется в покоящихся Т-лимфоцитах, но лишь слабо экспрессируется в покоящихся В-лимфоцитах и антигенпрезентирующих клетках (АПК), таких как дендритные клетки (ДК).

Клеточная активация увеличивает поверхностную экспрессию SEMA4D, а также выработку растворимого SEMA4D (sSEMA4D). Характер экспрессии SEMA4D свидетельствует о том, что он играет важную физиологическую, а также патологическую роль в иммунной системе. Было показано, что SEMA4D стимулирует активацию, агрегацию и выживание В-лимфоцитов; усиливает CD40-индуцированную пролиферацию и синтез антител; повышает образование антител к Т-лимфоцитзависимым антигенам; повышает пролиферацию Т-лимфоцитов; усиливает созревание дендритных клеток и их способность стимулировать Т-лимфоциты; и непосредственно вовлечен в демиелинизацию и аксональную дегенерацию (Shi et al., *Immunity* 13: 633-642 (2000); Kumanogoh et al., *J Immunol* 169: 1175-1181 (2002); и Watanabe et al., *J Immunol* 167: 4321-4328 (2001)).

Мыши с нокаутом SEMA4D (SEMA4D^{-/-}) обеспечили получение дополнительных доказательств того, что SEMA4D играет важную роль как в гуморальном, так и в клеточном иммунном ответе. У SEMA4D^{-/-} мышей отсутствовали известные патологические изменения в нелимфоидных тканях. Дендритные клетки (ДК) у SEMA4D^{-/-} мышей обладают низкой аллостимулирующей способностью и имеют дефекты в экспрессии костимулирующих молекул, которые могут быть исправлены путем добавления sSEMA4D. У мышей, дефицитных по SEMA4D (SEMA4D^{-/-}), не развивается экспериментальный аутоиммунный энцефаломиелит, индуцируемый пептидом миелин-олигодендроцитарного гликопротеина, так как Т-лимфоциты, специфичные в отношении миелин-олигодендроцитарного гликопротеина, слабо продуцируются в отсутствие SEMA4D (Kumanogoh et al., *J Immunol* 169: 1175-1181 (2002)). Значительное количество растворимого SEMA4D также обнаружено в сыворотках крови MRL/lpr мышей с высоким риском аутоиммунных нарушений (модель системных аутоиммунных заболеваний, таких как СКВ), но не у нормальных мышей. Кроме того, уровень sSEMA4D коррелирует с уровнем аутоантител и повышается с возрастом (Wang et al., *Blood* 97: 3498-3504 (2001)). Также было показано, что растворимый SEMA4D накапливается в церебральной спинномозговой жидкости и сыворотке крови пациентов с демиелинизирующим заболеванием, и sSEMA4D вызывает апоптоз плюрипотентных нейронных предшественников (Dev cells), а также ингибирует процесс распространения и индукции апоптоза у крысиных олигодендроцитов *in vitro* (Giraudon et al., *J Immunol* 172(2): 1246-1255 (2004)). Этот апоптоз блокируется анти-SEMA4D моноклональным антителом (Mab).

III. Анти-SEMA4D антитела.

Антитела, которые связываются с SEMA4D, известны из уровня техники. См., например, следующие документы: заявки на Патент США Nos. 2008/0219971 A1, 2010/0285036 A1 2006/0233793 A1, Международные патентные заявки WO 93/14125, WO 2008/100995 и WO 2010/129917, и Herold et al., *Int. Immunol.* 7(1): 1-8 (1995), каждый из которых полностью включен в настоящее изобретение путем ссылки.

Настоящее изобретение в основном относится к способам ингибирования, замедления или уменьшения роста или метастазирования опухоли у субъектов, например, страдающих раком людей, включающим в себя введение антитела, которое специфично связывается с SEMA4D или его антигенсвязы-

вающим фрагментом, вариантом или производным. В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело блокирует взаимодействие SEMA4D с одним или несколькими из своих рецепторов, например, плексином В1 и/или плексином В2. В некоторых вариантах осуществления изобретения раковые клетки экспрессируют плексин В1 и/или плексин В2. Анти-SEMA4D антитела, обладающие этими свойствами, могут быть использованы в предложенных здесь способах. Антитела, которые могут быть использованы, включают в себя без ограничений MAbs VX15/2503, 67, 76, 2282 и их антигенсвязывающие фрагменты, варианты или производные, которые полностью описаны в заявках на Патент США 2010/0285036 А1 и 2008/0219971 А1. Дополнительные антитела, которые могут быть использованы в предложенных здесь способах, включают в себя антитело BD16, описанное в заявке на Патент США 2006/0233793 А1, а также его антигенсвязывающие фрагменты, варианты или производные; или любое из Mab 301, Mab 1893, Mab 657, Mab 1807, Mab 1656, Mab 1808, Mab 59, Mab 2191, Mab 2274, Mab 2275, Mab 2276, Mab 2277, Mab 2278, Mab 2279, Mab 2280, Mab 2281, Mab 2282, Mab 2283, Mab 2284 и Mab 2285, а также любые их фрагменты, варианты или производные, как описано в заявке на Патент США 2008/0219971 А1. В некоторых вариантах осуществления изобретения анти-SEMA4D антитело для использования в предложенных здесь способах связывается с человеческим, мышинным или как человеческим, так и мышинным SEMA4D. Также применимыми являются антитела, которые связываются с тем же эпитопом, что и любое из вышеупомянутых антител, и/или антитела, которые конкурентно ингибируют связывание или активность любого из вышеупомянутых антител.

В некоторых вариантах осуществления изобретения анти-SEMA4D антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, вариант или производное, пригодные для использования в предложенных здесь способах, имеют аминокислотную последовательность, которая обладает, по меньшей мере, приблизительно 80%, приблизительно 85%, приблизительно 88%, приблизительно 89%, приблизительно 90%, приблизительно 91%, приблизительно 92%, приблизительно 93%, приблизительно 94% или приблизительно 95% идентичности по последовательности с аминокислотной последовательностью молекулы эталонного анти-SEMA4D антитела, например, такого, которое описано выше.

В другом варианте осуществления изобретения анти-SEMA4D антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, вариант или производное, пригодные для использования в предложенных здесь способах, содержат, в основном состоят из или состоят из варибельного домена тяжелой цепи иммуноглобулина (домен VH), где по меньшей мере одна из CDRs домена VH имеет аминокислотную последовательность, которая, по меньшей мере, на приблизительно 80%, приблизительно 85%, приблизительно 90%, приблизительно 95%, приблизительно 96%, приблизительно 97%, приблизительно 98%, приблизительно 99% идентична или полностью идентична CDR1, CDR2 или CDR3 SEQ ID NO: 9, 10, 25 или 48.

В другом варианте осуществления изобретения анти-SEMA4D антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, вариант или производное, пригодные для использования в предложенных здесь способах, содержат, в основном состоят из или состоят из варибельного домена тяжелой цепи иммуноглобулина (домен VH), где по меньшей мере одна из CDRs домена VH имеет аминокислотную последовательность, которая, по меньшей мере, на приблизительно 80%, приблизительно 85%, приблизительно 90%, приблизительно 95%, приблизительно 96%, приблизительно 97%, приблизительно 98%, приблизительно 99% идентична или полностью идентична SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27 или SEQ ID NO: 28.

В другом варианте осуществления изобретения анти-SEMA4D антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, вариант или производное, пригодные для использования в предложенных здесь способах, содержат, в основном состоят из или состоят из варибельного домена тяжелой цепи иммуноглобулина (домен VH), где по меньшей мере одна из CDRs домена VH имеет аминокислотную последовательность идентичную, за исключением 1, 2, 3, 4 или 5 консервативных аминокислотных замен, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27 или SEQ ID NO: 28.

В другом варианте осуществления изобретения анти-SEMA4D антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, вариант или производное, пригодные для использования в предложенных здесь способах, содержат, в основном состоят из или состоят из домена VH, который имеет аминокислотную последовательность, которая, по меньшей мере, на приблизительно 80%, приблизительно 85%, приблизительно 90%, приблизительно 91%, приблизительно 92%, приблизительно 93%, приблизительно 94%, приблизительно 95%, приблизительно 96%, приблизительно 97%, приблизительно 98%, приблизительно 99% или 100% идентична SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 25 или SEQ ID NO: 48, где анти-SEMA4D антитело, содержащее кодируемый домен VH, специфично или предпочтительно связывается с SEMA4D.

В другом варианте осуществления изобретения анти-SEMA4D антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, вариант или производное, пригодные для использования в предложенных здесь способах, содержат, в основном состоят из или состоят из варибельного домена легкой цепи иммуноглобулина (домен VL), где по меньшей мере одна из CDRs домена VL имеет аминокислотную последовательность, которая, по меньшей мере, на приблизительно 80%, приблизительно 85%, приблизительно 90%, приблизительно 95%, приблизительно 96%, приблизительно 97%, приблизительно 98%, приблизительно 99% идентична или полностью идентична CDR1, CDR2 или CDR3 SEQ ID NO: 17, 18, 29 или 47.

В другом варианте осуществления изобретения анти-SEMA4D антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, вариант или производное, пригодные для использования в предложенных здесь способах, содержат, в основном состоят из или состоят из переменного домена легкой цепи иммуноглобулина (домен VL), где по меньшей мере одна из CDRs домена VL имеет аминокислотную последовательность, которая, по меньшей мере, на приблизительно 80%, приблизительно 85%, приблизительно 90%, приблизительно 95%, приблизительно 96%, приблизительно 97%, приблизительно 98%, приблизительно 99% идентична или полностью идентична SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31 или SEQ ID NO: 32.

В другом варианте осуществления изобретения анти-SEMA4D антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, вариант или производное, пригодные для использования в предложенных здесь способах, содержат, в основном состоят из или состоят из переменного домена легкой цепи иммуноглобулина (домен VL), где по меньшей мере одна из CDRs домена VL имеет аминокислотную последовательность идентичную, за исключением 1, 2, 3, 4 или 5 консервативных аминокислотных замен, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31 или SEQ ID NO: 32.

В другом варианте осуществления изобретения анти-SEMA4D антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, вариант или производное, пригодные для использования в предложенных здесь способах, содержат, в основном состоят из или состоят из домена VL, который имеет аминокислотную последовательность, которая, по меньшей мере, на приблизительно 80%, приблизительно 85%, приблизительно 90%, приблизительно 91%, приблизительно 92%, приблизительно 93%, приблизительно 94%, приблизительно 95%, приблизительно 96%, приблизительно 97%, приблизительно 98%, приблизительно 99% или 100% идентична SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 29 или SEQ ID NO: 47, где анти-SEMA4D антитело, содержащее кодируемый домен VL, специфично или предпочтительно связывается с SEMA4D.

Также для использования в способах настоящего изобретения предложены полипептиды, кодирующие анти-SEMA4D антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, варианты или производные, как описано здесь, полинуклеотиды, кодирующие такие полипептиды, векторы, содержащие такие полинуклеотиды, и клетки-хозяева, содержащие такие векторы или полинуклеотиды, все для получения анти-SEMA4D антител или их антигенсвязывающих фрагментов, вариантов или производных для использования в описанных здесь способах.

Подходящие биологически активные варианты анти-SEMA4D антител настоящего изобретения могут быть использованы в способах настоящего изобретения. Такие варианты сохраняют необходимые связывающие свойства исходного анти-SEMA4D антитела. Способы получения вариантов антител в основном известны из уровня техники.

Способы мутагенеза и изменений нуклеотидной последовательности хорошо известны из уровня техники. См., например, Walker and Gaastra, eds. (1983) *Techniques in Molecular Biology* (MacMillan Publishing Company, New York); Kunkel, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:488-492 (1985); Kunkel et al., *Methods Enzymol.* 154: 367-382 (1987); Sambrook et al. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor, N.Y.); Патент США No.4873192; и процитированные здесь источники информации; включенные в настоящее изобретение путем ссылки. Руководство по выбору аминокислотных замен, которые не нарушают биологическую активность целевого полипептида, можно найти в работе Dayhoff et al. (1978) в *Atlas of Protein Sequence and Structure* (Natl. Biomed. Res. Found., Washington, D.C.), pp. 345-352, которая полностью включена в настоящее изобретение путем ссылки. В модели Dayhoff et al. для определения подходящих консервативных замен используется матрица подобия аминокислот принятых мутаций (PAM) (матрица PAM 250). В некоторых аспектах используются консервативные замены, такие как замена одной аминокислоты на другую, имеющую аналогичные свойства. Примеры консервативных аминокислотных замен в соответствии с матрицей PAM 250 модели Dayhoff et al. включают в себя без ограничений Gly↔Ala, Val↔Ile↔Leu, Asp↔Glu, Lys↔Arg, Asn↔Gln и Phe↔Trp↔Tyr.

При конструировании вариантов анти-SEMA4D связывающейся молекулы, например, антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, целевых полипептидов, модификации осуществляются таким образом, чтобы варианты по-прежнему обладали необходимыми свойствами, например, были способны специфично связываться с SEMA4D, например, с человеческим, мышинным или как человеческим, так и мышинным SEMA4D, например, экспрессируемым на клеточной поверхности или секретируемым клеткой, и обладали SEMA4D-блокирующей активностью, как описано в настоящем изобретении. В некоторых аспектах мутации, введенные в ДНК, кодирующую вариант полипептида, сохраняют рамку считывания и не создают комплементарные области, которые могли бы образовывать вторичные структуры мРНК. См. публикацию Европейской патентной заявки No.75444.

Способы определения специфичности связывания анти-SEMA4D связывающейся молекулы, например, антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, варианта или производного, включают в себя без ограничений стандартный анализ конкурентного связывания, анализ динамики секреции иммуноглобулинов Т-лимфоцитами или В-лимфоцитами, анализ пролиферации Т-лимфоцитов, анализ апоптоза, ИФА и тому подобное. См., например, такие анализы, описанные в Международной патентной заявке WO 93/14125; Shi et al., *Immunity* 13: 633-642 (2000); Kumanogoh et al., *J Immunol* 169: 1175-1 181 (2002); Watanabe et al., *J Immunol* 167: 4321-4328 (2001); Wang et al., *Blood* 97: 3498-3504 (2001); и Giraudon et al.,

J Immunol 172(2): 1246-1255 (2004), все включены в настоящее изобретение путем ссылки.

Способы измерения антиангиогенной способности анти-SEMA4D антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, варианта или производного хорошо известны из уровня техники.

Когда в настоящем изобретении упоминается, что какой-либо раскрытый здесь конкретный полипептид, включая константные области, CDRs, домены VH или домены VL, по меньшей мере, на приблизительно 65%, приблизительно 70%, приблизительно 75%, приблизительно 80%, приблизительно 85%, приблизительно 90%, приблизительно 91%, приблизительно 92%, приблизительно 93%, приблизительно 94%, приблизительно 95%, приблизительно 96%, приблизительно 97%, приблизительно 98%, приблизительно 99% или даже приблизительно 100% идентичен другому полипептиду, % идентичности может быть определен с использованием методов и компьютерных программ/программного обеспечения, известных из уровня техники, таких как, но без ограничений, программа BESTFIT (Wisconsin Sequence Analysis Package, Version 8 for Unix, Genetics Computer Group, University Research Park, 575 Science Drive, Madison, Wis. 53711). BESTFIT использует алгоритм локальной гомологии Смита-Уотермана (Smith and Waterman (1981) Adv. Appl. Math. 2: 482-489) для поиска сегмента с наибольшей гомологией между двумя последовательностями. При использовании программы BESTFIT или любой другой программы выравнивания последовательностей для определения того обладает ли конкретная последовательность, например, 95% идентичности с эталонной последовательностью настоящего изобретения, предполагается, что параметры устанавливаются таким образом, чтобы процент идентичности вычислялся по полной длине эталонной полипептидной последовательности, и чтобы допускались разрывы гомологии размером до 5% от общего количества аминокислот в эталонной последовательности.

Для целей настоящего изобретения процент идентичности последовательности может быть определен с применением алгоритма поиска гомологии Смита-Уотермана, используя поиск аффинных пропусков со штрафом за открытие пропуска 12 и штрафом за продолжение пропуска 2, матрицы BLOSUM 62. Алгоритм поиска гомологии Смита-Уотермана описан в Smith and Waterman (1981) Adv. Appl. Math. 2: 482-489. Вариант, например, может отличаться от эталонного анти-SEMA4D антитела (например, Mab VX15/2503, 67, 76 или 2282) на всего лишь 1-15 аминокислотных остатков, всего лишь 1-10 аминокислотных остатков, например 6-10, всего лишь 5, всего лишь 4, 3, 2 или даже 1 аминокислотный остаток.

Константная область анти-SEMA4D антитела может быть мутирована для изменения эффекторной функции несколькими способами. Например, см. Патент США No.6737056B1 и публикацию заявки на Патент США No.2004/0132101A1, в которых раскрыты мутации Fc, оптимизирующие связывание антитела с Fc-рецепторами.

В некоторых анти-SEMA4D антителах или их фрагментах, вариантах или производных, пригодных для использования в предложенных здесь способах, область Fc может быть мутирована для уменьшения эффекторной функции при помощи методик, известных из уровня техники. Например, делеция или инактивация (при помощи точечных мутаций или другими способами) домена константной области может уменьшить связывание циркулирующего в кровотоке модифицированного антитела с Fc-рецептором, тем самым, повышая локализацию опухоли. В других случаях модификации константной области в соответствии с настоящим изобретением уменьшают связывание с комплементом, и таким образом сокращают время полужизни в сыворотке крови. Еще другие модификации константной области могут быть использованы для изменения дисульфидных связей или олигосахаридных групп, что позволит повысить локализацию, благодаря повышенной антигенной специфичности или пластичности антитела. Получаемые физиологический профиль, биодоступность и другие биохимические эффекты модификаций, такие как локализация опухоли, биораспределение и время полужизни в сыворотке крови, легко могут быть измерены и количественно определены при помощи хорошо известных иммунологических методов без проведения дополнительных экспериментов.

Анти-SEMA4D антитела для использования в способах настоящего изобретения включают в себя производные, которые модифицированы, например, путем ковалентного присоединения к антителу молекулы любого типа, таким образом, что ковалентное присоединение не препятствует специфичному связыванию антитела со своим родственным эпитопом. Например, но не в качестве ограничения, производные антител включают в себя антитела, которые были модифицированы, например, путем гликозилирования, ацетилирования, пегилирования, фосфорилирования, амидирования, дериватизации известными защищающими/блокирующими группами, протеолитического расщепления, связывания с клеточным лигандом или другим белком и т.д. Любые из многочисленных химических модификаций могут быть осуществлены при помощи известных методик, включая без ограничений специфичное химическое расщепление, ацетилирование, формилирование и т.д. Кроме того, производное может содержать одну или несколько неклассических аминокислот.

"Консервативная аминокислотная замена" представляет собой замену, в которой аминокислотный остаток заменен аминокислотным остатком, имеющим боковую цепь с аналогичным зарядом. Семейства аминокислотных остатков, имеющих боковые цепи с аналогичными зарядами, определены в данной области техники. Эти семейства включают в себя аминокислоты с основными боковыми цепями (например, лизин, аргинин, гистидин), кислотными боковыми цепями (например, аспарагиновая кислота, глутаминовая кислота), незаряженными полярными боковыми цепями (например, глицин, аспарагин, глутамин,

серин, треонин, тирозин, цистеин), неполярными боковыми цепями (например, аланин, валин, лейцин, изолейцин, пролин, фенилаланин, метионин, триптофан), бета-разветвленными боковыми цепями (например, треонин, валин, изолейцин) и ароматическими боковыми цепями (например, тирозин, фенилаланин, триптофан, гистидин). В альтернативном варианте мутации могут быть введены случайным образом по всей длине или в части кодирующей последовательности, например, путем насыщающего мутагенеза, и полученные таким образом мутанты могут быть подвергнуты скринингу на биологическую активность для выявления мутантов, которые сохраняют активность (например, способность связываться с анти-SEMA4D полипептидом, блокировать взаимодействие SEMA4D со своим рецептором или ингибировать, замедлять или уменьшать метастазирование у субъекта, например, страдающего раком пациента).

Например, возможно введение мутаций только в каркасные области или только в области CDR молекулы антитела. Введенные мутации могут представлять собой молчащие или нейтральные миссенс-мутации, т.е. они не оказывают никакого или оказывают слабое влияние на способность антитела связываться с антигеном. Мутации такого типа могут быть полезны для оптимизации использования кодонов или для улучшения синтеза антител гибридомой. В альтернативном варианте нейтральные миссенс-мутации могут изменять способность антитела связываться с антигеном. Специалист в данной области техники сможет получить и опробовать мутантные молекулы с желаемыми свойствами, такими как отсутствие изменения антигенсвязывающей активности или изменение антигенсвязывающей активности (например, улучшение антигенсвязывающей активности или изменение специфичности антитела). После мутагенеза кодируемый белок может быть стандартным образом экспрессирован, и функциональная и/или биологическая активность этого кодируемого белка (например, способность иммуноспецифично связываться по меньшей мере с одним эпитопом полипептида SEMA4D) может быть определена с помощью описанных здесь методов или с помощью стандартно измененных методик, известных из уровня техники.

В некоторых вариантах осуществления изобретения анти-SEMA4D антитела для использования в способах настоящего изобретения включают в себя по меньшей мере одну оптимизированную определяющую комплементарность область (CDR). Под термином "оптимизированная CDR" подразумевается, что CDR была модифицирована и оптимизирована для улучшения аффинности связывания и/или анти-SEMA4D активности, которые получает анти-SEMA4D антитело, содержащее оптимизированную CDR. Термины "анти-SEMA4D активность" или "SEMA4D-блокирующая активность" могут включать в себя активность, которая изменяет одну или несколько из следующих функций, связанных с SEMA4D: активация, агрегация и выживание В-лимфоцитов; CD40-индуцированная пролиферация и синтез антител; гуморальный иммунный ответ на Т-лимфоцит зависимые антигены; пролиферация Т-лимфоцитов и других иммунных клеток; созревание дендритных клеток; демиелинизация и аксональная дегенерация; апоптоз плюрипотентных нейронных предшественников и/или олигодендроцитов; индукция миграции эндотелиальных клеток; ингибирование спонтанной миграции моноцитов; ингибирование, замедление или уменьшение роста или метастазирования опухоли; связывание с плексином В1 или другим рецептором на клеточной поверхности, или любая другая активность, связанная с растворимым SEMA4D или SEMA4D, который экспрессируется на поверхности SEMA4D+ клеток. В конкретном варианте осуществления изобретения анти-SEMA4D активность включает в себя способность ингибировать, замедлять или уменьшать метастазирование опухоли, при этом ингибирование, замедление или уменьшение роста клеток первичной опухоли происходит или в комбинации с ингибированием, замедлением или уменьшением метастазирования опухоли, или ингибирование, замедление или уменьшение роста клеток первичной опухоли и ингибирование, замедление или уменьшение метастазирования опухоли происходят независимо. Анти-SEMA4D активность также может быть связана с уменьшением числа случаев или тяжести заболеваний, связанных с экспрессией SEMA4D, включая без ограничений различные типы рака, включая лимфомы, аутоиммунные заболевания, воспалительные заболевания, включая воспалительные заболевания центральной нервной системы (ЦНС) и периферической нервной системы (ПНС), отторжение трансплантата и инвазивный ангиогенез. Примеры оптимизированных антител на основе мышинового анти-SEMA4D MAб BD16 описаны в публикации заявки на Патент США No.2008/0219971 A1, Международной патентной заявке WO 93/14125 и работе Herold et al., *Int. Immunol.* 7(1): 1-8 (1995), каждая из которых полностью включена в настоящее изобретение путем ссылки. Модификации могут включать в себя замену аминокислотных остатков в CDR таким образом, что анти-SEMA4D антитело сохраняет специфичность по отношению к SEMA4D антигену и обладает улучшенной аффинностью связывания и/или улучшенной анти-SEMA4D активностью.

IV. Характеристики связывания анти-SEMA4D антител В некоторых вариантах осуществления изобретения связывающаяся молекула представляет собой антитело, которое специфично связывается с SEMA4D, или его антигенсвязывающий фрагмент, вариант или производное. В некоторых вариантах осуществления изобретения связывающаяся молекула связывается с эпитопом SEMA4D. Нуклеотидная и аминокислотная последовательность для одного варианта SEMA4D приведены в SEQ ID NO: 13 и SEQ ID NO: 14, соответственно, и для другого варианта SEMA4D приведены в SEQ ID NO: 15 и SEQ ID NO: 16. В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к анти-SEMA4D антителу, обозначенному как VX15/2503. Антитела, которые обладают характеристиками связывания антитела

VX15/2503, также раскрыты в настоящем изобретении. Такие антитела включают в себя без ограничений антитела, которые конкурируют в анализе конкурентного связывания с VX15/2503, а также антитела, которые связываются с эпитопом (как определено ниже), способным связываться с VX15/2503. Способы оценки того обладают ли антитела такими же или аналогичными характеристиками связывания, включают в себя традиционные способы количественного определения, такие как, например, определение и сравнение аффинности или авидности антител к антигенному эпитопу (например, пептиду SEMA4D). Другие, приведенные в качестве примера, способы сравнения характеристик связывания антител включают в себя конкурентный Вестерн-блоттинг, иммуоферментный анализ, твердофазный ИФА и проточную цитометрию. Способы оценки и сравнения характеристик связывания антитело-антиген хорошо известны из уровня техники. Также в настоящем изобретении предложены варианты и фрагменты VX15/2503, сохраняющие способность специфично связываться с SEMA4D. Антитела VX15/2503 и 67 имеют одинаковые 6 CDRs и связываются с тем же эпитопом SEMA4D.

В некоторых вариантах осуществления изобретения раскрыты здесь анти-SEMA4D антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, варианты или производные могут быть описаны или охарактеризованы путем указания эпитопа(ов) или части(ей) антигена, например, раскрытого здесь целевого полипептида (например, SEMA4D), которые они распознают или с которыми специфично связываются. Часть целевого полипептида, которая специфично взаимодействует с антигенсвязывающим доменом антитела представляет собой "эпитоп" или "антигенную детерминанту".

В некоторых вариантах осуществления изобретения предполагается, что "эпитоп" представляет собой часть антигенной молекулы, которая используется для получения антитела и/или с которой антитело будет специфично связываться. "Эпитоп SEMA4D" включает в себя часть белка SEMA4D, с которой связывается анти-SEMA4D антитело. Эпитопы могут содержать линейные аминокислотные остатки (т.е. остатки в эпитопе, расположенные последовательно один за другим в линейном виде), нелинейные аминокислотные остатки (именуемы здесь "нелинейные эпитопы" или "конформационные эпитопы"; эти эпитопы не расположены последовательно) или как линейные, так и нелинейные аминокислотные остатки. Нелинейные эпитопы или конформационные эпитопы также могут включать в себя аминокислотные остатки, которые участвуют в формировании общей конформации структуры распознавания антителом, но не являются необходимыми для связывания антитела. Как правило, эпитопы представляют собой короткие аминокислотные последовательности, например, около пяти аминокислот в длину. Системные методики для выявления эпитопов известны из уровня техники и описаны, например, в приведенных ниже примерах.

Целевой полипептид может содержать один эпитоп, но как правило содержит по меньшей мере два эпитопа и может включать в себя любое количество эпитопов в зависимости от размера, конформации и типа антигена. Кроме того, следует отметить, что "эпитоп" целевого полипептида может представлять собой или может включать в себя неполипептидные элементы, например, эпитоп может включать в себя боковую углеводную цепь.

Считается, что минимальный размер пептидного или полипептидного эпитопа для антитела составляет приблизительно от четырех до пяти аминокислот. Пептидные или полипептидные эпитопы могут содержать по меньшей мере семь, по меньшей мере девять или, по меньшей мере, от приблизительно 15 до приблизительно 30 аминокислот. Так как CDR может распознавать антигенный пептид или полипептид в его третичной форме, аминокислоты, образующие эпитоп, могут не быть следующими друг за другом, и в некоторых случаях они могут даже не находиться в одной пептидной цепи. Пептидный или полипептидный эпитоп, распознаваемый анти-SEMA4D антителами настоящего изобретения, может содержать последовательность, состоящую по меньшей мере из 4, по меньшей мере 5, по меньшей мере 6, по меньшей мере 7, по меньшей мере 8, по меньшей мере 9, по меньшей мере 10, по меньшей мере 15, по меньшей мере 20, по меньшей мере 25 или от приблизительно 15 до приблизительно 30 следующих друг за другом или не следующих друг за другом аминокислот белка SEMA4D.

В некоторых вариантах осуществления изобретения эпитоп имеет по меньшей мере 80, 85, 90, 95 или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью целевого полипептида (например, последовательностью, приведенной в SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 44 или SEQ ID NO: 46).

В некоторых вариантах осуществления изобретения эпитоп является идентичным аминокислотной последовательности целевого полипептида (например, последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 44 или SEQ ID NO: 46), за исключением 4, 3, 2, 1 или 0 аминокислотных замен. В другом варианте осуществления изобретения эпитоп является идентичным аминокислотной последовательности целевого полипептида (например, последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 44 или SEQ ID NO: 46), за исключением консервативных аминокислотных замен (например, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1 или 0 консервативных аминокислотных замен).

В некоторых вариантах осуществления изобретения эпитоп содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 44 или SEQ ID NO: 46. В другом варианте осуществления изобретения эпитоп представляет собой последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 44 или SEQ ID NO: 46. В некоторых вариантах осуществления изобретения эпитоп представляет собой линейный эпитоп. В некоторых вариантах осуществления изобретения эпитоп представляет собой конфор-

мационный эпитоп.

В некоторых вариантах осуществления изобретения эпитоп содержит, в основном состоит из или состоит из LKVPVYALFTPQLNNV (SEQ ID NO: 42, соответствующая остаткам от 304 до 320 полно-размерной аминокислотной последовательности SEMA4D, приведенной в SEQ ID NO: 1), KWTSFL-KARLIASRP (SEQ ID NO: 44, соответствующая остаткам от 270 до 284 полноразмерной аминокислотной последовательности SEMA4D, приведенной в SEQ ID NO: 1, где в положении 281 может быть цистеин или аланин) или EFVFRVLIPRIARV (SEQ ID NO: 46; соответствующая остаткам от 243 до 256 полно-размерной аминокислотной последовательности SEMA4D, приведенной в SEQ ID NO: 1). В некоторых вариантах осуществления изобретения эпитоп содержит одну или несколько аминокислотных последовательностей, приведенных в SEQ ID NO: 42, 44 и 46. В некоторых вариантах осуществления изобретения эпитоп представляет собой эпитоп прерывистого типа, включенный в домен, образованный остатками с 243 по 320 SEQ ID NO: 1.

V. Способы лечения с применением терапевтических анти-SEMA4D антител в качестве единственного агента или в комбинации по меньшей мере с одной иммуномодулирующей терапией.

Способы настоящего изобретения относятся к применению анти-SEMA4D или анти-плексин B1 связывающихся молекул, например антител, включая их антигенсвязывающие фрагменты, варианты и производные, или в качестве единственного агента, или в комбинации по меньшей мере с одной другой иммуномодулирующей терапией, для ингибирования, замедления или уменьшения роста или метастазирования опухоли у субъекта, нуждающегося в таком ингибировании, замедлении или уменьшении, например, у страдающего раком пациента. В некоторых вариантах осуществления изобретения раковые клетки экспрессируют рецептор SEMA4D, в некоторых вариантах рецептор представляет собой плексин B1. Хотя ниже обсуждается введение анти-SEMA4D антитела, описанные здесь способы в равной степени применимы к антигенсвязывающим фрагментам, вариантам и производным этих антител, которые сохраняют необходимые свойства антител настоящего изобретения, например, способны специфично связываться с SEMA4D, например, с человеческим, мышинным или человеческим и мышинным SEMA4D, обладают SEMA4D нейтрализующей активностью и/или блокируют взаимодействие SEMA4D со своими рецепторами. Описанные здесь способы также применимы к другим биологическим продуктам или низкомолекулярным лекарственным средствам, которые сохраняют необходимые свойства антител настоящего изобретения, например, способны специфично связываться с SEMA4D, например, с человеческим, мышинным или человеческим и мышинным SEMA4D, обладают SEMA4D нейтрализующей активностью и/или блокируют взаимодействие SEMA4D со своими рецепторами.

В одном варианте осуществления изобретения анти-SEMA4D молекулы, например антитела, включая их антигенсвязывающие фрагменты, варианты и производные, могут применяться в качестве единственного агента для ингибирования, замедления или уменьшения роста опухоли у субъекта, нуждающегося в таком ингибировании, замедлении или уменьшении, например, у страдающего раком пациента. В некоторых вариантах осуществления изобретения раковые клетки экспрессируют рецептор SEMA4D, такой как, например, плексин B1 или плексин B2. В других вариантах осуществления изобретения раковые клетки экспрессируют другие рецепторы, которые могут функционировать совместно с рецептором SEMA4D. Примером такого рецептора является HER2 (ErbB2). Примеры раковых заболеваний, при которых наблюдается экспрессия плексина B1 или плексина B2 в комбинации с Her2, включают в себя рак легкого, рак молочной железы, рак предстательной железы и рак яичников. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления изобретения анти-SEMA4D молекулы, например антитела, включая их антигенсвязывающие фрагменты, варианты и производные, могут применяться в качестве единственного агента для ингибирования, замедления или уменьшения роста опухоли у субъекта, страдающего раком легкого, раком молочной железы, раком предстательной железы или раком яичников.

В некоторых вариантах осуществления изобретения иммуномодулирующая терапия может включать в себя противораковую вакцину, иммуностимулирующие агенты, терапию адоптивными Т-лимфоцитами или антителами и ингибиторы блокады иммунных контрольных точек (Lizee et al. 2013. Harnessing the Power of the Immune System to Target Cancer. Annu. Rev. Med. Vol. 64 No. 71-90).

Противораковые вакцины. Противораковые вакцины активируют иммунную систему организма и естественную устойчивость к ненормальным клеткам, таким как раковые клетки, что приводит к устранению или контролю заболевания. Противораковые вакцины, как правило, состоят из опухолевого антигена в иммуногенном препарате, который активирует специфичные к опухолевому антигену клетки-хелперы и/или ЦТЛ и В-лимфоциты. Вакцины могут быть в виде различных препаратов, включая без ограничений дендритные клетки, особенно аутологичные дендритные клетки, активированные опухолевыми клетками или опухолевыми антигенами, гетерологичные опухолевые клетки, трансфицированные иммуностимулирующим агентом, таким как ГМКСФ, рекомбинантный вирус или белки или пептиды, которые, как правило, вводятся вместе с мощным иммуностимулятором, таким как CpG.

Имуностимулирующие агенты. Действие иммуностимулирующих агентов заключается в усилении или повышении иммунного ответа на опухоли, который при помощи различных механизмов подавляется у многих страдающих раком пациентов. Иммуномодулирующие терапии могут быть направлены на лимфоциты, макрофаги, дендритные клетки, натуральные клетки-киллеры (НК-клетки) или подклассы

этих клеток, такие как цитотоксические Т-лимфоциты (ЦТЛ) или натуральные киллерные Т-лимфоциты (НКТ). Благодаря взаимодействию иммунных каскадов, воздействие на одну группу иммунных клеток часто будет усилено распространением на другие клетки, например, усиленная активность антигенпрезентирующих клеток стимулирует ответ Т- и В-лимфоцитов. Примеры иммуностимулирующих агентов включают в себя без ограничений HER2, цитокины, такие как ГКСФ, ГМКСФ и IL-2, фракции клеточных мембран из бактерий, гликолипиды для активации натуральных киллерных Т-лимфоцитов (НКТ), CpG олигонуклеотиды.

Макрофаги, миелоидные фагоциты иммунной системы являются фундаментальной частью врожденного защитного механизма, которые могут стимулировать специфический иммунитет путем индукции рекрутирования и активации Т-лимфоцитов. Несмотря на это, их присутствие в опухолевом микроокружении связано с усиленным прогрессированием опухоли, и было показано, что оно стимулирует рост и распространение опухолевых клеток, ангиогенез и иммуносупрессию. Ключевыми факторами формирования их фенотипа являются сигналы микроокружения, воздействию которых подвергаются макрофаги, которые избирательно настраивают их функции в функциональном спектре от M1 (ингибирующей опухоль макрофаг) до M2 (стимулирующей опухоль макрофаг) крайних значений Sica et al., *Seminars in Cancer Biol.* 18: 349-355 (2008). Увеличенное количество макрофагов при раке, как правило, коррелирует с неблагоприятным прогнозом (Quails and Murray, *Curr. Topics in Develop. Biol.* 94: 309-328 (2011)). Из нескольких уникальных типов стромальных клеток, общих для солидных опухолей, опухоль-ассоциированные макрофаги (ОАМ) являются существенными для стимулирования прогрессирования опухоли. Воздействие на молекулярные пути, регулирующие ОАМ поляризацию ОАМ, является перспективным направлением противораковой терапии Ruffell et al., *Trends in Immunol.* 33: 119-126 (2012).

Перенос адоптивных клеток. Перенос адоптивных клеток может использовать основанный на Т-лимфоцитах цитотоксический ответ для атаки раковых клеток. Аутологичные Т-лимфоциты, которые обладают естественной или генноинженерной реактивностью в отношении рака пациента, получают и размножают *in vitro*, и затем переносят обратно страдающему раком пациенту. В одном исследовании было показано, что адоптивный перенос размноженных *in vitro* аутологичных опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов оказался эффективным способом лечения пациентов с метастатической меланомой (Rosenberg SA, Restifo NP, Yang JC, Morgan RA, Dudley ME (April 2008). "Adoptive cell transfer: a clinical path to effective cancer immunotherapy". *Nat. Rev. Cancer* 8 (4): 299-308). Это может быть достигнуто путем использования Т-лимфоцитов, которые обнаружены в удаленной у пациента опухоли. Эти Т-лимфоциты получили название опухоль-инфильтрирующие лимфоциты (ОИЛ), и предполагается, что они перемещаются в опухоль, благодаря своей специфичности к опухолевым антигенам. Размножение таких Т-лимфоцитов индуцируют *in vitro*, используя высокие концентрации IL-2, анти-CD3 и аллореактивных питающих клеток. Затем эти Т-лимфоциты переносят обратно пациенту вместе с экзогенным введением IL-2 для дополнительного усиления их противораковой активности. В других исследованиях аутологичные Т-лимфоциты трансфицировали гибридным рецептором антигена, чтобы сделать их реактивными в отношении целевого опухолевого антигена Liddy et al., *Nature Med.* 18: 980-7, (2012); Grupp et al., *New England J. Med.* 368: 1509-18, (2013)).

В других видах терапии переносом адоптивных клеток используются аутологичные дендритные клетки, подвергнутые воздействию природных или модифицированных опухолевых антигенов *ex vivo*, которые затем повторно вводили пациенту. Одним из таких препаратов, одобренных Управлением по контролю пищевых продуктов и лекарственных средств США, является Provenge, в котором аутологичные клетки инкубировали со слитым белком простатической кислой фосфатазы и ГМКСФ, для лечения пациентов с опухолями предстательной железы. Считается, что ГМКСФ стимулирует дифференцировку и активность антигенпрезентирующих дендритных клеток (Small et al., *J. Clin. Oncol.* 18: 3894-903(2000); Патент США No.7414108)).

Блокада иммунных контрольных точек. Терапии с использованием блокады иммунных контрольных точек усиливают Т-клеточный иммунитет путем устранения контроля отрицательной обратной связи, который ограничивает развивающийся иммунный ответ. Терапии этого типа воздействуют на ингибирующие пути в иммунной системе, которые являются критическими для изменения продолжительности и амплитуды физиологического иммунного ответа в периферических тканях (анти-CTLA4) или опухолевой ткани, экспрессирующей PD-L1 (анти-PD1 или анти PD-L1) для минимизации повреждения расположенных рядом тканей. Опухоли могут развиваться, используя некоторые пути иммунных контрольных точек в качестве основного механизма иммунной устойчивости к Т-лимфоцитам, которые являются специфичными к опухолевым антигенам. Так как многие иммунные контрольные точки инициируются взаимодействиями лиганд-рецептор, эти контрольные точки могут быть заблокированы антителами к их рецептору или лиганду, или могут быть модулированы растворимыми рекомбинантными формами лигандов и рецепторов. Нейтрализация иммунных контрольных точек позволяет опухоль-специфичным Т-лимфоцитам продолжать выполнять свои функции в опухолевом микроокружении, которое в противном случае являлось бы иммуносупрессивным. Примерами терапий с использованием блокады иммунных контрольных точек являются те, которые воздействуют на связанный с цитотоксическими Т-лимфоцитами антиген 4 (CTLA-4), PD-1, его лиганд PD-L1, LAG3 и B7-H3.

меньшей мере с одной другой иммуномодулирующей терапией, для лечения страдающих раком пациентов с повышенными уровнями В-лимфоцитов, Т-лимфоцитов или В-лимфоцитов и Т-лимфоцитов в кровотоке, по сравнению с другими пациентами с солидными опухолями, таким как те, которые обнаружены в головном мозге, яичниках, молочной железе, толстой кишке и других тканях, за исключением гематологических видов рака. Используемый здесь термин "повышенный" относится к страдающим раком пациентам, у которых среднее количество В-лимфоцитов и/или Т-лимфоцитов в кровотоке, по меньшей мере, приблизительно в 1,5 раза, например, от приблизительно 1,5 до приблизительно 5 раз, например, в 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5 или 5 раз выше, чем в кровотоке других страдающих раком пациентов. В одном неограничивающем примере в группе из 34 пациентов с солидными опухолями среднее количество В-лимфоцитов составляло 98 на микролитр крови, и среднее количество Т-лимфоцитов составляло 782 на микролитр крови. Соответственно, среднее количество В-лимфоцитов и Т-лимфоцитов на микролитр крови, наблюдаемое в этой группе страдающих раком пациентов с повышенными уровнями В-лимфоцитов и Т-лимфоцитов, может находиться в диапазоне от приблизительно 147 до приблизительно 588 и от приблизительно 1173 до приблизительно 3910, соответственно, по сравнению с другими страдающими раком пациентами.

В другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к применению анти-SEMA4D или анти-плексин В1 связывающихся молекул, например антител, включая их антигенсвязывающие фрагменты, варианты или производные, или в качестве единственного агента или в комбинации по меньшей мере с одной другой иммуномодулирующей терапией, для лечения страдающих раком пациентов с уровнями В-лимфоцитов, Т-лимфоцитов или В-лимфоцитов и Т-лимфоцитов в кровотоке, которые находятся в диапазоне значений, характерном для нормальных индивидов, или превышают его. Используемый здесь термин "нормальный" относится к уровням В- и/или Т-лимфоцитов, которые обнаружены у здоровых, не имеющих рака пациентов. Используемый здесь термин "находятся в диапазоне" относится к десяти (10) процентной разнице в уровнях В- и/или Т-лимфоцитов. В одном неограничивающем примере диапазон нормальных уровней включает в себя, например, количество В-лимфоцитов приблизительно 250 клеток на микролитр или более и/или количество Т-лимфоцитов приблизительно 1500 клеток на микролитр или более. Таким образом, среднее количество В-лимфоцитов и Т-лимфоцитов на микролитр крови у страдающих раком пациентов с повышенными уровнями В-лимфоцитов и Т-лимфоцитов может находиться в диапазоне от приблизительно 225 до приблизительно 275 или более и от приблизительно 1350 до приблизительно 1650 и более, соответственно, по сравнению со здоровыми, не имеющими рака пациентами. Разумеется, специалисту в данной области техники должно быть понятно, что уровни В- и Т-лимфоцитов могут изменяться в зависимости различных факторов, например, типа рака, стадии рака и т.д. и поэтому уровни, которые являются ниже указанных выше, также могут считаться повышенными уровнями для определенного типа или стадии рака.

В некоторых вариантах осуществления изобретения абсолютные количества Т- и В-лимфоцитов измеряют с помощью валидированного иммунофенотипического анализа на основе проточной цитометрии, который представляет собой шестичетный прямой иммунофлуоресцентный анализ (BD Multitest 6-color TBNK Reagent), в котором также используются пробирки BD Trucount и проточный цитометр BD FACScanto. Этот анализ стандартно используется для определения процентного содержания и абсолютного количества Т-, В- и НК-клеток, а также CD4 и CD8 субпопуляций Т-лимфоцитов в периферической крови. Клетки периферической крови сначала анализируют при установленном значении окна дискриминации, оптимальном для CD45+ лимфоцитов. При этом значении окна дискриминации Т-лимфоциты определяются как CD3+ клетки, а В-лимфоциты при этом значении окна дискриминации определяются как CD19+ CD3-- клетки. Процентное содержание просто получают непосредственно в виде данных проточного цитометра после установки соответствующего значения окна дискриминации, а абсолютное количество вычисляют по следующей формуле, взятой непосредственно из инструкции фирмы-производителя BD: [(число сигналов в клеточной популяции/число сигналов в области для абсолютного количества гранул)]* [(значение для гранул/контрольное значение⁶¹) /рабочий объем] = абсолютное значение для клеточной популяции, где "а" представляет собой значение, указанное на этикетке фольгированного пакета для пробирок BD Trucount.

Следует также понимать, что описанные здесь способы также применимы при замене анти-SEMA4D связывающихся молекул анти-плексин В1 связывающимися молекулами. В некоторых вариантах осуществления изобретения анти-плексин В1 связывающаяся молекула может применяться для ингибирования взаимодействия SEMA4D с плексином В1 путем блокирования связывания SEMA4D с плексином В1 и/или путем предотвращения активации плексина В1 SEMA4D. Следует также понимать, что описанные здесь способы также применимы при использовании низкомолекулярных лекарственных средств или других биологических продуктов для ингибирования активности SEMA4D или плексина В1. В некоторых вариантах осуществления изобретения низкомолекулярное лекарственное средство или биологический продукт, отличные от анти-SEMA4D связывающейся молекулы, могут применяться для ингибирования взаимодействия SEMA4D с плексином В1 путем блокирования связывания SEMA4D с плексином В1 и/или путем предотвращения активации плексина В1 SEMA4D.

В одном варианте осуществления изобретения лечение включает в себя применение или введение

анти-SEMA4D связывающейся молекулы, например антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, как описано здесь, в качестве единственного агента или в комбинации по меньшей мере с одной другой иммуномодулирующей терапией пациенту, или применение или введение анти-SEMA4D связывающейся молекулы в качестве единственного агента или в комбинации по меньшей мере с одной другой иммуномодулирующей терапией в полученные от пациента ткань или клеточную линию, где пациент имеет развивающиеся метастазы раковых клеток или подвержен риску такого развития. В другом варианте осуществления изобретения также предполагается, что лечение включает в себя применение или введение фармацевтической композиции, содержащей анти-SEMA4D связывающиеся молекулы, например антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, пациенту в комбинации по меньшей мере с одной другой иммуномодулирующей терапией, или применение или введение фармацевтической композиции, содержащей анти-SEMA4D связывающуюся молекулу и по меньшей мере одну другую иммуномодулирующую терапию в полученные от пациента ткань или клеточную линию, где пациент имеет развивающиеся метастазы раковых клеток или подвержен риску такого развития.

Анти-SEMA4D связывающиеся молекулы, например антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, как описано здесь, в качестве единственного агента или в комбинации по меньшей мере с одной другой иммуномодулирующей терапией, применимы для лечения различных злокачественных и доброкачественных опухолей. Под термином "противоопухолевая активность" подразумевается уменьшение скорости продуцирования или накопления SEMA4D, связанного непосредственно с опухолью или опосредованно со стромальными клетками опухолевого окружения, и таким образом уменьшение скорости роста существующей опухоли или опухоли, которая возникает во время терапии, и/или разрушение существующих неопластических (опухолевых) клеток или вновь образующихся опухолевых клеток, и таким образом уменьшение общего размера опухоли и/или количества очагов метастазирования во время терапии. Например, терапия по меньшей мере одним анти-SEMA4D антителом в качестве единственного агента или в комбинации по меньшей мере с одной другой иммуномодулирующей терапией вызывает физиологический ответ, например, уменьшение метастазирования, что является благоприятным следствием лечения стадий заболевания, связанных SEMA4D-экспрессирующими клетками у человека.

В одном варианте осуществления настоящее изобретение относится к применению анти-SEMA4D связывающихся молекул, например антител или их антигенсвязывающих фрагментов, вариантов или производных, в качестве единственного агента или в комбинации по меньшей мере с одной другой иммуномодулирующей терапией, в качестве лекарственного средства, для лечения или профилактики рака или для применения при предраковых состояниях или поражениях для ингибирования, уменьшения, предотвращения, замедления или минимизации роста или метастазирования опухолевых клеток.

В соответствии со способами настоящего изобретения по меньшей мере одна анти-SEMA4D связывающаяся молекула, например антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, вариант или производное, в качестве единственного агента или в комбинации по меньшей мере с одной другой иммуномодулирующей терапией, может применяться для стимулирования положительного терапевтического ответа по отношению злокачественной клетке человека. Под термином "положительный терапевтический ответ" по отношению к лечению рака подразумевается улучшение в заболевании в связи с противоопухолевой активностью этих связывающихся молекул, например антител или их фрагментов, и/или улучшение симптомов, связанных с этим заболеванием. В частности, предложенные здесь способы направлены на ингибирование, предотвращение, уменьшение, облегчение, замедление или снижение роста опухоли и/или развития метастазов первичных опухолей у пациента. Другими словами, можно наблюдать предотвращение роста дистальных опухолей. Таким образом, например, улучшение в заболевании может быть охарактеризовано как полный ответ. Под термином "полный ответ" подразумевается отсутствие клинически обнаруживаемых метастазов с нормализацией любых ранее обнаруженных при помощи рентгенографических исследований отклонений от нормы, например, в области первичной опухоли или присутствие метастазов опухоли в косном мозге. Кроме того, улучшение в заболевании может рассматриваться как частичный ответ. Под термином "частичный ответ" подразумевается уменьшение по меньшей мере на 50% всех определяемых метастазов (т.е., количества опухолевых клеток, присутствующих у субъекта в областях, удаленных от первичной опухоли). Кроме того, улучшение в заболевании может рассматриваться как безрецидивная выживаемость или "выживаемость без прогрессирования заболевания". Под термином "безрецидивная выживаемость" подразумевается время до рецидива опухоли в любом месте. "Выживаемость без прогрессирования заболевания" представляет собой время до того момента, когда дальнейший рост опухоли может быть обнаружен в области, за которой ведется наблюдение.

Ингибирование, замедление или уменьшение метастазирования может быть оценено с использованием методик скрининга, таких как визуализация, например, визуализация флюоресцирующих антител, остеосцинтиграфия и биопсия образца опухоли, включая пункцию костного мозга (ПКМ), или иммуногистохимия. Кроме этих положительных терапевтических реакций, субъект, получающий в качестве терапии анти-SEMA4D связывающуюся молекулу, например антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, вариант или производное, может получать благотворный эффект от облегчения симптомов, связанных с этим заболеванием.

Клинический ответ может быть оценен с использованием методик скрининга, таких как магнитно-

резонансная томография (МРТ), рентгенография, компьютерная томография (КТ), проточная цитометрия или сортировка флуоресцентно-активированных клеток (FACS анализ), гистология, макропатология и биохимический анализ крови, включая без ограничения изменения, обнаруживаемые ИФА, РИА, хроматографией и тому подобными методами.

Для применения способов и систем настоящего изобретения в некоторых вариантах его осуществления образцы от пациента могут быть получены до или после введения терапии, включающей в себя или: (1) эффективное количество выделенной связывающейся молекулы, которая специфично связывается с семафорином-4D (SEMA4D), и эффективное количество по меньшей мере одной другой иммуномодулирующей терапии; или (2) эффективное количество выделенной связывающейся молекулы, которая специфично связывается с семафорином-4D (SEMA4D), субъекту, имеющему опухоль, которая является Her2+ и или плексин B1+ или плексин B2+. В некоторых случаях последовательные образцы могут быть получены от пациента после начала проведения терапии или после прекращения проведения терапии. Образцы, например, могут быть запрошены медицинским работником (например, врачом) или поставщиком медицинского обеспечения, получены и/или обработаны тем же или другим медицинским работником (например, медицинской сестрой, стационарным лечебным учреждением) или клинической лабораторией, и после обработки результаты могут быть направлены еще одному медицинскому работнику, поставщику медицинского обеспечения или пациенту. Аналогично измерение/определение одного или нескольких показателей, сравнение показателей, оценка показателей и решение о лечении могут осуществляться одним или несколькими медицинскими работниками, поставщиками медицинского обеспечения и/или клиническими лабораториями.

Используемый здесь термин "медицинский работник" относится к лицам или организациям, которые непосредственно взаимодействуют и оказывают помощь живым субъектам, например, больным людям. Неограничивающие примеры медицинских работников включают в себя врачей, медицинских сестер, лаборантов, терапевтов, фармацевтов, консультантов, представителей альтернативной медицины, медицинские учреждения, врачебные кабинеты, стационарные лечебные учреждения, пункты первой помощи, клиники, центры неотложной помощи, клиники/центры альтернативной медицины и любые другие организации, предоставляющие общее и/или специализированное лечение, обследование, поддерживающее лечение, терапию, медикаментозное лечение и/или консультации, касающиеся всего или любой части состояния здоровья пациента, включая без ограничений общее медицинское, специализированное медицинское, хирургическое и/или любой другой тип лечения, обследования, поддерживающего лечения, терапии, медикаментозного лечения и/или консультации.

В некоторых аспектах медицинский работник может поручать или давать указания другому медицинскому работнику проводить терапию, включающую в себя или: (1) эффективное количество выделенной связывающейся молекулы, которая специфично связывается с семафорином-4D (SEMA4D), и эффективное количество по меньшей мере одной другой иммуномодулирующей терапии; или (2) эффективное количество выделенной связывающейся молекулы, которая специфично связывается с семафорином-4D (SEMA4D), субъекту, имеющему или предположительно имеющему опухолевые клетки, которые являются Her2+ и или плексин B1+ или плексин B2+. Медицинский работник может выполнять сам или давать указания другому медицинскому работнику или пациенту выполнять следующие действия: получать образец, обрабатывать образец, предоставлять образец, получать образец, передавать образец, анализировать или измерять образец, проводить количественную оценку образца, предоставлять результаты, полученные после анализа/измерения/количественной оценки образца, получать результаты, полученные после анализа/измерения/количественной оценки образца, сравнивать/обсчитывать результаты, полученные после анализа/измерения/количественной оценки одного или нескольких образцов, предоставлять результаты сравнения/обсчета, полученные от одного или нескольких образцов, получать результаты сравнения/обсчета, полученные от одного или нескольких образцов, проводить терапию, включающую в себя например, (1) эффективное количество выделенной связывающейся молекулы, которая специфично связывается с семафорином-4D (SEMA4D), и эффективное количество по меньшей мере одной другой иммуномодулирующей терапии; или (2) эффективное количество выделенной связывающейся молекулы, которая специфично связывается с семафорином-4D (SEMA4D), субъекту, имеющему или предположительно имеющему опухолевые клетки, которые являются Her2+ и или плексин B1+ или плексин B2+, начинать проведение терапии, прекращать проведение терапии, продолжать проведение терапии, временно прерывать проведение терапии, увеличивать количество вводимого терапевтического агента, уменьшать количество вводимого терапевтического агента, продолжать введение количества терапевтического агента, увеличивать частоту введения терапевтического агента, уменьшать частоту введения терапевтического агента, поддерживать ту же частоту дозирования терапевтического агента, заменять терапию или терапевтический агент, по меньшей мере, другой терапией или терапевтическим агентом, комбинировать терапию или терапевтический агент, по меньшей мере, с другой терапией или дополнительным терапевтическим агентом. В некоторых аспектах поставщик медицинского обеспечения может разрешить или запретить, например, сбор образца, обработку образца, предоставление образца, получение образца, передачу образца, анализ или измерение образца, проведение количественной оценки образца, предоставление результатов, полученных после анализа/измерения/количественной оценки образ-

ца, перенесение результатов, полученных после анализа/измерения/количественной оценки образца, сравнение/обсчет результатов, полученных после анализа/измерения/количественной оценки одного или нескольких образцов, передачу результатов сравнения/обсчета, полученных от одного или нескольких образцов, введение терапии или терапевтического агента, начало введения терапии или терапевтического агента, прекращение введения терапии или терапевтического агента, продолжение введения терапии или терапевтического агента, временное прерывание введения терапии или терапевтического агента, увеличение количества вводимого терапевтического агента, уменьшение количества вводимого терапевтического агента, продолжение введения количества терапевтического агента, увеличение частоты введения терапевтического агента, уменьшение частоты введения терапевтического агента, поддержание той же частоты дозирования терапевтического агента, замену терапии или терапевтического агента, по меньшей мере, другой терапией или терапевтическим агентом или комбинирование терапии или терапевтического агента, по меньшей мере, с другой терапией или дополнительным терапевтическим агентом.

Кроме этого, поставщик медицинского обеспечения может разрешать или запрещать, например, назначение терапии, разрешать или запрещать раскрытие информации о терапии, разрешать или отказываться в возмещении расходов на терапию, утверждать или отказываться в праве на получение терапии и т.д.

В некоторых аспектах клиническая лаборатория может, например, собирать или получать образец, обрабатывать образец, предоставлять образец, получать образец, передавать образец, анализировать или измерять образец, проводить количественную оценку образца, предоставлять результаты, полученные после анализа/измерения/количественной оценки образца, получать результаты, полученные после анализа/измерения/количественной оценки образца, сравнивать/обсчитывать результаты, полученные после анализа/измерения/количественной оценки одного или нескольких образцов, предоставлять результаты сравнения/обсчета, полученные от одного или нескольких образцов, получать результаты сравнения/обсчета, полученные от одного или нескольких образцов или выполнять другие связанные с этим действия.

VI. Способы диагностики и лечения.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к способам лечения субъекта, например, страдающего раком пациента, где этот субъект имеет повышенные уровни или В-лимфоцитов, Т-лимфоцитов, или как В-лимфоцитов, так и Т-лимфоцитов, включающим в себя введение комбинации эффективного количества выделенной связывающейся молекулы, которая специфично связывается с семафорином-4D (SEMA4D), и эффективного количества по меньшей мере одной другой иммуномодулирующей терапии, если уровни В-лимфоцитов, Т-лимфоцитов, или как В-лимфоцитов, так и Т-лимфоцитов у субъекта превышают заранее определенный пороговый уровень В-лимфоцитов, Т-лимфоцитов, или как В-лимфоцитов, так и Т-лимфоцитов, или если эти уровни являются повышенными по сравнению с уровнями В-лимфоцитов, Т-лимфоцитов, или как В-лимфоцитов, так и Т-лимфоцитов в одном или нескольких контрольных образцах, которые могут включать в себя без ограничений образцы, полученные от других страдающих раком пациентов или от здоровых, не имеющих рака пациентов. Уровни В-лимфоцитов, Т-лимфоцитов, или как В-лимфоцитов, так и Т-лимфоцитов могут быть измерены медицинским работником или в клинической лаборатории, где образец, например образец крови, получен от пациента или медицинским работником или клинической лабораторией. В одном аспекте уровни В-лимфоцитов, Т-лимфоцитов, или как В-лимфоцитов, так и Т-лимфоцитов у пациента могут быть измерены при помощи иммунофенотипического анализа на основе проточной цитометрии.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение также относится к способу лечения субъекта, например, страдающего раком пациента, включающему в себя введение этому субъекту эффективного количества выделенной связывающейся молекулы, которая специфично связывается с семафорином-4D (SEMA4D), если экспрессия Her2 и или плексина В1 или плексина В2 в образце, взятом из опухолевых клеток субъекта, превышает заранее определенный пороговый уровень, или повышена по сравнению с экспрессией Her2 и или плексина В1 или плексина В2 в одном или нескольких контрольных образцах. Экспрессия Her2, плексина В1 и/или плексина В2 в опухолевых клетках субъекта может быть измерена медицинским работником или в клинической лаборатории на уровне белка и/или на уровне мРНК. В некоторых аспектах экспрессия Her2, плексина В1 и/или плексина В2 может быть измерена *in situ*, например, при помощи методов визуализации. В некоторых аспектах экспрессия Her2, плексина В1 и/или плексина В2 может быть измерена в образце опухолевых клеток, полученном от субъекта при помощи биопсии. В одном аспекте экспрессия Her2, плексина В1 и/или плексина В2 в опухолевых клетках может быть измерена при помощи иммуноанализа с использованием антител или их антигенсвязывающих фрагментов, которые распознают белки Her2, плексина В1 и/или плексина В2, или их антигенсвязывающих фрагментов, вариантов или производных. В другом аспекте экспрессия Her2, плексина В1 и/или плексина В2 может быть измерена при помощи количественного анализа генетической экспрессии, например, ОТ-ПЦР анализа.

Настоящее изобретение также относится к способам, методам анализа и наборам реагентов для облегчения определения медицинским работником, поставщиком медицинского обеспечения или клинической лабораторией того, получит ли субъект, например страдающий раком пациент, благоприятный эффект от лечения или:

(1) эффективным количеством выделенной связывающейся молекулы, которая специфично связывается с семафорин-4D (SEMA4D), и эффективным количеством по меньшей мере одной другой иммуномодулирующей терапии; или (2) эффективным количеством выделенной связывающейся молекулы, которая специфично связывается с семафорин-4D (SEMA4D), где субъект имеет или предположительно имеет опухолевые клетки, которые являются Her2+ и или плексин B1+ или плексин B2+. Предложенные здесь способы, методы анализа и наборы реагентов также будут облегчать определение медицинским работником, поставщиком медицинского обеспечения или клинической лабораторией того, получит ли субъект, например страдающий раком пациент, благоприятный эффект от лечения (1) эффективным количеством выделенной связывающейся молекулы, которая специфично связывается с семафорин-4D (SEMA4D), и эффективным количеством по меньшей мере одной другой иммуномодулирующей терапии; или (2) эффективным количеством выделенной связывающейся молекулы, которая специфично связывается с семафорин-4D (SEMA4D), (например, где опухолевые клетки субъекта экспрессируют или можно определить, что экспрессируют Her2 и или плексин B1 или плексин B2).

Настоящее изобретение также относится к способу лечения субъекта, например, страдающего раком пациента, включающему в себя введение эффективного количества выделенной связывающейся молекулы, которая специфично связывается с семафорин-4D (SEMA4D), и эффективного количества по меньшей мере одной другой иммуномодулирующей терапии, если уровень В-лимфоцитов, Т-лимфоцитов или Т-лимфоцитов и В-лимфоцитов в образце, полученном от пациента, превышает заранее определенный пороговый уровень, или превышает уровень В-лимфоцитов, Т-лимфоцитов или Т-лимфоцитов и В-лимфоцитов в одном или нескольких контрольных образцах. В некоторых аспектах образец получают от пациента и предоставляют для измерения уровня В-лимфоцитов, Т-лимфоцитов или Т-лимфоцитов и В-лимфоцитов в этом образце, например, в клиническую лабораторию.

Настоящее изобретение также относится к способу лечения субъекта, например, страдающего раком пациента, включающему в себя (а) предоставление образца, полученного от субъекта, для измерения уровня В-лимфоцитов, Т-лимфоцитов или Т-лимфоцитов и В-лимфоцитов в этом образце; и (b) введение этому субъекту эффективного количества выделенной связывающейся молекулы, которая специфично связывается с семафорин-4D (SEMA4D), и эффективного количества по меньшей мере одной другой иммуномодулирующей терапии, если уровень В-лимфоцитов, Т-лимфоцитов или Т-лимфоцитов и В-лимфоцитов у этого субъекта превышает заранее определенный пороговый уровень, или превышает уровень В-лимфоцитов, Т-лимфоцитов или Т-лимфоцитов и В-лимфоцитов в одном или нескольких контрольных образцах.

Настоящее изобретение также относится к способу лечения субъекта, например, страдающего раком пациента, включающему в себя (а) измерение уровня В-лимфоцитов, Т-лимфоцитов или Т-лимфоцитов и В-лимфоцитов в образце, полученном от субъекта, например, страдающего раком пациента, где уровень В-лимфоцитов, Т-лимфоцитов или Т-лимфоцитов и В-лимфоцитов в этом полученном от субъекта образце измерен, например, при помощи иммунофенотипического анализа на основе проточной цитометрии; (b) определение того, превышает ли уровень В-лимфоцитов, Т-лимфоцитов или Т-лимфоцитов и В-лимфоцитов в образце заранее определенный пороговый уровень, или превышает ли он уровень В-лимфоцитов, Т-лимфоцитов или Т-лимфоцитов и В-лимфоцитов в одном или нескольких контрольных образцах; и (c) рекомендацию, инструкции или разрешение медицинскому работнику вводить этому субъекту эффективное количество выделенной связывающейся молекулы, которая специфично связывается с семафорин-4D (SEMA4D), и эффективное количество по меньшей мере одной другой иммуномодулирующей терапии, если уровень В-лимфоцитов, Т-лимфоцитов или Т-лимфоцитов и В-лимфоцитов у этого субъекта превышает заранее определенный пороговый уровень, или превышает уровень В-лимфоцитов, Т-лимфоцитов или Т-лимфоцитов и В-лимфоцитов в одном или нескольких контрольных образцах.

В некоторых аспектах уровень В-лимфоцитов, Т-лимфоцитов или Т-лимфоцитов и В-лимфоцитов у субъекта может быть измерен при помощи иммунофенотипического анализа на основе проточной цитометрии. В некоторых аспектах анализ полученного от субъекта образца может быть проведен профессиональным медицинским работником, осуществляющим лечение пациента, например, используя описанную здесь методику анализа, представленную в виде диагностического набора реагентов для использования "по месту лечения". В некоторых аспектах образец может быть получен от субъекта и может быть передан, например, в клиническую лабораторию, для измерения уровня В-лимфоцитов, Т-лимфоцитов или Т-лимфоцитов и В-лимфоцитов в этом образце в соответствии с инструкциями профессионального медицинского работника, включая без ограничений использование описанного здесь иммунофенотипического анализа на основе проточной цитометрии. В некоторых аспектах клиническая лаборатория, проводящая анализ, может сообщать медицинскому работнику или поставщику медицинского обеспечения информацию о том, может ли субъект получить благоприятный эффект от лечения эффективным количеством выделенной связывающейся молекулы, которая специфично связывается с семафорин-4D (SEMA4D), и эффективным количеством по меньшей мере одной другой иммуномодулирующей терапии, если уровень В-лимфоцитов, Т-лимфоцитов или Т-лимфоцитов и В-лимфоцитов у этого субъекта превышает заранее определенный пороговый уровень, или превышает уровень В-лимфоцитов,

Т-лимфоцитов или В-лимфоцитов в одном или нескольких контрольных образцах.

В некоторых аспектах результаты иммуноанализа, как это предложено в настоящем изобретении, могут быть переданы поставщику медицинского обеспечения для определения того, покрывает ли страховка пациента лечение выделенной связывающейся молекулой, которая специфично связывается с семафорин-4D (SEMA4D), и по меньшей мере одной другой иммуномодулирующей терапией.

VII. Фармацевтические композиции и способы введения.

Способы получения и введения анти-SEMA4D связывающихся молекул, например, антител или их антигенсвязывающих фрагментов, вариантов или производных, в качестве единственного агента или в комбинации по меньшей мере с одной другой иммуномодулирующей терапией нуждающемуся в этом субъекту хорошо известны специалистам в данной области техники или легко могут быть определены ими. Способ введения анти-SEMA4D связывающейся молекулы, например, антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, варианта или производного, в качестве единственного агента или в комбинации по меньшей мере с одной другой иммуномодулирующей терапией может представлять собой пероральное введение, парентеральное введение, введение путем ингаляции или местного введения, одновременно или в разное время для каждого терапевтического агента. Используемый здесь термин "парентеральное" включает в себя, например, внутривенное, внутриартериальное, внутрибрюшинное, внутримышечное, подкожное, ректальное или вагинальное введение. Хотя явно предполагается, что все эти формы введения включены в объем настоящего изобретения, примером формы введения может служить раствор для инъекции, в частности, для внутривенной или внутриартериальной инъекции или инфузии. Подходящая для инъекции фармацевтическая композиция может включать в себя буфер (например, ацетатный, фосфатный или цитратный буфер) поверхностно-активное вещество (например, полисорбат), при необходимости стабилизирующий агент (например, человеческий альбумин) и т.д. Однако в других способах, совместимых с описанными здесь способами, анти-SEMA4D связывающиеся молекулы, например, антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, варианты или производные, в качестве единственного агента или в комбинации по меньшей мере с одной другой иммуномодулирующей терапией могут доставляться непосредственно в область нежелательной клеточной популяции, тем самым, увеличивая воздействие терапевтического агента на пораженную ткань.

Как уже было указано в настоящем изобретении, анти-SEMA4D связывающиеся молекулы, например, антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, варианты или производные, в качестве единственного агента или в комбинации по меньшей мере с одной другой иммуномодулирующей терапией могут вводиться в фармацевтически эффективном количестве для лечения *in vivo* таких заболеваний, как неопластические нарушения, включая солидные опухоли. В этой связи следует понимать, что раскрытые здесь связывающиеся молекулы могут быть приготовлены таким образом, чтобы облегчить введение и способствовать стабильности активного агента. В некоторых вариантах осуществления изобретения фармацевтические композиции настоящего изобретения содержат фармацевтически приемлемый нетоксичный стерильный носитель, такой как физиологический раствор, нетоксичные буферы, консерванты и тому подобное. Для целей настоящего изобретения под фармацевтически эффективным количеством анти-SEMA4D связывающихся молекул, например, антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, варианта или производного, в качестве единственного агента или в комбинации по меньшей мере с одной другой иммуномодулирующей терапией следует понимать количество, достаточное для достижения эффективного связывания с мишенью и достижения благоприятного эффекта, т.е. ингибирования, замедления или уменьшения метастазирования у страдающего раком пациента.

Фармацевтические композиции, применяемые в настоящем изобретении, содержат фармацевтически приемлемые носители, включая, например, ионообменные вещества, оксид алюминия, стеарат алюминия, лецитин, сывороточные белки, такие как сывороточный альбумин человека, буферные вещества, такие как фосфаты, глицин, сорбиновую кислоту, сорбат калия, смеси неполных глицеридов насыщенных растительных жирных кислот, воду, соли или электролиты, такие как протаминсульфат, динатрий-фосфат, гидрофосфат калия, хлорид натрия, соли цинка, коллоидный диоксид кремния, трисиликат магния, поливинилпирролидон, вещества на основе целлюлозы, полиэтиленгликоль, карбоксиметилцеллюлоза натрия, полиакрилаты, воски, полиэтилен-полиоксипропилен-блок-сополимеры, полиэтиленгликоль и ланолин.

Препараты для парентерального введения включают в себя стерильные водные или неводные растворы, суспензии и эмульсии. Примерами неводных растворителей являются пропиленгликоль, полиэтиленгликоль, растительные масла, такие как оливковое масло, и инъеклируемые органические сложные эфиры, такие как этилолеат. Водные носители включают в себя, например, воду, спиртовые/водные растворы, эмульсии или суспензии, включая солевые и буферные среды. Фармацевтически приемлемые носители могут включать в себя без ограничений 0,01-0,1 М или 0,05 М фосфатный буфер или 0,8% раствор хлорида натрия. Другие общепринятые носители для парентерального введения включают в себя растворы фосфата натрия, раствор декстрозы Рингера, раствор декстрозы и хлорида натрия, лактат Рингера или нелетучие масла. Носители для внутривенного введения включают в себя наполнители жидкости и питательных веществ, наполнители электролитов, такие как наполнители на основе раствора декстрозы Рингера, и тому подобное. Также могут присутствовать консерванты и другие добавки, такие как

антимикробные вещества, антиоксиданты, хелатирующие агенты и инертные газы и тому подобное.

В частности, фармацевтические композиции, подходящие для инъекционного применения, включают в себя стерильные водные растворы (в случае водорастворимых компонентов) или дисперсии и стерильные порошки для экстенпорального приготовления стерильных инъекционных растворов или дисперсий. В таких случаях композиция может быть стерильной и должна быть текучей до такой степени, чтобы находиться в форме, которая легко может проходить через иглу шприца. Она должна оставаться стабильной в условиях производства и хранения, и может быть защищена от контаминации микроорганизмами, такими как бактерии и грибы. Носитель может представлять собой растворитель или диспергирующую среду, содержащие, например, воду, этанол, полиол (например, глицерин, пропиленгликоль и жидкий полиэтиленгликоль и тому подобное) и их подходящие смеси. Необходимая текучесть может поддерживаться, например, путем использования покрытия, такого как лецитин, путем поддержания определенного размера частиц в случае дисперсии и путем использования поверхностно-активных веществ. Препараты, подходящие для применения в раскрытых здесь терапевтических способах, описаны в Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Publishing Co.) 16th ed. (1980).

Предотвращение действия микроорганизмов может быть осуществлено при помощи различных антибактериальных и противогрибковых агентов, например, парабенов, хлорбутанола, фенола, аскорбиновой кислоты, тимеросала и тому подобного. В некоторых вариантах осуществления изобретения в состав композиции могут быть включены изотонические агенты, например, сахара, многоатомные спирты, такие как маннит, сорбит, или хлорид натрия. Пролонгированное всасывание инъекционных композиций может быть осуществлено путем включения в композицию агента, который замедляет всасывание, например моностеарата алюминия и желатина.

В любом случае, стерильные инъекционные растворы могут быть получены путем включения активного химического соединения (например, анти-SEMA4D антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, варианта или производного отдельно или в комбинации по меньшей мере с одной другой иммуномодулирующей терапией) в определенном количестве в соответствующий растворитель с одним из или комбинацией перечисленных здесь ингредиентов, с последующей стерилизацией фильтрованием. Как правило, дисперсии получают путем включения активного химического соединения в стерильный носитель, который содержит основную диспергирующую среду и другие ингредиенты из тех, которые перечислены выше. В случае стерильных порошков для приготовления стерильных инъекционных растворов, способы получения могут включать в себя вакуумную сушку или лиофильную сушку, при помощи которых можно получить порошок активного ингредиента и любого необходимого дополнительного ингредиента из их предварительно стерилизованных фильтрованием растворов. Препараты для инъекций обрабатывают, помещают в контейнеры, такие как ампулы, пакеты, бутылки, шприцы или флаконы, и герметично закрывают в асептических условиях при помощи способов, известных из уровня техники. Кроме того, препараты могут быть упакованы и выпущены на рынок в виде набора реагентов. Такие изделия могут иметь маркировку или вкладыш внутри упаковки, содержащие информацию о том, что данные композиции пригодны для лечения субъекта страдающего заболеванием или нарушением, или расположенного к ним.

Парентеральные препараты могут находиться в виде разовой болюсной дозы, инфузии или нагрузочной болюсной дозы, за которой следует поддерживающая доза. Эти композиции могут вводиться через конкретно установленные или переменные промежутки времени, например, один раз в сутки или в режиме "по необходимости".

Некоторые фармацевтические композиции могут вводиться перорально в подходящей для этого лекарственной форме, включающей в себя, например, капсулы, таблетки, водные суспензии или растворы. Некоторые фармацевтические композиции также могут вводиться в виде назального спрея или путем ингаляции. Такие композиции могут быть получены в виде растворов в растворе хлорида натрия с использованием бензилового спирта или других подходящих консервантов, стимуляторов всасывания или усилителей биодоступности и/или других стандартных солубилизирующих или диспергирующих агентов.

Количество анти-SEMA4D связывающейся молекулы, например антитела или его фрагмента, варианта или производного, в качестве единственного агента или в комбинации по меньшей мере с одной другой иммуномодулирующей терапией, для объединения с материалами-носителями для получения единичной лекарственной формы будет меняться в зависимости от получающего лечение пациента и конкретного способа введения. Композиция может вводиться в виде разовой дозы, нескольких доз или в течение установленного периода времени в виде инфузии. Режим дозирования также может регулироваться для обеспечения оптимального желаемого ответа (например, терапевтического или профилактического ответа).

В соответствии с объемом настоящего изобретения анти-SEMA4D антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, варианты или производные в качестве единственного агента или в комбинации по меньшей мере с одной другой иммуномодулирующей терапией, могут вводиться человеку или другому животному в соответствии с вышеуказанными способами лечения в количестве, достаточном для получения терапевтического эффекта. Анти-SEMA4D антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, ва-

рианты или производные в качестве единственного агента или в комбинации по меньшей мере с одной другой иммуномодулирующей терапией, могут вводиться такому человеку или другому животному в стандартной лекарственной форме, полученной путем объединения предложенного здесь антитела со стандартным фармацевтически приемлемым носителем или разбавителем в соответствии с известными методиками. Специалисту в данной области будет понятно, что форма и свойства фармацевтически приемлемого носителя или разбавителя диктуются количеством активного ингредиента, с которым они должны быть объединены, способом введения и другими хорошо известными переменными. Специалистам в данной области техники также будет понятно, что коктейль, содержащий один или несколько описанных здесь видов анти-SEMA4D связывающихся молекул, например, антител или их антигенсвязывающих фрагментов, вариантов или производных, может быть использован.

Термины "терапевтически эффективная доза или количество" или "эффективное количество" предназначены для обозначения количества анти-SEMA4D связывающейся молекулы, например, антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, варианта или производного в качестве единственного агента или в комбинации по меньшей мере с одной другой иммуномодулирующей терапией, которое при введении приводит к положительному терапевтическому ответу при лечении пациента с заболеванием, подлежащим лечению, например, к ингибированию, замедлению или уменьшению метастазирования у этого пациента.

Терапевтически эффективные дозы композиций настоящего изобретения для ингибирования, замедления или уменьшения метастазирования изменяются в зависимости от многих различных факторов, включающих в себя способы введения, целевую область, физиологическое состояние пациента, то, является ли пациент человеком или животным, введение других лекарственных препаратов и то, является ли лечение профилактическим или терапевтическим. В некоторых вариантах осуществления изобретения пациент является человеком, но отличные от человека млекопитающие, включая трансгенных млекопитающих, также могут подвергаться лечению. Для оптимизации безопасности и эффективности лечебные дозы могут титроваться стандартными способами, известными специалистам в данной области техники.

Количество анти-SEMA4D связывающейся молекулы, например, антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, варианта или производного, вводимого в виде единственного агента или в комбинации по меньшей мере с одной другой иммуномодулирующей терапией, легко определить среднему специалисту в данной области техники без проведения дополнительных экспериментов, а только с учетом раскрытия настоящего изобретения. Факторы, влияющие на способ введения и соответствующее количество анти-SEMA4D связывающейся молекулы, например, антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, варианта или производного, вводимого в виде единственного агента или в комбинации по меньшей мере с одной другой иммуномодулирующей терапией, включают в себя без ограничений тяжесть заболевания, историю болезни, возможность метастазирования, и возраст, рост, вес, состояние здоровья и физическое состояние индивида, получающего лечение. Аналогичным образом, количество анти-SEMA4D связывающейся молекулы, например, антитела или его фрагмента, варианта или производного, в качестве единственного агента или в комбинации по меньшей мере с одной другой иммуномодулирующей терапией, которое нужно ввести, будет зависеть от способа введения, а также о того, будет ли субъект получать одну дозу или несколько доз этого агента.

Настоящее изобретение также относится к применению анти-SEMA4D связывающейся молекулы, например, антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, варианта или производного, в качестве единственного агента или в комбинации по меньшей мере с одной другой иммуномодулирующей терапией, в изготовлении лекарственного средства для лечения страдающего раком субъекта, где это лекарственное средство применяется в отношении субъекта, который предварительно получал по меньшей мере одну другую терапию. Термины "предварительно получал" или "премедикация" означают, что субъект получал одну или несколько других терапий (например, получал по меньшей мере одну другую противораковую терапию) до получения лекарственного средства, содержащего анти-SEMA4D связывающуюся молекулу, например, антитело или его антигенсвязывающий фрагмента, вариант или производное, в качестве единственного агента или в комбинации по меньшей мере с одной другой иммуномодулирующей терапией. Термины "предварительно получал" или "премедикация" включают в себя субъектов, которые получали по меньшей мере одну другую терапию в течение 2 лет, в течение 18 месяцев, в течение 1 года, в течение 6 месяцев, в течение 2 месяцев, в течение 6 недель, в течение 1 месяца, в течение 4 недель, в течение 3 недель, в течение 2 недель, в течение 1 недели, в течение 6 дней, в течение 5 дней, в течение 4 дней, в течение 3 дней, в течение 2 дней или даже в течение 1 дня до начала лечения лекарственным средством, содержащим анти-SEMA4D связывающуюся молекулу, например, раскрытое здесь моноклональное антитело VX15/2503 или его антигенсвязывающий фрагмента, вариант или производное, в качестве единственного агента или в комбинации по меньшей мере с одной другой иммуномодулирующей терапией. Не является обязательным, чтобы у субъекта был терапевтический эффект от премедикации предшествующей терапией или терапиями. Таким образом, субъект, который получает лекарственное средство, содержащее анти-SEMA4D связывающуюся молекулу, например, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, вариант или производное, в качестве единственного агента или в комбинации по меньшей мере с одной другой иммуномодулирующей терапией, может получить тера-

пептический эффект или может не получить эффекта (например, рак оказался невосприимчив) от премедикации предшествующей терапией или одной или несколькими предшествующими терапиями, в случае когда премедикация включала в себя несколько терапий. Примеры других противораковых терапий, для которых субъект мог получать премедикацию перед получением лекарственного средства, содержащего анти-SEMA4D связывающуюся молекулу, например, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, вариант или производное, в качестве единственного агента или в комбинации по меньшей мере с одной другой иммуномодулирующей терапией, включают в себя без ограничений хирургическое вмешательство; радиационную терапию; химиотерапию, при необходимости в комбинации с аутотрансплантацией костного мозга, где подходящие химиотерапевтические агенты включают в себя без ограничений те, которые перечислены выше в настоящем изобретении; другие виды терапии противораковыми моноклональными антителами; противораковую терапию на основе малых молекул, включая без ограничений малые молекулы, перечисленные здесь выше; противораковые терапии на основе вакцин/иммунотерапии; стероидную терапию; или любую их комбинацию.

При осуществлении настоящего изобретения, если не указано иное, будут использоваться стандартные методики клеточной биологии, культивирования клеток, молекулярной биологии, трансгенной биологии, микробиологии, рекомбинантных ДНК и иммунологии, которые известны специалистам в данной области техники. Такие методики подробно описаны в литературе. См., например, Sambrook et al., ed. (1989) *Molecular Cloning A Laboratory Manual* (2nd ed.; Cold Spring Harbor Laboratory Press); Sambrook et al., ed. (1992) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, (Cold Springs Harbor Laboratory, NY); D. N. Glover ed., (1985) *DNA Cloning*, Volumes I and II; Gait, ed. (1984) *Oligonucleotide Synthesis*; Mullis et al. Патент США No.4683195; Hames and Higgins, eds. (1984) *Nucleic Acid Hybridization*; Hames and Higgins, eds. (1984) *Transcription And Translation*; Freshney (1987) *Culture Of Animal Cells* (Alan R. Liss, Inc.); *Immobilized Cells And Enzymes* (IRL Press) (1986); Perbal (1984) *A Practical Guide To Molecular Cloning*; the treatise, *Methods In Enzymology* (Academic Press, Inc., N.Y.); Miller and Calos eds. (1987) *Gene Transfer Vectors For Mammalian Cells*, (Cold Spring Harbor Laboratory); Wu et al., eds., *Methods In Enzymology*, Vols. 154 and 155; Mayer and Walker, eds. (1987) *Immunochemical Methods In Cell And Molecular Biology* (Academic Press, London); Weir and Blackwell, eds., (1986) *Handbook Of Experimental Immunology*, Volumes I-IV; *Manipulating the Mouse Embryo*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., (1986); и в Ausubel et al. (1989) *Current Protocols in Molecular Biology* (John Wiley and Sons, Baltimore, Md.).

Общие принципы конструирования антител изложены в Borrebaeck, ed. (1995) *Antibody Engineering* (2nd ed.; Oxford Univ. Press). Общие принципы белковой инженерии изложены в Rickwood et al., eds. (1995) *Protein Engineering, A Practical Approach* (IRL Press at Oxford Univ. Press, Oxford, Eng.). Общие принципы связывания антител и антител с гаптенами изложены в: Nisonoff (1984) *Molecular Immunology* (2nd ed.; Sinauer Associates, Sunderland, Mass.); и Steward (1984) *Antibodies, Their Structure and Function* (Chapman and Hall, New York, N.Y.). Кроме того, стандартные методы в иммунологии, известные из уровня техники и отдельно не описанные, являются в основном такими, как описано в *Current Protocols in Immunology*, John Wiley & Sons, New York; Stites et al., eds. (1994) *Basic and Clinical Immunology* (8th ed; Appleton & Lange, Norwalk, Conn.) and Mishell and Shiigi (eds) (1980) *Selected Methods in Cellular Immunology* (W.H. Freeman and Co., NY).

Стандартные авторитетные работы, в которых изложены общие принципы иммунологии, включают в себя *Current Protocols in Immunology*, John Wiley & Sons, New York; Klein (1982) J., *Immunology: The Science of Self-Nonself Discrimination* (John Wiley & Sons, NY); Kennett et al., eds. (1980) *Monoclonal Antibodies, Hybridoma: A New Dimension in Biological Analyses* (Plenum Press, NY); Campbell (1984) "Monoclonal Antibody Technology" in *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology*, ed. Burden et al., (Elsevier, Amsterdam); Goldsby et al., eds. (2000) *Kuby Immunology* (4th ed.; H. Freeman & Co.); Roitt et al. (2001) *Immunology* (6th ed.; London: Mosby); Abbas et al. (2005) *Cellular and Molecular Immunology* (5th ed.; Elsevier Health Sciences Division); Kontermann and Dubel (2001) *Antibody Engineering* (Springer Verlag); Sambrook and Russell (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Press); Lewin (2003) *Genes VIII* (Prentice Hall 2003); Harlow and Lane (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Press); Dieffenbach and Dveksler (2003) *PCR Primer* (Cold Spring Harbor Press).

Все литературные источники, процитированные выше, а также литературные источники, цитируемые здесь, полностью включены в настоящее изобретение путем ссылки.

Следующие примеры приводятся в качестве иллюстрации, а не в качестве ограничения изобретения.

Примеры

Пример 1. Исследование способности анти-SEMA4D антитела замедлять рост опухоли у иммунокомпетентных мышей.

План эксперимента. Основной план эксперимента был следующим. Опухолевые клетки Colon26 подкожно имплантировали в бок сингенным иммунокомпетентным мышам линии Balb/c (5×10^5 клеток) или иммунодефицитным мышам SCID (1×10^5 клеток) в 0,2 мл раствора хлорида натрия. Лечение контрольным Ig 2B8 или анти-SEMA4D Ab 67 начинали на второй день после имплантации опухоли. Мы-

шам (n=20) дважды в неделю вводили 1,0 мг (приблизительно 50 мг/кг) каждого из моноклональных антител при помощи внутрибрюшинной инъекции. Опухоли измеряли штангенциркулем три раза в неделю, начиная с третьего дня после имплантации. Мышей взвешивали два раза в неделю, начиная с третьего дня. Животных умерщвляли, когда объем опухоли достигал 1000 мм³.

Лечение анти-SEMA4D замедляет рост опухоли у мышей с компетентной иммунной системой. Рост опухоли измеряли штангенциркулем, и результаты измерений использовали для вычисления объема опухоли по формуле $(w^2 \times l)/2$, где w=ширина и l=длина опухоли в мм. Средний объем опухоли (фиг. 1А) и кривые выживаемости Каплана-Мейера (фиг. 1В), определенной как время до конечного состояния, когда объем опухоли =1000 мм³, показаны на фиг. 1А и 1В. Статистический анализ проводили с использованием двухфакторного дисперсионного анализа и анализа с использованием логарифмического рангового критерия, соответственно, которые показали статистически значимый эффект лечения анти-SEMA4D антителом у мышей линии Balb/c.

Замедление роста опухоли на двадцать девять процентов (29%) было достигнуто у мышей линии Balb/c, при этом никакого связанного с лечением замедления роста опухоли не наблюдалось у мышей SCID. Замедление роста опухоли (ЗРО) определяли как увеличение медианного значения времени до конечного состояния (ВКС) в группе, получавшей лечение, по сравнению с контрольной группой; % ЗРО= $[(T-C)/C] \times 100$, где T=медианное значение ВКС для группы, получавшей лечение, C=медианное значение ВКС для контрольной группы. Животные линии Balb/c, получавшие анти-SEMA4D антитело 67, показали статистически значимое уменьшение объема первичной опухоли на момент умерщвления, по сравнению с контрольными животными (P 0,0001). Эти результаты показывают, что анти-SEMA4D антитело эффективно замедляло рост опухоли у мышей с компетентной иммунной системой, но не у иммунодефицитных мышей.

Пример 2. Исследование способности анти-SEMA4D антитела замедлять рост опухоли в присутствии CD8+ эффекторных Т-лимфоцитов.

План эксперимента. Опухолевые клетки Colon26 подкожно имплантировали в бок мышам линии Balb/c (5×10^5 клеток в 0,2 мл раствора хлорида натрия). Анти-CD8 истощающие антитела (клон 2.43, BioXCell) или контрольный крысиный Ig (клон LTF-2, BioXCell) (150 мг/кг) вводили путем внутрибрюшинной инъекции в дни -1, 0, 1, 11 и далее еженедельно. Лечение контрольным Ig 2B8 или анти-SEMA4D Ab 67 начинали на второй день. Мышам (n=20) дважды в неделю вводили 1,0 мг (приблизительно 50 мг/кг) моноклонального антитела путем внутрибрюшинной инъекции. Опухоли измеряли штангенциркулем три раза в неделю, начиная с третьего дня после имплантации. Животных умерщвляли, когда объем опухоли в контрольной группе достигал 1000 мм³, в день 30 для группы, получавшей крысиный Ig, и в день 26 для группы, получавшей анти-CD8 истощающие антитела.

Лечение анти-SEMA4D замедляет рост опухоли в присутствии CD8+ Т-лимфоцитов. Объем опухоли измеряли штангенциркулем с использованием формулы $(w^2 \times l)/2$, где w=ширина, меньшее измерение и l=длина опухоли в мм. Статистические различия в объеме опухоли определяли с использованием двустороннего однофакторного дисперсионного анализа, сравнивая группы, получавшие антитело, с группой, получавшей контрольный Ig 2B8. Средний объем опухоли показан на фиг. 2.

Также определяли ингибирование роста опухоли. Ингибирование роста опухоли (ИРО) определяли по следующей формуле: % ИРО= $1 - [(Tf-Ti)/\text{среднее}(Cf-Ci)]$; % ИРО приведен как среднее значение % ИРО для каждой подвергавшейся лечению опухоли. Статистические различия в объеме опухоли определяли с использованием двустороннего однофакторного дисперсионного анализа с последующим применением критерия множественного сравнения Даннетта, сравнивая группы, получавшие лечение, с группой, получавшей контрольный 2B8. Тридцать процентов (30%) ингибирования роста опухоли было достигнуто после лечения анти-SEMA4D антителом, при этом никакого связанного с лечением эффекта не наблюдалось, когда CD8+ Т-лимфоциты были истощены. Эти результаты показывают, что ингибирование роста опухоли анти-SEMA4D антителом зависело от присутствия CD8+ эффекторных Т-лимфоцитов.

Пример 3: Исследование способности анти-SEMA4D антитела увеличивать плотность опухолеинфильтрирующих лимфоцитов (ОИЛ)

План эксперимента. Опухолевые клетки Colon26 подкожно имплантировали в бок мышам линии Balb/c (5×10^5 клеток в 0,2 мл раствора хлорида натрия). Лечение контрольным Ig 2B8 или анти-SEMA4D Ab 67 начинали на второй день (50 мг/кг внутрибрюшинно, дважды в неделю, n=10). Опухоли измеряли штангенциркулем три раза в неделю, начиная с третьего дня после имплантации. Животных умерщвляли в день 27, когда средний объем опухоли в контрольной группе достигал 1000 мм³. Опухоли, включая окружающие строму и кожу, собирали и фиксировали в формалине в течение 24 часов, а затем переносили в 70%-ный этанол. Затем образцы подготавливали для заливки парафином, и из полученных блоков получали срезы толщиной 5 мкм.

Смежные срезы окрашивали для определения Sema4D, CD8 и CD20, используя следующие методики:

- а. Для обнаружения Sema4D срезы нагревали при температуре 60°C в течение 1 ч, затем депарафи-

нировали и регидратировали при помощи ксилола и последовательного промывания растворами с разной концентрацией этанола. Демаскировку эпителиев осуществляли путем кипячения с буфером для демаскировки (Dako, Carpinteria, CA) в течение 20 мин с последующим охлаждением в течение 30 мин. Срезы дважды промывали ФСБ, содержащим 0,05% Твин-20 (ТФСБ), затем проводили инактивацию эндогенных пероксидаз путем инкубирования в течение 10 минут в двойном блокирующем ферменты реагенте (Dako, Carpinteria, CA). Срезы дважды промывали ТФСБ, и затем блокировали неспецифичное связывание путем инкубации в течение 20 минут с 2,5% раствором нормальной козьей сыворотки в ТФСБ. После однократной промывки ТФСБ срезы инкубировали в течение 60 мин с кроличьими анти-Sema4D с концентрацией 2 мкг/мл в ТФСБ с последующей двукратной промывкой ТФСБ. Затем срезы инкубировали в течение 20 мин с меченым пероксидазой хрена полимером, конъюгированным с козьими антикроличьими антителами, Envision (Dako, Carpinteria, CA) с последующей двукратной промывкой ТФСБ и инкубацией в течение 5 мин с DAB+ (Dako, Carpinteria, CA). Срезы докрашивали гематоксилином Гарриса, обезбечивали, промывали водопроводной водой для придания синей окраски, обезвоживали и безводные препараты помещали в пермаунт.

b. CD8 определяли вышеописанным способом, но с использованием коммерческого кроличьего поликлонального антитела (Abbiotec) с концентрацией 2 мкг/мл.

c. CD20 определяли вышеописанным способом, но с использованием нормальной ослиной сыворотки для блокирования и с использованием козьих анти-CD20 первичных антител (Santa Cruz) с концентрацией 1 мкг/мл с последующей инкубацией с мечеными пероксидазой хрена антикозьими антителами (Golden Bridge).

d. Изображения срезов получали при 20-кратном увеличении при помощи камеры Retiga QICAM-12 bit, совмещенной с микроскопом Olympus 1×50.

Лечение анти-SEMA4D увеличивает частоту опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов (ОИЛ). Плотность иммунных клеток определяли путем сканирования срезов всей опухоли, количественного анализа областей CD8+ или CD20+ опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов (ОИЛ) и затем нормализации по общей площади опухоли. Срезы от 9 (контрольный Ig) или 10 (анти-SEMA4D Ab 67) мышей на группу использовали для анализа. Статистическую значимость для CD8 и CD20 рассчитывали, используя двусторонний критерий Стьюдента для одной выборки при 95% ДИ.

Лечение опухолей Colon26 анти-SEMA4D антителом 67 привело к увеличению как плотности CD8+ Т-лимфоцитов, так и плотности CD20+ Т-лимфоцитов по сравнению с контрольной группой. Увеличение плотности CD20+ Т-лимфоцитов было статистически значимым до 95% со значением P 0,0388. Увеличение плотности CD8+ Т-лимфоцитов также имело место, но оно не было статистически значимым. Эти результаты показывают, что лечение анти-SEMA4D опухолей Colon26 приводило к увеличению частоты опухоль-инфильтрирующих иммунных клеток. Эти результаты представлены графически на фиг. 3А и 3В.

Пример 4. Исследование способности анти-SEMA4D антитела влиять на миграцию и распределение макрофагов типа M1 и типа M2 и CD8+ Т-лимфоцитов в передней кромке опухоли.

Лечение анти-SEMA4D изменяет распределение макрофагов и CD8+ Т-лимфоцитов в передней кромке опухоли. Распределение макрофагов определяли путем сканирования срезов всей опухоли, количественного анализа области M1 (окрашивание Alexa647-конъюгированными крысинными анти-F4/80 (Biolegend, клон BM8) с концентрацией 2 мкг/мл) и M2 (окрашивание биотин-конъюгированными крысинными анти-CD206 (Biolegend, клон C068C2) с концентрацией 2 мкг/мл) и затем нормализации по общей площади опухоли для определения плотности M1 и M2 в опухоли. Срезы от 9 (контрольный Ig) или 10 (анти-SEMA4D Ab 67) мышей, получавших лечение, на группу использовали для анализа. Для определения плотности клеток в растущем крае опухоли выделяли область шириной в 300 пикселей (250 микрон) от края опухоли. Статистическую значимость для M1 и M2 рассчитывали, используя однофакторный дисперсионный анализ с критерием Краскела-Уоллиса и критерием Данна для ретроспективного анализа при 95% ДИ. Изменение плотности макрофагов типа M1, нормализованное для передней кромки опухоли, оказалось значимым.

Количество CD8+ Т-лимфоцитов определяли в срезах всей опухоли, окрашенных анти-CD8 антителом (Abbiotec Cat#250596 при 1:250), с системой детекции DAB. Количество CD8+ сигналов в срезах всей опухоли подсчитывали после достижения порогового значения для положительного сигнала, используя программное обеспечение Imagepro. Плотность CD8+ Т-лимфоцитов для каждого животного вычисляли путем деления количества CD8+ сигналов на площадь всей опухоли в пикселях. Отдельные значения плотности CD8+ Т-лимфоцитов усредняли, для того чтобы получить значение распределения CD8+ Т-лимфоцитов у животных, получавших 2B8 и Ab67, (n=10). Статистическую значимость рассчитывали, используя однофакторный дисперсионный анализ с критерием Краскела-Уоллиса и критерием Данна для ретроспективного анализа при 95% ДИ.

Распределение SEMA4D определяли путем сканирования срезов всей опухоли, окрашенных для определения SEMA4D антителом, специфичным к эпителию, отличному от того, который распознает Ab 67, и анализа распределения Sema4D. Срезы от 9 (контрольный Ig) или 10 (анти-SEMA4D Ab 67) мышей, получавших лечение, на группу использовали для анализа.

Опухолевые клетки Colon26 экспрессировали SEMA4D на низком уровне при культивировании *in vitro*, но активация экспрессии SEMA4D происходила *in vivo* в передней кромке опухоли. Это приводило к возникновению градиента экспрессии SEMA4D с высокой концентрацией на периферии опухоли. Лечение анти-SEMA4D антителом нейтрализовало SEMA4D и нарушало этот градиент экспрессии. Это приводило к радикальному изменению в миграции и распределении макрофагов, как показано на фиг. 4А. В частности, опухоли, испытывавшие воздействие анти-SEMA4D Ab 67, имели более высокие уровни M1+ провоспалительных макрофагов в передней кромке опухоли, как показано на фиг. 4В. Увеличение количества M1+ макрофагов было статистически значимым. Опухоли, испытывавшие воздействие анти-SEMA4D Ab 67, также продемонстрировали уменьшение частоты M2+ проопухолевых макрофагов в передней кромке опухоли, как показано на фиг. 4С. Эти результаты показали, что лечение анти-SEMA4D Ab 67 изменяет распределение макрофагов, таким образом, что происходит увеличение плотности ингибирующих опухоль макрофагов, т.е. макрофагов типа M1, в передней кромке опухоли, при уменьшении присутствия стимулирующих опухоль макрофагов, т.е. макрофагов типа M2, в той же области. Кроме того, эти результаты показали увеличение плотности CD8+ Т-лимфоцитов в опухолях, полученных из мышей, получавших Mab 67, как показано на фиг. 4D. Эти данные позволяют предположить, что нейтрализация SEMA4D антителами Mab 67-2 облегчает проникновение противоопухолевых макрофагов типа M1 в зону интенсивно пролиферирующих опухолевых клеток и CD8+ Т-лимфоцитов распространение по всей этой зоне и распространение в переднюю кромку (вставка).

Пример 5. Исследование способности анти-SEMA4D антитела замедлять рост опухоли у мышей при использовании в комбинации с анти-CTLA4 антителами.

План эксперимента. 5×10^5 опухолевых клеток Colon26 подкожно имплантировали в бок самкам мышей линии Balb/c. Лечение контрольным мышиним IgG1/2B8 или анти-SEMA4D/MAb 67-2 начинали в первый день после инокуляции (50 мг/кг внутривенно, еженедельно $\times 5$) с или без анти-CTLA4/Mab UC10-4F10-1 (100 мкг в день 8 и 50 мкг в дни 11 и 14 после инокуляции опухоли). Лечение анти-PD1/RMP1-14 начинали в первый день после инокуляции (100 мкг в день 3, дважды в неделю) в комбинации с анти-CTLA4/Mab UC10-4F 10-11. В группе было 20 мышей. Опухоли измеряли штангенциркулем два раза в неделю, начиная с пятого дня после имплантации. Животных умерщвляли в день 27, когда объем опухоли достигал 1000 мм^3 .

Комбинация анти-SEMA4D и анти-CTLA4 антител замедляет рост опухоли у мышей. Рост опухоли измеряли штангенциркулем, и результаты измерений использовали для вычисления объема опухоли по формуле $(w^2 \times l)/2$, где w —ширина, меньшее измерение и l —длина опухоли в мм. Средний объем опухоли и кривые выживаемости Каплана-Мейера, определенной как время до конечного состояния, когда объем опухоли= 1000 мм^3 , показаны на фиг. 5А и 5В, соответственно. Статистический анализ проводили с использованием двухфакторного дисперсионного анализа и анализа с использованием логарифмического рангового критерия, соответственно, которые показали статистически значимый эффект лечения анти-SEMA4D антителом (9% замедление роста опухоли, ЗРО**) и анти-CTLA4 антителом (2% ЗРО, незначимо) и высоко значимое увеличение замедления роста опухоли комбинацией анти-SEMA4D и анти-CTLA4 антител (максимальное ЗРО, 114%****). Этот ответ сохранялся в течение по меньшей мере 60 дней.

Также определяли частоту регрессии опухоли в опухолевой модели Colon26. Регрессия представляется собой отсутствие пальпируемой опухоли, что соответствует размеру опухоли $<50 \text{ мм}^3$, определенному в результате по меньшей мере двух последовательных измерений. Как показано на фиг. 5С, комбинация анти-SEMA4D и анти-CTLA4 антител увеличивает количество регрессий в опухолевой модели Colon26. Регрессии для комбинированной терапии (анти-SEMA4D + анти-CTLA4 антитела) являются статистически значимыми по сравнению с контрольным Ig (p 0,0001) и по сравнению с монотерапией анти-CTLA4 или анти-SEMA4D антителами (p 0,0022), как определено с использованием точного критерия Фишера. Важно, что эти результаты показывают, что комбинация анти-SEMA4D и анти-CTLA4 антител действовала синергически, то есть комбинация была значительно более эффективна, что выражалось в увеличенной чистоте длительных регрессий опухоли, по сравнению с лечением только анти-SEMA4D антителом или только анти-CTLA4 антителом. Кроме того, эти результаты показывают, что комбинация анти-SEMA4D и анти-CTLA4 антител является, по меньшей мере, такой же эффективной или более эффективной, чем комбинация анти-PD1 и анти-CTLA4 антител.

Кроме того, было показано, что анти-SEMA4D антитела повышают активность опухоль-реактивных ЦТЛ, а также усиливают активность анти-CTLA4-опосредованных ЦТЛ. Проспективное исследование проводили, чтобы изучить влияние монотерапии анти-CTLA4 антителами на частоту опухоль-специфичных опухоль-инфильтрирующих лейкоцитов (ОИЛ) в сравнении с комбинированной терапией анти-CTLA4 и анти-SEMA4D антителами. В этом проспективном исследовании иммунные клетки выделяли из опухолей и селезенок имеющих опухоль Colon26 мышей, получавших *in vivo* контрольный IgG1/2B8, анти-CTLA4/MabUC10-4F10 или комбинацию анти-CTLA4/MabUC10-4F10 и анти-SEMA4D/Mab67. Ткани получали на 15-й день, через 1 день после последней дозы анти-CTLA4 антитела и непосредственно перед регрессией опухоли. Общее количество CD4 5+ ОИЛ оценивали по уровням

секретируемых цитокинов, и частоту секретирующих ИФН γ CD8 $^+$ Т-лимфоцитов в присутствии рестриктированного ГКГС класса I опухоль-специфичного (Colon26) иммунодоминантного пептида gp70 определяли при помощи ELISPOT анализа. Частоту специфичных в отношении ГКГС класса I иммунореактивных клеток определяли путем вычитания значений, полученных с контрольной средой, из значений, полученных в содержащих пептид лунках.

Как показано на фиг. 5D, повышенные уровни провоспалительных цитокинов ИФН γ наблюдались в опухолях мышей, получавших в качестве монотерапии анти-CTLA4 антитела ($p=0,0135$), эти уровни были дополнительно стимулированы и значительно увеличены последующим проведением комбинированной терапии анти-CTLA4 и анти-SEMA4D антителами ($p=0,0002$, по сравнению с контролем или монотерапией). На фиг. 5E повышенная частота секретирующих пептид-специфичный ИФН γ иммунореактивных клеток наблюдалась в селезенках мышей, получавших анти-CTLA4 антитела. Эти результаты оказались ожидаемыми, так как ранее сообщалось о том, что анти-CTLA4 антитела индуцируют активацию Т-лимфоцитов на периферии. Не было обнаружено, что комбинированная терапия анти-CTLA4 и анти-SEMA4D антителами способствует повышению активности в селезенке. Напротив, существенное увеличение частоты секретирующих пептид-специфичный ИФН γ иммунореактивных клеток наблюдалась среди ОИЛ после проведения монотерапии анти-CTLA4 антителами, которая затем была значительно повышена последующим проведением комбинированной терапии анти-CTLA4 и анти-SEMA4D антителами. Эти результаты свидетельствуют о том, что добавление терапии анти-SEMA4D антителами может значительно повысить активность опухоль-специфичных CD8 $^+$ Т-лимфоцитов локализованным опухоль-специфичным образом.

Пример 6. Исследование способности анти-SEMA4D антитела оказывать влияние на инфильтрацию опухоли опухоль-специфичными CD8 $^+$ Т-лимфоцитами.

Лечение Mab 67-2 увеличивает частоту опухоль-специфичных ОИЛ и секрецию провоспалительных цитокинов. После четырех недель лечения анти-SEMA4D антителами *in vivo* опухоли разделяли и обогащали CD45 $^+$ лимфоцитами при помощи магнитного разделения. Объединенный образец CD45 $^+$ ОИЛ, полученный от 5 мышей, инкубировали в присутствии или в отсутствии иммунодоминантного опухолевого пептида AN-1 при различных плотностях клеток. Секретирующие ИФН γ клетки определяли при помощи ELISPOT; пептидспецифичный ответ определяли путем вычитания среднего значения, полученного для лунок без пептида. Каждый образец был проверен в 6 повторностях и показан на диаграммах выше. Статистическую значимость определяли при помощи непараметрического критерия Манна-Уитни.

Увеличение количества секретирующих ИФН γ клеток наблюдали у мышей, получавших Mab 67, как в присутствии, так и в отсутствии пептида, как показано на фиг. 6A. CD45 $^+$ ОИЛ, особенно CD8 $^+$ цитотоксические Т-лимфоциты, специфичные в отношении рестриктированного ГКГС класса I пептида, представляют собой активированные эффекторные клетки после лечения Mab 67-2. На фиг. 6B приведены репрезентативные изображения результатов ELISPOT анализа. Затем CD45 $^+$ ОИЛ культивировали *ex vivo* в течение 48 ч и секрецию цитокинов оценивали при помощи СВА анализа. Как показано на фиг. 6C, Mab 67-2 стимулирует секрецию противоопухолевых цитокинов, таких как ИФН γ и ФНО α , в ОИЛ. Статистическую значимость определяли при помощи непараметрического критерия Манна-Уитни.

Проспективное исследование проводили, чтобы изучить влияние лечения Mab 67-2 на частоту опухоль-специфичных опухоль-инфильтрирующих лейкоцитов (ОИЛ) и секрецию провоспалительных цитокинов. В этом проспективном исследовании иммунные клетки выделяли из опухолей имеющих опухоль Colon26 мышей, получавших *in vivo* контрольный IgG1/Mab2B8 или анти-SEMA4D/Mab67. Общее количество CD45 $^+$ ОИЛ оценивали по уровням секретируемых цитокинов, и частоту секретирующих ИФН γ CD8 $^+$ Т-лимфоцитов в присутствии рестриктированного ГКГС класса I опухоль-специфичного (Colon26) иммунодоминантного пептида gp70 определяли при помощи ELISPOT анализа. Частоту специфичных в отношении ГКГС класса I иммунореактивных клеток определяли путем вычитания значений, полученных с контрольной средой, из значений, полученных в содержащих пептид лунках.

Как показано на фиг. 6D, повышенные уровни провоспалительных цитокинов ИФН γ и ФНО α наблюдались в ОИЛ мышей, получавших анти-SEMA4D антитела. Кроме того, как показано на фиг. 6E повышенная частота секретирующих пептид-специфичный ИФН γ иммунореактивных клеток наблюдалась в ОИЛ мышей, получавших анти-SEMA4D антитела. Эти результаты свидетельствуют о том, что добавление терапии анти-SEMA4D антителами может значительно повысить активность опухоль-специфичных CD8 $^+$ Т-лимфоцитов локализованным опухоль-специфичным образом.

Пример 7. Исследование способности анти-SEMA4D антитела замедлять рост опухоли у мышей при использовании в комбинации с анти-PD1 антителами.

План эксперимента. 5×10^5 опухолевых клеток Colon26 подкожно имплантировали в бок самкам мышей линии Balb/c. Лечение контрольным мышинным IgG1/2B8 или анти-SEMA4D/Mab 67-2 начинали в первый день после инокуляции (50 мг/кг внутривенно, еженедельно). Каждая группа мышей также получала или контрольный крысиный Ig или крысиный анти-PD1/MabRMP1-14 (100 мкг в неделю \times 2 недели, начиная с третьего день после инокуляции). В группе было 20 мышей. Опухоли измеряли штангенциркулем три раза в неделю, начиная с пятого дня после имплантации. Животных умерщвляли,

когда объем опухоли достигал 1000 мм³.

Комбинация анти-SEMA4D и анти-PD1 антител замедляет рост опухоли у мышей. Рост опухоли измеряли штангенциркулем, и результаты измерений использовали для вычисления объема опухоли по формуле $(w^2 \times l)/2$, где w = ширина, меньшее измерение и l = длина опухоли в мм. Средний объем опухоли и кривые выживаемости Каплана-Мейера, определенной как время до конечного состояния, когда объем опухоли = 1000 мм³, показаны на фиг. 7A и 7B, соответственно. Статистический анализ проводили с использованием двухфакторного дисперсионного анализа и анализа с использованием логарифмического рангового критерия, соответственно, которые показали статистически значимый эффект лечения анти-SEMA4D антителом в комбинации с анти-PD1 антителом у мышей линии Balb/c. Эти результаты показали, что комбинация анти-SEMA4D и анти-PD1 антител оказалась более эффективной, чем лечение только анти-SEMA4D антителом или только анти-PD1 антителом.

Также определяли частоту регрессий в опухолевой модели Colon26, и результаты показаны на фиг. 7C и 7D. Регрессия представляет собой отсутствие пальпируемой опухоли, что соответствует размеру опухоли <50 мм³, определенному в результате по меньшей мере двух последовательных измерений. Комбинация анти-SEMA4D и анти-PD1 антител увеличивает количество регрессий в опухолевой модели Colon26. Регрессии для комбинированной терапии (анти-SEMA4D + анти-PD1 антитела) являются статистически значимыми по сравнению с контрольным Ig (p 0,0083) и по сравнению с анти-PD1 антителом в качестве единственного агента (p 0,02), как определено с использованием точного критерия Фишера.

Пример 8. Исследование способности анти-SEMA4D антитела замедлять рост опухоли у мышей при использовании в комбинации с циклофосфамидом.

План эксперимента. 5×10^5 опухолевых клеток Colon26 подкожно имплантировали в бок самкам мышей линии Balb/c. Лечение контрольным мышинным IgG1/2B8 или анти-SEMA4D/MAb 67-2 начинали в первый день после инокуляции (50 мг/кг внутривенно, еженедельно). Циклофосфамид вводили внутривенно по 50 мг/кг в дни 12 и 20. В группе было 20 мышей. Опухоли измеряли штангенциркулем три раза в неделю, начиная с пятого дня после имплантации. Животных умерщвляли, когда объем опухоли достигал 1000 мм³.

Комбинация анти-SEMA4D антитела и циклофосфамида замедляет рост опухоли у мышей. Рост опухоли измеряли штангенциркулем, и результаты измерений использовали для вычисления объема опухоли по формуле $(w^2 \times l)/2$, где w = ширина, меньшее измерение и l = длина опухоли в мм. Средний объем опухоли, медианный объем опухоли и кривые выживаемости Каплана-Мейера, определенной как время до конечного состояния, когда объем опухоли = 1000 мм³, показаны на фиг. 8A, 8B и 8C, соответственно. Статистический анализ проводили с использованием двухфакторного дисперсионного анализа и анализа с использованием логарифмического рангового критерия, соответственно, которые показали статистически значимый эффект лечения анти-SEMA4D антителом в комбинации с циклофосфамидом у мышей линии Balb/c.

В частности, результаты показывают, что при использовании анти-SEMA4D антитела в комбинации с циклофосфамидом происходит замедление роста опухоли (ЗРО) на 232%. Этот результат оказался статистически значимым по сравнению с контрольным Ig (p 0,0001), как определено при помощи анализа с использованием логарифмического рангового критерия Кокса-Мантеля. Также имело место 3% ЗРО при использовании в лечении только анти-SEMA4D антитела (статистически значимое по сравнению с контрольным Ig (p = 0,0282)), и 96% ЗРО при использовании в лечении только циклофосфамида (статистически значимое по сравнению с контрольным Ig (p < 0,0001)), как определено при помощи анализа с использованием логарифмического рангового критерия Кокса-Мантеля. Этот ответ сохранялся в течение по меньшей мере 81 дня. Эти результаты показывают, что комбинация анти-SEMA4D антител и циклофосфамида более эффективно замедляет рост опухоли, чем лечение только анти-SEMA4D антителом или только циклофосфамидом.

Также определяли частоту регрессии в опухолевой модели Colon26, и результаты показаны на фиг. 8D и 8E. Регрессия представляет собой отсутствие пальпируемой опухоли, что соответствует размеру опухоли <50 мм³, определенному, в результате по меньшей мере двух последовательных измерений. Комбинация анти-SEMA4D антитела и циклофосфамида увеличивает количество регрессий в опухолевой модели Colon26. Регрессии для комбинированной терапии (анти-SEMA4D антитела + циклофосфамид) являются статистически значимыми по сравнению с контрольным Ig (p 0,003), как определено с использованием точного критерия Фишера. Эти данные демонстрируют повышенную эффективность и ответ на лечение циклофосфамидом в комбинации с анти-SEMA4D антителом.

Пример 9. Исследование способности анти-SEMA4D антитела замедлять рост опухоли у мышей при использовании в комбинации с анти-HER2/neu антителами.

План эксперимента. 3×10^4 опухолевых клеток Tubo.A5 подкожно имплантировали в жировую ткань молочной железы самок мышей линии Balb/c. Лечение контрольным мышинным IgG1/2B8.1E7 или анти-SEMA4D/MAb 67-2 начинали на седьмой день после инокуляции (50 мг/кг внутривенно, еженедельно $\times 6$). Лечение анти-Neu/MAb7.1 6.4 (200 мкг, внутривенно, еженедельно $\times 2$) начинали, когда объем опухоли достигал приблизительно 200 мм³, в дни 21 и 28. В группе было 15 мышей. Опухоли из-

меряли штангенциркулем два раза в неделю, начиная с 11-го дня после имплантации. Животных умерщвляли, когда объем опухоли достигал 800 мм³.

Комбинация анти-SEMA4D и анти-HER2/neu антител замедляет рост опухоли у мышей. Рост опухоли измеряли штангенциркулем, и результаты измерений использовали для вычисления объема опухоли по формуле $(w^2 \times l)/2$, где w —ширина, меньшее измерение и l —длина опухоли в мм. Средний объем опухоли и кривые выживаемости Каплана-Мейера, определенной как время до конечного состояния, когда объем опухоли=800 мм³, показаны на фиг. 9А и 8В, соответственно. Статистический анализ проводили с использованием двухфакторного дисперсионного анализа и анализа с использованием логарифмического рангового критерия, соответственно, которые показали статистически значимый эффект лечения анти-SEMA4D антителом в комбинации с анти-HER2/neu антителом у мышей линии Balb/c. Эти результаты показывают, что при использовании анти-SEMA4D антитела в комбинации с анти-Neu антителом происходит замедление роста опухоли на 48%, и этот результат является статистически значимым по сравнению с использованием нерелевантного контрольного антитела ($p=0,017$) или монотерапией анти-Neu антителом ($p=0,006$), как определено при помощи анализа с использованием логарифмического рангового критерия Кокса-Мантеля.

Также определяют частоту регрессий в опухолевой модели Tubo, и результаты показаны на фиг. 9С. Регрессия предстает собой отсутствие пальпируемой опухоли, что соответствует размеру опухоли <50 мм³, определенному в результате по меньшей мере двух последовательных измерений. Комбинация анти-SEMA4D и анти-Neu антител увеличивает количество регрессий у мышей, имеющих опухоли Tubo. Регрессии для комбинированной терапии (анти-SEMA4D + анти-Neu антитела) являются статистически значимыми по сравнению с контрольным Ig ($p=0,016$), как определено с использованием точного критерия Фишера.

Пример 10. Исследование способности анти-SEMA4D антитела замедлять рост опухоли *in vivo* в модели карциномы молочной железы.

План эксперимента. 3×10^4 опухолевых клеток Tubo.A5 подкожно имплантировали в жировую ткань молочной железы самок мышей линии Balb/c. Лечение контрольным мышинным IgG1/2B8.1E7 или анти-SEMA4D/Mab 67-2 начинали на шестой день после инокуляции (50 мг/кг внутривенно, еженедельно $\times 6$). В группе было 20 мышей, однако, некоторые мыши были исключены из анализа по причине преждевременной смерти до достижения конечного состояния в результате образования язв или плохого состояния здоровья в целом. Опухоли измеряли штангенциркулем два раза в неделю, начиная с 13-го дня после имплантации. Животных умерщвляли, когда объем опухоли достигал 800 мм³.

Лечение анти-SEMA4D антителами замедляет рост опухоли у мышей. Рост опухоли измеряли штангенциркулем, и результаты измерений использовали для вычисления объема опухоли по формуле $(w^2 \times l)/2$, где w —ширина, меньшее измерение и l —длина опухоли в мм. Средний объем опухоли и кривые выживаемости Каплана-Мейера, определенной как время до конечного состояния, когда объем опухоли=800 мм³, показаны на фиг. 10А и 10В, соответственно. Статистический анализ проводили с использованием двухфакторного дисперсионного анализа и анализа с использованием логарифмического рангового критерия, соответственно, которые показали статистически значимый эффект лечения анти-SEMA4D антителом. Эти результаты показывают максимальное замедление роста опухоли (133%) при лечении анти-SEMA4D антителом. Этот результат является статистически значимым по сравнению с использованием нерелевантного контрольного антитела ($p<0,0001$), как определено при помощи анализа с использованием логарифмического рангового критерия Кокса-Мантеля.

Также определяют частоту регрессий в опухолевой модели Tubo.A5, и результаты показаны на фиг. 10С-10Е. Регрессия предстает собой отсутствие пальпируемой опухоли, что соответствует размеру опухоли <50 мм³, определенному в результате по меньшей мере двух последовательных измерений. Через 90 дней после имплантации 85% (12/14) получавших Mab67 мышей излечились от опухолей, и одна из 14 никогда не имела измеримой опухоли, по сравнению с 0/14 регрессий у мышей, получавших контрольный Ig. В день 90 тех мышей, которые полностью излечились от своих первичных опухолей (13/14 получавших Mab67 мышей) заразили жизнеспособными клетками Tubo.A5 (30000), вводя их в противоположный бок; ранее незараженные мыши были включены в эксперимент в качестве контроля для трансплантата. Как показано на фиг. 10D, все 13 мышей, которые получали анти-SEMA4D антитело, отторгали вводимые потом опухолевые клетки, что свидетельствует об ответе, связанном с иммунологической памятью, в отличие от этого, ранее незараженные мыши не отторгали вводимые опухолевые клетки, как показано на фиг. 10Е. Частота регрессии является статистически значимой по сравнению с контрольным Ig ($p<0,0001$), как определено с использованием точного критерия Фишера.

Пример 11. Влияние анти-SEMA4D антитела на инфильтрацию Т-лимфоцитов и МСК в опухолевой модели Tubo.A5.

План эксперимента. Опухолевые клетки Tubo.A5 имплантировали сингенным мышам линии Balb/c. Лечение контрольным мышинным Ig или анти-SEMA4D Mab 67 начинали на шестой день после инокуляции (50 мг/кг внутривенно, еженедельно). Опухоли извлекали на 39-й день непосредственно перед регрессией опухоли. FACS анализу подвергали объединенные фракции клеток из опухолей от 14-21

мышей на группу, полученные с использованием лимфоцита. Показаны средние значения повторов анализа; значимость определяли при помощи двустороннего критерия Стьюдента.

Как показано на фиг. 11A и 11B, терапия анти-SEMA4D антителами увеличивает инфильтрацию CD3+ Т-лимфоцитов и уменьшает содержание CD11b+Gr1+ МСК в опухолях мышей, получавших анти-SEMA4D антитела. Эти данные свидетельствуют о повышении противоопухолевого Т-клеточного ответа и об уменьшении количества иммуносупрессорных клеток, таких как МСК. Эти данные согласуются с изменением иммунного баланса, наблюдаемым в модели Colon26.

Пример 12. Титрование дозы Mab67 в опухолевых моделях Tubo.A5 и Colon26.

План эксперимента для опухолевой модели Tubo.A5. 3×10^4 опухолевых клеток Tubo.A5 подкожно имплантировали в жировую ткань молочной железы самок мышей линии Balb/c. Лечение контрольным мышинным IgG1/2B8.1E7 (50 мг/кг внутривнутрибрюшинно, еженедельно $\times 6$) или анти-SEMA4D/Mab 67-2 (1, 10 или 50 мг/кг внутривнутрибрюшинно, еженедельно $\times 6$) начинали на шестой день после инокуляции. В группе было по меньшей мере 20 мышей, однако, некоторые мыши были исключены из анализа по причине преждевременной смерти до достижения конечного состояния в результате образования язв или плохого состояния здоровья в целом. Опухоли измеряли штангенциркулем два раза в неделю, начиная с 13-го дня после имплантации. Животных умерщвляли, когда объем опухоли достигал 800 мм^3 .

План эксперимента для опухолевой модели Colon26. 5×10^5 опухолевых клеток Colon26 подкожно имплантировали в бок самкам мышей линии Balb/c. Лечение контрольным мышинным IgG1/2B8.1E7 (50 мг/кг внутривнутрибрюшинно, еженедельно $\times 5$) или анти-SEMA4D/Mab 67-2 (0,3, 3, 10 или 50 мг/кг внутривнутрибрюшинно, еженедельно $\times 5$) начинали в первый день после инокуляции с или без анти-CTLA4/Mab UC10-4F10-1 1 (100 мкг \sim 5 мг/кг в день 8 и 50 мкг \sim 2,5 мг/кг в дни 11 и 14 после инокуляции опухоли). В группе было 15 мышей. Опухоли измеряли штангенциркулем два раза в неделю, начиная с пятого дня после имплантации. Животных умерщвляли, когда объем опухоли достигал $\geq 1000 \text{ мм}^3$.

Минимальная эффективная доза составляет приблизительно 3 мг/кг. Лечение опухоли Tubo.A5 50 или 10 мг/кг Mab67 приводило к замедлению роста опухоли, которое было статистически значимым по сравнению с контрольным IgG ($p < 0,0001$ и $p = 0,0015$, соответственно), но незначимо различалось между собой. Частоты регрессии опухоли Tubo.A5, равные 38% (9/24) и 54% (6/13), полученные при введении 50 или 10 мг/кг Mab67, также были статистически значимыми ($p = 0,0069$ и $p = 0,0014$). В отличие от этого, доза 1 мг/кг Mab67 оказалась неэффективной и незначимо замедляла рост опухоли ($p = 0,01441$). В этой модели минимальная эффективная доза была определена в пределах от 1 до 10 мг/кг. Рост опухоли измеряли штангенциркулем, и результаты измерений использовали для вычисления объема опухоли по формуле $(w^2 \times l) / 2$, где w = ширина, меньшее измерение и l = длина опухоли в мм. Средний объем опухоли и кривые выживаемости Каплана-Мейера, определенной как время до конечного состояния, когда объем опухоли = 800 мм^3 , показаны на фиг. 12A и 12B, соответственно. Статистический анализ проводили с использованием двухфакторного дисперсионного анализа и анализа с использованием логарифмического рангового критерия, соответственно.

Дальнейшее уточнение эффективной дозы Mab67 проводили с использованием модели Colon26, и установили, что она составляет ≥ 3 мг/кг. Лечение опухолей Colon26 анти-CTLA4 + анти-SEMA4D антителами приводило к максимальному замедлению роста опухоли (119%), по сравнению с монотерапией анти-CTLA4 антителами, когда дозы анти-SEMA4D/Mab 67 составляли ≥ 3 мг/кг; при 10 мг/кг Mab67, $p = 0,0101$ и при 3 мг/кг, $p = 0,0571$, по сравнению с монотерапией анти-CTLA4 антителами как было определено при помощи анализа с использованием логарифмического рангового критерия Кокса-Мантеля. Все дозы от 3 до 50 мг/кг незначимо различались между собой. В то же время, когда анти-CTLA4 антитела вводили в комбинации с 0,3 мг/кг Mab67, различие статистически отличалось от лечения 10 мг/кг Mab67 ($p = 0,0325$), но было статистически незначимо по сравнению с монотерапией анти-CTLA4 антителами ($p = 0,4945$). Рост опухоли измеряли штангенциркулем, и результаты измерений использовали для вычисления объема опухоли по формуле $(w^2 \times l) / 2$, где w = ширина, меньшее измерение и l = длина опухоли в мм. Средний объем опухоли и кривые выживаемости Каплана-Мейера, определенной как время до конечного состояния, когда объем опухоли = 1000 мм^3 , показаны на фиг. 12C и 12D, соответственно. Статистический анализ проводили с использованием двухфакторного дисперсионного анализа и анализа с использованием логарифмического рангового критерия, соответственно.

Пример 13. Влияние анти-SEMA4D антитела на замедление роста опухоли в опухолевых моделях Colon26 и Tubo.A5.

План эксперимента. На фиг. 13 приведены обобщенные результаты экспериментов, проведенных в изложенных выше.

Примерах, показывающие регрессию и рост опухоли после повторного заражения опухолью в опухолевых моделях Colon26 и Tubo.A5. План эксперимента соответствующих экспериментов описан в приведенных выше примерах.

Терапия анти-SEMA4D антителами приводит к полной и длительной регрессии опухоли. Как показано на фиг. 13, терапия анти-SEMA4D антителами приводит к статистически значимому увеличению регрессии опухоли по сравнению с лечением контрольным мышинным IgG1 в обеих моделях Colon26 и

Tubo.A5, 7% ($P \leq 0,001^{***}$) и 85% ($P \leq 0,0001^{****}$), соответственно. Кроме того, лечение анти-SEMA4D антителами незначительно отличается от лечения только анти-PD1 антителами (7% для только анти-SEMA4D антител против 8% для только анти-PD1 антител, незначимо), но существенно увеличивается при использовании в комбинации с терапией анти-PD1 антителами (28% для комбинированной терапии по сравнению с 7% для анти-SEMA4D или 8% для анти-PD1 монотерапии, $P \leq 0,0001^{****}$). Кроме того, лечение анти-SEMA4D антителами в комбинации с терапией анти-CTLA4 антителами приводит к статистически значимому увеличению регрессии опухоли по сравнению с лечением только анти-CTLA4 антителами (74% для комбинированной терапии по сравнению с 20% для анти-CTLA4 монотерапии, $P \leq 0,0001^{****}$). Также лечение анти-SEMA4D антителами в комбинации с терапией анти-CTLA4 антителами приводит к статистически значимому увеличению регрессии опухоли по сравнению с лечением анти-SEMA4D антителами в комбинации с анти-PD1 антителами (74% для анти-SEMA4D/анти-CTLA4 комбинированной терапии по сравнению с 60% для анти-SEMA4D/анти-PD1 комбинированной терапии, $P \leq 0,001^{***}$). Более выраженное взаимно усиливающее действие в случае анти-SEMA4D антител в комбинации с анти-CTLA4 антителами, по сравнению с анти-SEMA4D антителами в комбинации с анти-PD1 антителами, указывает на то, что не все ингибиторы блокады иммунных контрольных точек являются эквивалентными в этом отношении, и что различия в механизмах их действия могут быть связаны с различным благоприятным терапевтическим эффектом. Наконец, лечение анти-SEMA4D антителами в комбинации с циклофосфамидом приводит к статистически значимому увеличению регрессии опухоли по сравнению с лечением только циклофосфамидом (40% для комбинированной терапии по сравнению с 10% для монотерапии циклофосфамидом, $P \leq 0,01^{**}$).

Многие модификации и другие варианты осуществления изложенных здесь вариантов осуществления настоящего изобретения, обладающие свойствами идеи настоящего изобретения, раскрытой в предшествующем описании и прилагаемых чертежах, станут очевидны специалисту в той области техники, к которой относится настоящее изобретение. Поэтому, следует понимать, что настоящее изобретение не должно быть ограничено конкретными описанными здесь вариантами осуществления, и предполагается что другие модификации и другие варианты осуществления включены в объем прилагаемой формулы изобретения и список раскрытых здесь вариантов осуществления изобретения. Хотя в настоящем изобретении используются конкретные термины, они используются только в общем и описательном смысле, а не с целью ограничения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ ингибирования, замедления или уменьшения роста раковой опухоли у субъекта, включающий введение субъекту эффективного количества выделенного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которое специфично к семафору-4D (SEMA4D), и эффективного количества по меньшей мере одного другого иммуномодулирующего агента, выбранного из адоптивных Т-лимфоцитов, ингибитора блокады иммунных контрольных точек и модулятора регуляторных Т-лимфоцитов (Трег).
2. Способ по п.1, где ингибитор блокады иммунных контрольных точек представляет собой антитело к белку 4, ассоциированному с цитотоксическими Т-лимфоцитами (анти-CTLA4), антитело к белку 1 запрограммированной клеточной смерти (анти-PD-1), антитело к лиганду белка 1 запрограммированной клеточной смерти (анти-PD-L1), антитело к лимфоцит-активирующему гену 3 (LAG3), анти-B7-H3 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент.
3. Способ по п.1, где модулятор Трег представляет собой циклофосфамид.
4. Способ по п.1, где адоптивные Т-лимфоциты представляют собой опухоль-инфильтрирующие лимфоциты (ОИЛ), выделенные из удаленной у субъекта опухоли.
5. Способ по п.4, где ОИЛ получены размножением *in vitro*.
6. Способ по п.5, где размножение *in vitro* включает инкубирование выделенных ОИЛ с аллореактивными питающими клетками, интерлейкином-2 (IL-2) и анти-CD3 антителом.
7. Способ по п.1, где адоптивные Т-лимфоциты представляют собой Т-клетки, трансфицированные гибридным рецептором антигена.
8. Способ по п.7, где гибридный рецептор антигена является реактивным в отношении целевого опухолевого антигена.
9. Способ по любому из пп.1-8, где анти-SEMA4D антитело и другой иммуномодулирующий агент вводят раздельно.
10. Способ по любому из пп.1-8, где анти-SEMA4D антитело и другой иммуномодулирующий агент вводят одновременно.
11. Способ по любому из пп.1-11, где субъект имеет повышенный уровень В-лимфоцитов и/или Т-лимфоцитов по сравнению с другими субъектами с раковой опухолью.
12. Способ по п.11, где уровень В-лимфоцитов и/или Т-лимфоцитов на микролитр крови субъекта приблизительно от 1,5 приблизительно до 5 раз выше, чем среднее количество В-лимфоцитов и/или Т-лимфоцитов в кровотоке других субъектов с раковой опухолью.

13. Способ по п.11, где уровень В-лимфоцитов и/или Т-лимфоцитов находится в диапазоне значений здоровых субъектов или превышает его.

14. Способ по любому из пп.1-13, где анти-SEMA4D антитело или его фрагмент ингибирует взаимодействие SEMA4D со своим рецептором.

15. Способ по п.14, где рецептор представляет собой плексин В1.

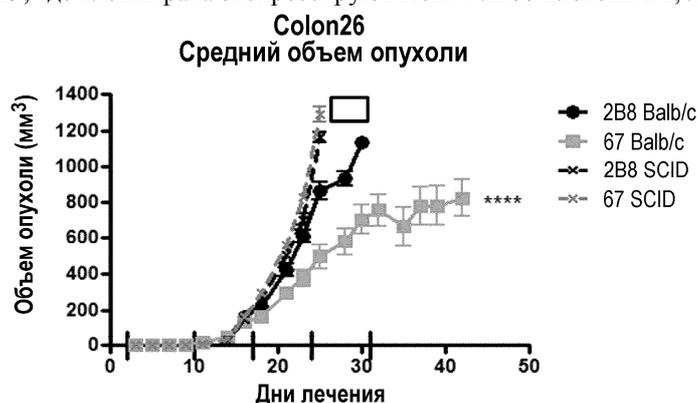
16. Способ по п.14, где анти-SEMA4D антитело или его фрагмент ингибирует опосредованную SEMA4D передачу сигнала через плексин В1.

17. Способ по любому из пп.1-16, где анти-SEMA4D антитело или его фрагмент включает переменную тяжелую цепь (VH), содержащую VHCDRs 1-3, включающие SEQ ID NO: 6, 7 и 8, соответственно, и переменную легкую цепь (VL), содержащую VLCDRs 1-3, включающие SEQ ID NO: 14, 15 и 16, соответственно.

18. Способ по п.17, где VH и VL содержат, соответственно, SEQ ID NO: 9 и SEQ ID NO: 17 или SEQ ID NO: 10 и SEQ ID NO: 18.

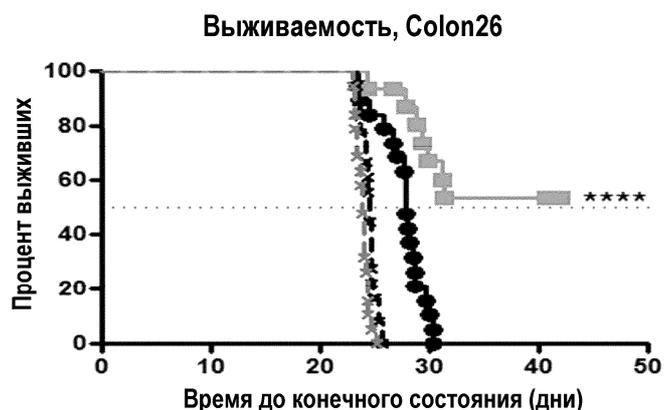
19. Способ по любому из пп.1-18, где рак выбран из карциномы, лимфомы, бластомы, саркомы, лейкоза, плоскоклеточного рака, мелкоклеточного рака легкого, немелкоклеточного рака легкого, аденокарциномы легкого, плоскоклеточной карциномы легкого, рака брюшной полости, гепатоцеллюлярного рака, рака желудочно-кишечного тракта, рака желудка, рака поджелудочной железы, нейроэндокринного рака, глиобластомы, рака шейки матки, рака яичников, рака печени, рака мочевого пузыря, рака головного мозга, гепатомы, рака молочной железы, рака толстой кишки, колоректального рака, эндометриальной или маточной карциномы, рака пищевода, карциномы слюнных желез, рака почки, рака печени, рака предстательной железы, рака вульвы, рака щитовидной железы, рака головы и шеи и их комбинации.

20. Способ по п.19, где клетки рака экспрессируют Her2 и либо плексин В1, либо плексин В2.



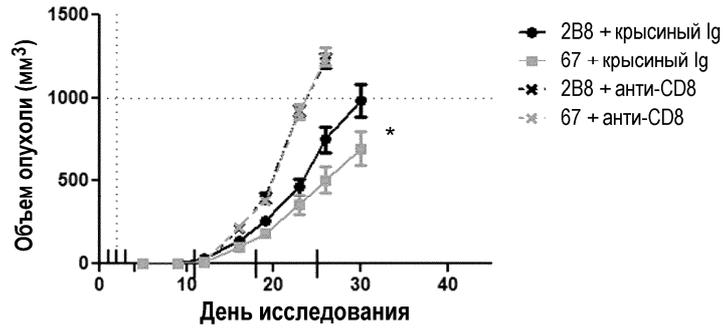
*лечебный эффект является значимым, по сравнению с изотипическим контрольным Ig, на основе двухфакторного дисперсионного анализа ANOVA

Фиг. 1А



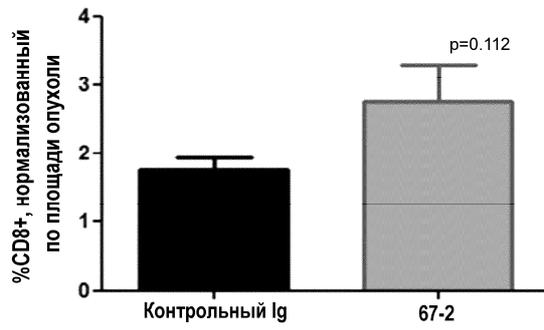
Фиг. 1В

**Colon26 -- Balb/c
CD8 истощение**



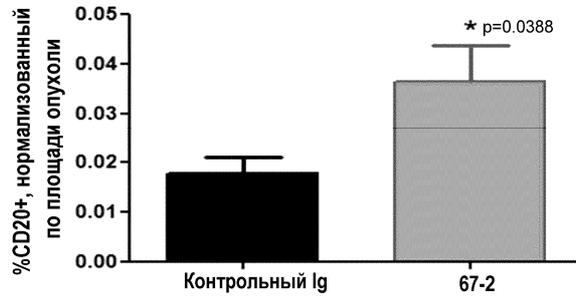
Фиг. 2

Плотность CD8+ Т-лимфоцитов

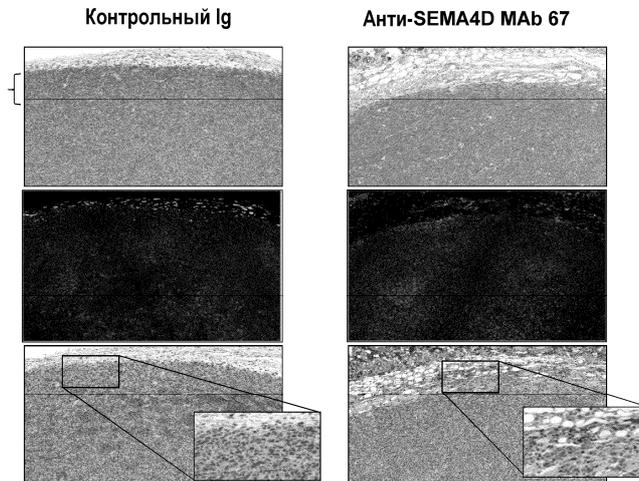


Фиг. 3А

Плотность CD20+ Т-лимфоцитов

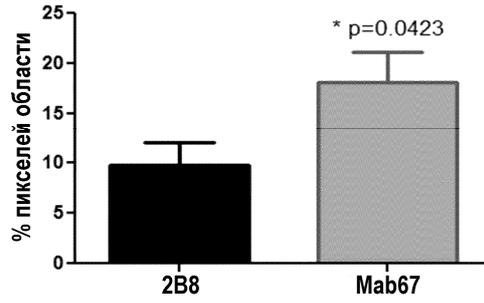


Фиг. 3В



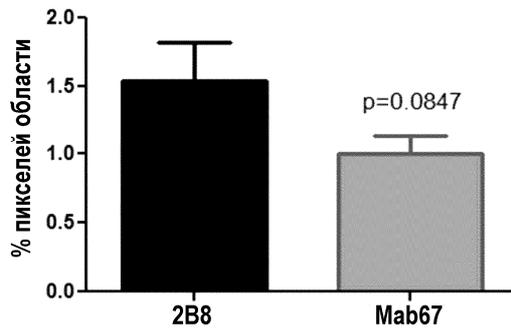
Фиг. 4А

Противоопухолевые M1



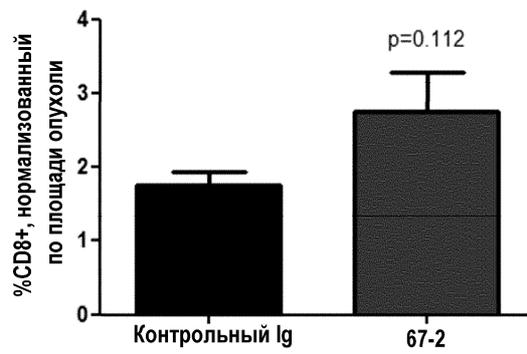
Фиг. 4B

Проопухолевые M2



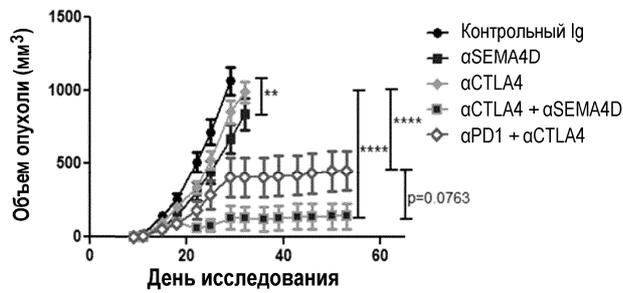
Фиг. 4C

Плотность CD8+ Т-лимфоцитов



Фиг. 4D

Опухоль Colon26, комбинация с αCTLA4
Средний объем опухоли



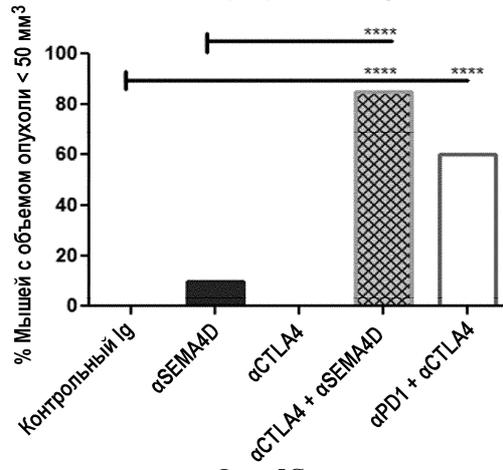
Фиг. 5A

**Опухоль Colon26, комбинация с αCTLA4
Выживаемость**



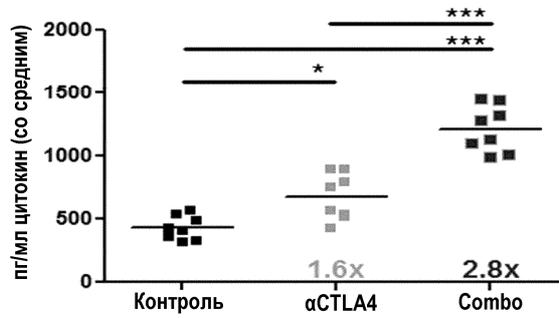
Фиг. 5B

% Полной регрессии опухоли



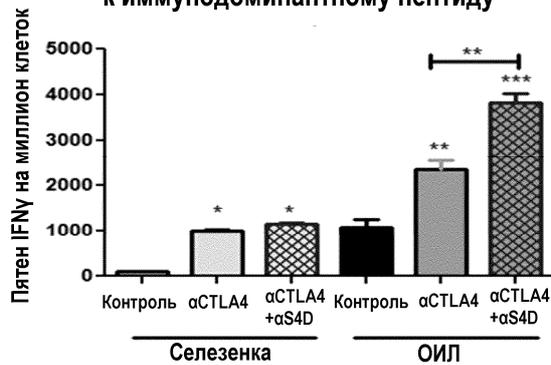
Фиг. 5C

ИФНγ ОИЛ



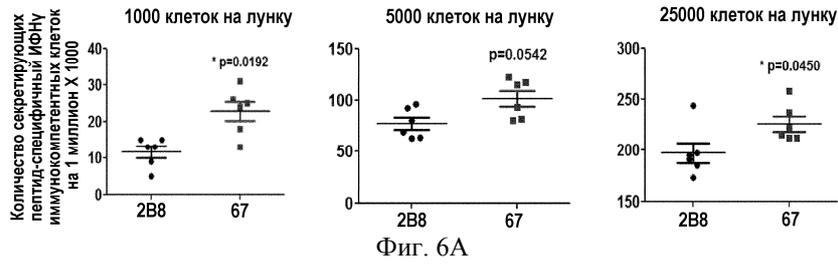
Фиг. 5D

**Образование ЦТЛ, специфичных
к иммунодоминантному пептиду**

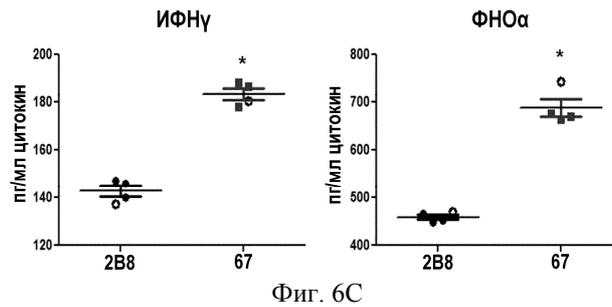
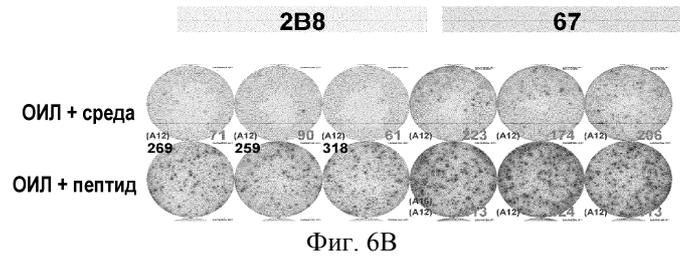


Фиг. 5E

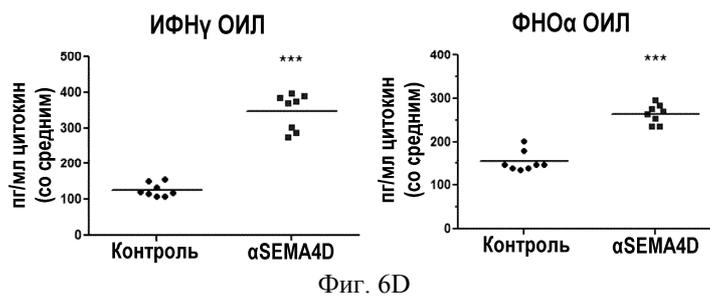
Частота ОИЛ, секретирующих ИФН γ , специфичный в отношении опухолевого пептида, рестриктированного ГКГС класса I



Частота ОИЛ, секретирующих ИФН γ , специфичный в отношении опухолевого пептида, рестриктированного ГКГС класса I

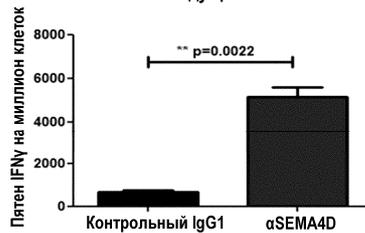


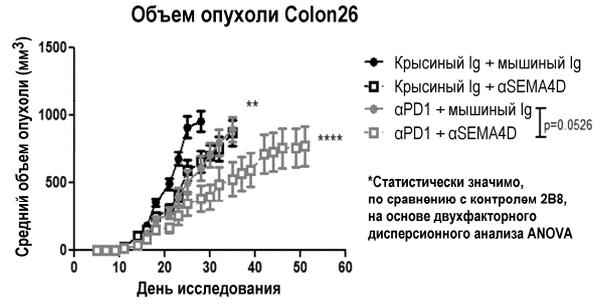
Секретирующие цитокин CD45+ ОИЛ



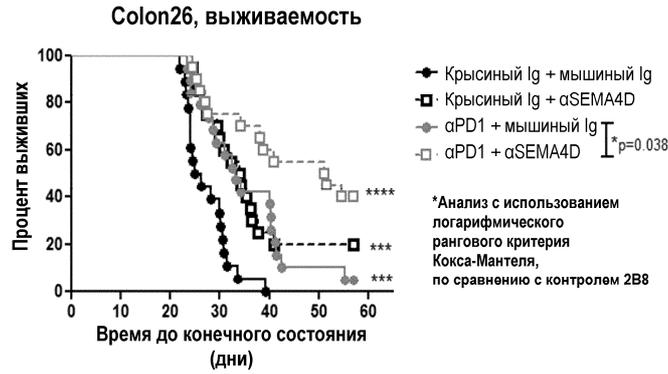
Частота опухольспецифичных ЦТЛ

Образование специфичных к иммунодоминантному пептиду ЦТЛ в ОИЛ

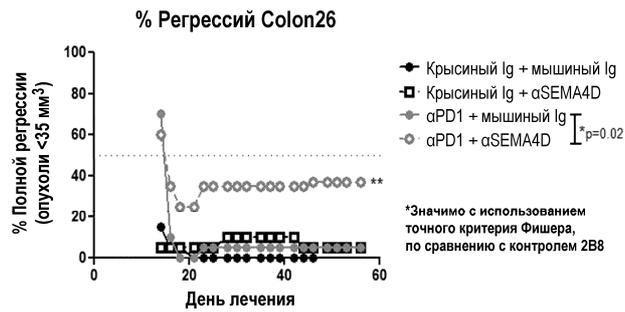




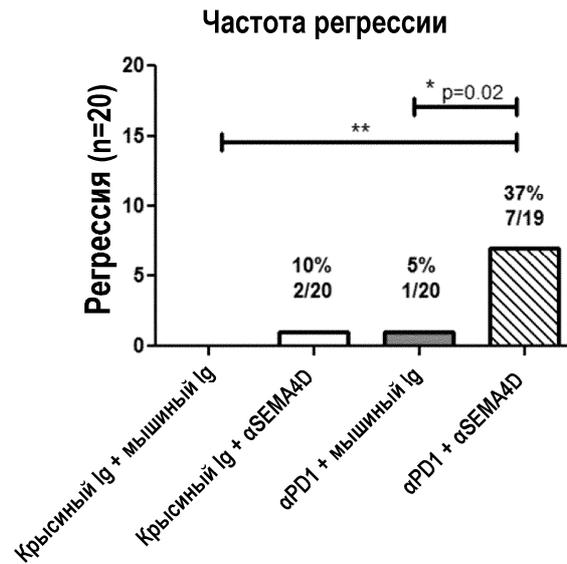
Фиг. 7А



Фиг. 7В

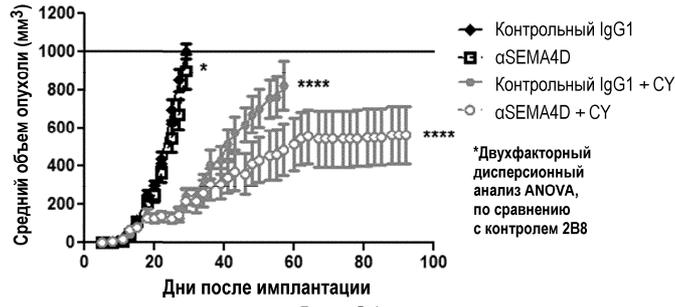


Фиг. 7С



Фиг. 7D

Объем опухоли Colon26



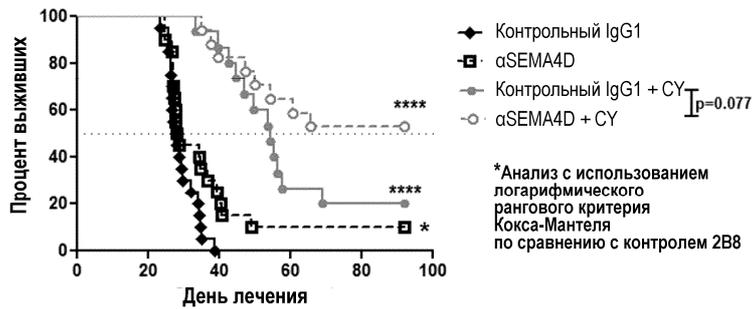
Фиг. 8А

Объем опухоли Colon26



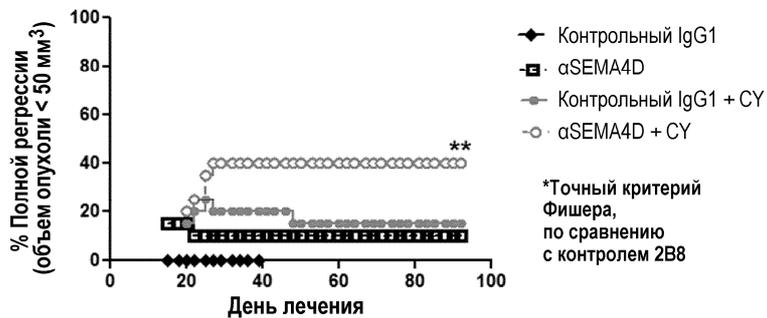
Фиг. 8В

Colon26, выживаемость

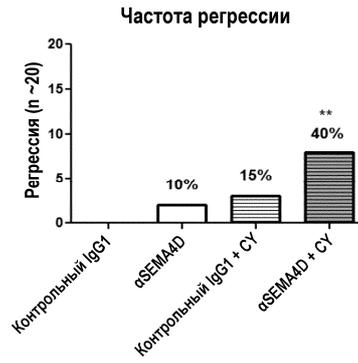


Фиг. 8С

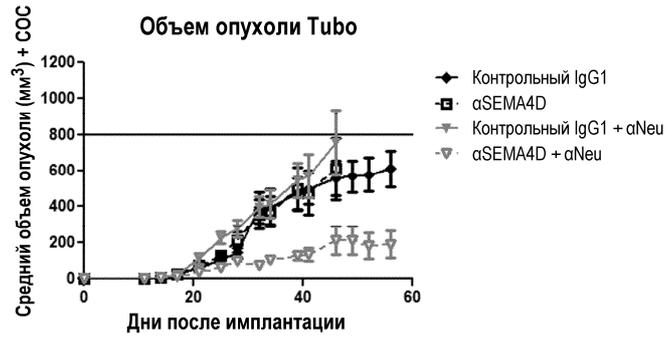
Полная регрессия



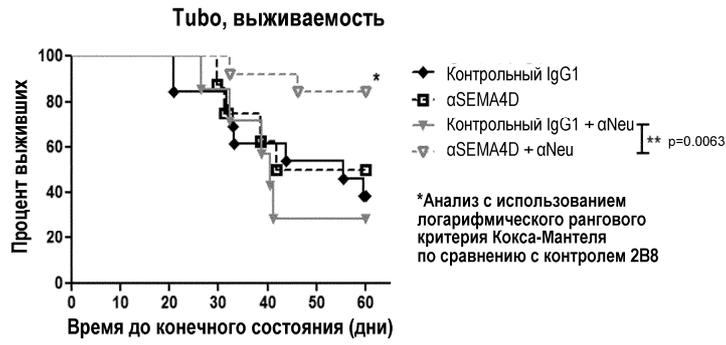
Фиг. 8D



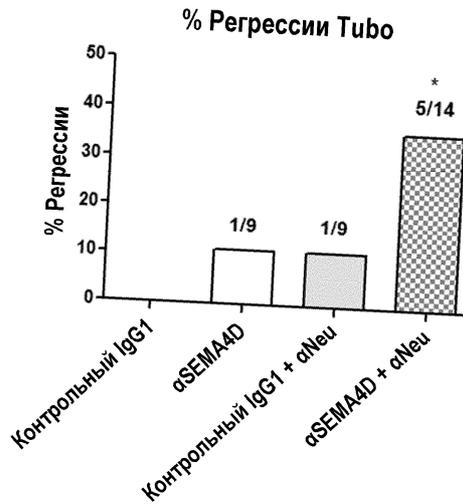
Фиг. 8Е



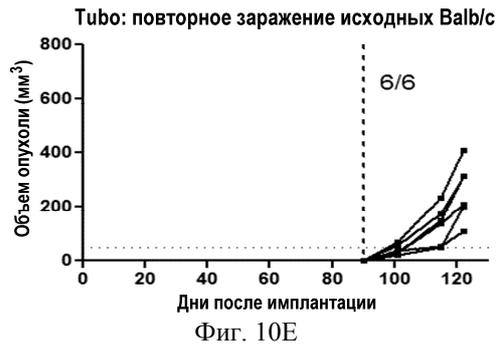
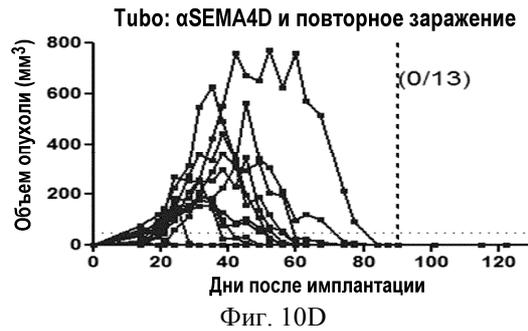
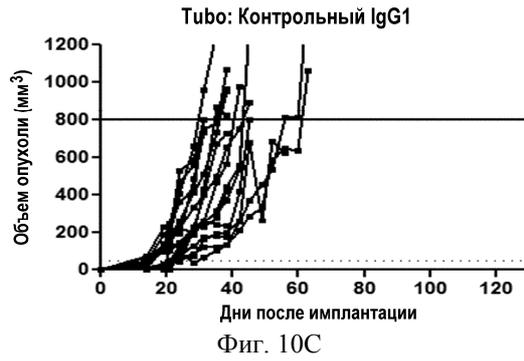
Фиг. 9А

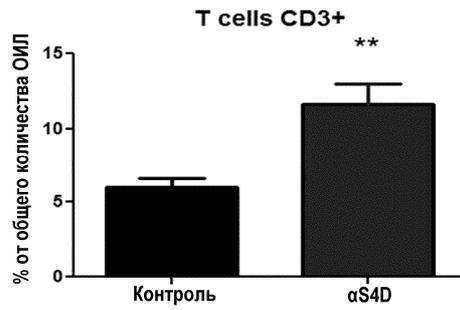


Фиг. 9В

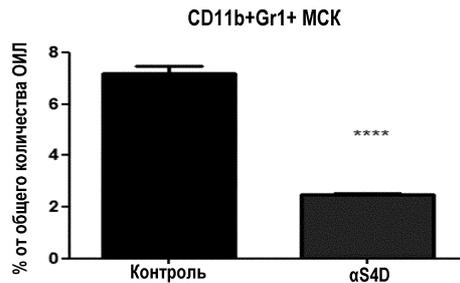


Фиг. 9С

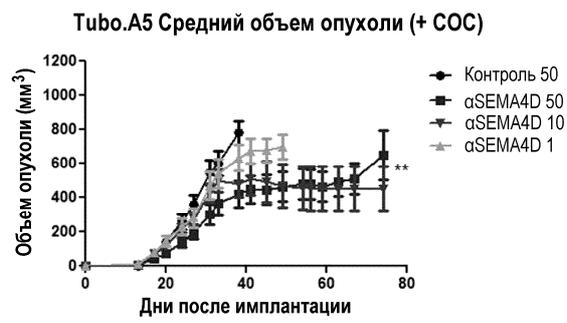




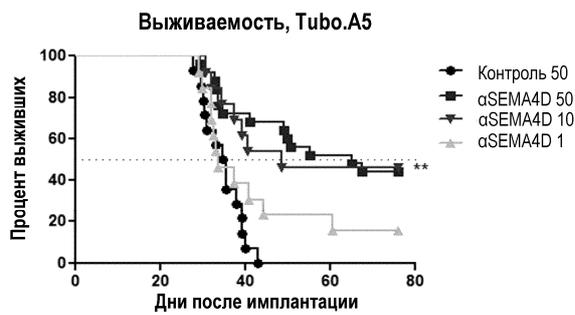
Фиг. 11А



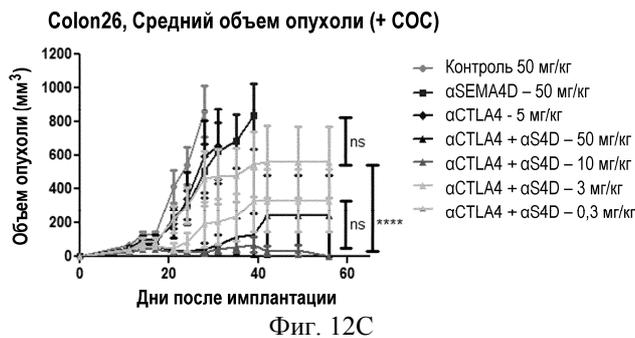
Фиг. 11В



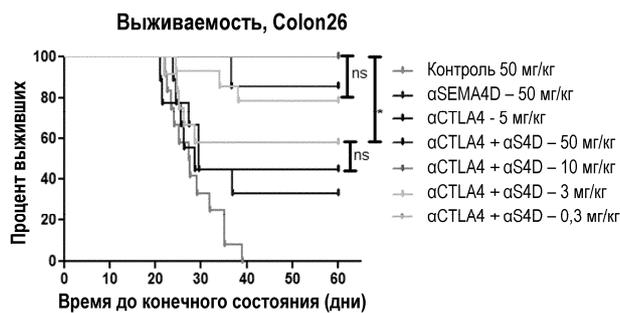
Фиг. 12А



Фиг. 12В



Фиг. 12С



Модель	Лечение	% Полной регрессии опухоли				Рост после повторного заражения опухолью
		%	#мыши	#исследования	Статистическая значимость*	
Colon26	Контроль	1%	(3/266)	18	--	Нет данных
	α SEMA4D	7%	(21/289)	18	***	0/2
	α PD1	8%	(3/40)	2	p=0.065	Нет данных
	α PD1 + α SEMA4D	28%	(11/40)	2	****	Нет данных
	α CTLA4	20%	(14/69)	4	***	1/8
	α CTLA4 + α SEMA4D	74%	(43/58)	3	****	0/21
	α CTLA4 + α PD1	60%	(12/20)	1	****	Нет данных
	Циклофосфамид	10%	(3/30)	2	не значимо	0/3
Циклофосфамид + α SEMA4D	40%	(8/20)	1	**	0/8	
Карцинома молочной железы Tubo	Контроль	0	(0/27)	2	--	Нет данных
	α SEMA4D	85%	(23/27)	2	****	0/13
	α CTLA4	23%	(3/13)	1	*	Нет данных
	α PD1	0	(0/10)	1	не значимо	Нет данных
	α CTLA4 + α PD1	14%	(2/14)	1	*	Нет данных

* Статистическая значимость, точный критерий Фишера. Программа Prism рассматривает результаты как недостоверные (не значимо) при $P > 0.05$, значимые при $0.01 < P \leq 0.05$, обозначено как (*), очень значимые (**) при $0.001 < P \leq 0.01$ и в высшей степени значимые (****) при $P \leq 0.001$.

Фиг. 13

