

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 782 834**

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)
C07K 16/28	(2006.01)
A61K 39/395	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.06.2014 PCT/US2014/043466**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **31.12.2014 WO14209802**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.06.2014 E 14818498 (9)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.01.2020 EP 3013350**

54 Título: **Uso de moléculas inhibidoras de semaforina-4D en combinación con una terapia inmunomoduladora para inhibir el crecimiento tumoral y la metástasis**

30 Prioridad:

25.06.2013 US 201361839170 P
05.09.2013 US 201361874241 P
30.09.2013 US 201361884771 P
22.11.2013 US 201361907845 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
16.09.2020

73 Titular/es:

VACCINEX, INC. (100.0%)
1895 Mt. Hope Avenue
Rochester, NY 14620, US

72 Inventor/es:

EVANS, ELIZABETH E.;
SMITH, ERNEST S. y
ZAUDERER, MAURICE

74 Agente/Representante:

GONZÁLEZ PECES, Gustavo Adolfo

ES 2 782 834 T3

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

DESCRIPCIÓN

Uso de moléculas inhibitoras de semaforina-4D en combinación con una terapia inmunomoduladora para inhibir el crecimiento tumoral y la metástasis

Antecedentes

5 La semaforina-4D (SEMA4D), también conocida como CD100, es una proteína transmembrana (p. ej., SEQ ID NO: 1 (humana); SEQ ID NO: 2 (murina)) que pertenece a la familia del gen de la semaforina. SEMA4D se expresa sobre la superficie celular como un homodímero, pero tras la activación celular, SEMA4D puede ser liberada de la superficie celular mediante escisión proteolítica para generar SEMA4Ds, una forma soluble de la proteína, que también es biológicamente activa. Véase Suzuki y col., Nature Rev. Immunol. 3:159-167 (2003); Kikutani y col., Nature Immunol. 9:17-23 (2008).

SEMA4D se expresa a altos niveles en órganos linfoides, que incluyen el bazo, timo y ganglios linfáticos, y en órganos no linfoides, tales como el cerebro, corazón y riñón. En órganos linfoides, SEMA4D se expresa abundantemente en linfocitos T en reposo, pero solo se expresa débilmente en linfocitos B en reposo y células presentadoras de antígenos (CPA), tales como células dendríticas (CD). Su expresión, sin embargo, está regulada positivamente en estas células tras la activación por diversos estímulos inmunológicos. La liberación de SEMA4D soluble de células inmunitarias también aumenta por la activación celular. SEMA4D ha estado implicado en el desarrollo de determinados cánceres (Ch'ng y col., Cancer 110:164-72 (2007); Campos y col., Oncology Letters, 5:1527-35 (2013); Kato y col., Cancer Sci. 102:2029-37 (2011)) y varios informes sugieren que un mecanismo de esta influencia es el papel de SEMA4D en la promoción de la angiogénesis tumoral (Conrotto et al., Blood 105:4321-4329 (2005), Basile et al., J Biol. Chem. 282: 34888-34895 (2007); Sierra y col. J. Exp. Med. 205:1673 (2008); Zhou y col., Angiogenesis 15: 391-407 (2012)). El crecimiento tumoral y la metástasis implican un complejo proceso de comunicación cruzada entre las células tumorales, el estroma y el infiltrado inmunitario, así como las células endoteliales y la vasculatura. SEMA4D se sobreexpresa en una amplia gama de tipos tumorales y también se produce por las células inflamatorias reclutadas para el microambiente tumoral, la cuestión de qué papel puede desempeñar SEMA4D en la migración, supervivencia, diferenciación y organización de los diferentes tipos celulares que constituyen el estroma tumoral queda por abordar.

Breve resumen

La presente solicitud aborda la necesidad de tratamientos de cáncer seguros y eficaces que sirven como un único agente que inhibe, reduce, suprime, previene, ralentiza o retrasa la progresión de, disminuye, o ataca directamente a las células tumorales, o que puede actuar en combinación con otras terapias inmunomoduladoras para potenciar su beneficio terapéutico. En particular, se ha demostrado que SEMA4D desempeña un papel en la infiltración, maduración y organización de células inmunitarias y macrófagos que o promueven o inhiben el crecimiento tumoral, que puede contribuir al desarrollo de procedimientos eficaces para reducir el crecimiento tumoral y la metástasis en un sujeto con cáncer.

La presente invención se refiere a un anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno del mismo que se une específicamente a semaforina-4D (SEMA4D) para su uso en la inhibición, el retraso o la reducción del crecimiento de tumor sólido en un sujeto con cáncer, en combinación con al menos otra terapia inmunomoduladora, en la que el anticuerpo anti-SEMA4D o el fragmento del mismo comprende

(a) una VH que comprende las VHCDR 1-3 que comprenden las SEQ ID NO: 6, 7 y 8, respectivamente, y una VL que comprende las VLCDR 1-3 que comprenden las SEQ ID NO: 14, 15 y 16, respectivamente; o
 40 (b) una VH y una VL que comprenden, respectivamente, la SEQ ID NO: 9 y la SEQ ID NO: 17, o la SEQ ID NO: 10 y la SEQ ID NO: 18;

en las que la al menos otra terapia inmunomoduladora comprende

i) un inhibidor de bloqueo de punto de control inmunitario que puede bloquear una interacción receptor-ligando que inicia un punto de control inmunitario, en el que el inhibidor de bloqueo de punto de control inmunitario comprende un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo que se une al receptor o al ligando; o
 45 ii) un modulador de Treg que comprende ciclofosfamida;

y en el que la combinación con la al menos otra terapia inmunomoduladora da como resultado una eficacia terapéutica mejorada en relación con el anticuerpo o el fragmento del mismo o la terapia inmunomoduladora sola.

En una realización, el inhibidor del bloqueo del punto de control inmunitario comprende un anticuerpo anti-proteína 4 asociada al linfocito T citotóxico (CTLA4), un anticuerpo anti-muerte celular programada 1 (PD-1), un anticuerpo anti-ligando 1 de muerte celular programada (PD-L1), un anticuerpo anti-gen 3 de activación de linfocitos (LAG3), un anticuerpo anti-B7-H3 y un fragmento de unión a antígeno de los mismos o una combinación de los mismos.

En una realización, el anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno del mismo y la al menos una terapia inmunomoduladora se administran por separado o de manera concurrente.

En una realización, el anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno y la al menos una terapia inmunomoduladora se administran a otros sujetos de cáncer con tumores sólidos.

En una realización

- 5 (a) el nivel de linfocitos B y/o de linfocitos T por microlitro de sangre en el sujeto es de aproximadamente 1,5 a aproximadamente 5 veces el número medio de linfocitos B y/o de linfocitos T en circulación en otros pacientes de cáncer con tumores sólidos; y/o
 (b) el sujeto tiene niveles de linfocitos B y/o de linfocitos T que están dentro o por encima del intervalo de linfocitos B y/o de linfocitos T de individuos sanos.

10 En una realización, el anticuerpo anti-SEMA4D o fragmento del mismo inhibe la interacción de SEMA4D con su receptor, en el que el receptor es plexina-B1, plexina-B2 o CD72.

En una realización, el anticuerpo anti-SEMA4D o el fragmento del mismo inhibe la transducción de la señal de plexina-B1 mediada por SEMA4D.

15 En una realización, el tumor sólido es carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma, cáncer de células escamosas, cáncer pulmonar microcítico, cáncer pulmonar no microcítico, adenocarcinoma del pulmón, carcinoma escamoso del pulmón, cáncer del peritoneo, cáncer hepatocelular, cáncer gastrointestinal, cáncer gástrico, cáncer de páncreas, cáncer neuroendocrino, glioblastoma, cáncer de cuello uterino, cáncer de ovario, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, cáncer de cerebro, hepatoma, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer colorrectal, carcinoma endometrial o uterino, cáncer de esófago, carcinoma de glándula salivar, cáncer de riñón, cáncer de hígado, cáncer de próstata, cáncer de vulva, cáncer de tiroides, cáncer de cabeza y cuello o una combinación de los mismos.

20 En una realización, el tumor sólido expresa Her2 y Plexina B1 o Plexina B2.

Determinados aspectos de la divulgación están dirigidos a un procedimiento para inhibir, retardar o reducir el crecimiento tumoral o la metástasis o tanto el crecimiento tumoral como la metástasis en un sujeto con cáncer que comprende la administración al sujeto de una cantidad eficaz de una molécula de unión aislada que se une específicamente a semaforina-4D (SEMA4D) y una cantidad eficaz de al menos otra terapia inmunomoduladora.

25 . En algunas realizaciones de la divulgación, la molécula de unión inhibe la interacción de SEMA4D con su receptor (por ejemplo, Plexina-B1). En algunas realizaciones, la molécula de unión inhibe la transducción de la señal de plexina-B1 mediada por SEMA4D. En algunas realizaciones, la inhibición, el retraso o la reducción de la metástasis tiene lugar independientemente de la inhibición del crecimiento del tumor primario, el retraso o la reducción. En algunas realizaciones, el cáncer se selecciona del grupo que consiste en carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma, leucemia,
 30 cáncer de células escamosas, cáncer de pulmón microcítico, cáncer de pulmón no microcítico, adenocarcinoma del pulmón, carcinoma escamoso del pulmón, cáncer del peritoneo, cáncer hepatocelular, cáncer gastrointestinal, cáncer gástrico, cáncer de páncreas, cáncer neuroendocrino, glioblastoma, cáncer de cuello uterino, cáncer de ovario, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, cáncer de cerebro, hepatoma, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer colorrectal, carcinoma de endometrio o uterino, cáncer de esófago, carcinoma de glándulas salivares, cáncer de riñón, cáncer de
 35 hígado, cáncer de próstata, cáncer de vulva, cáncer de tiroides, cáncer de cabeza y cuello y una combinación de los mismos. En algunas realizaciones, el sujeto tiene niveles elevados de linfocitos B, de linfocitos T o de linfocitos B y linfocitos T cuando se comparan con otros sujetos con cáncer.

40 En algunas realizaciones de la divulgación, la molécula de unión aislada que se une específicamente al mismo epítipo de SEMA4D como un anticuerpo monoclonal de referencia seleccionado entre el grupo que consiste en VX15/2503 y 67. En algunas realizaciones, la molécula de unión aislada comprende un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo. En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo comprende las seis regiones determinantes de complementariedad (CDR) del anticuerpo monoclonal VX15/2503 o 67.

45 En algunas realizaciones de la divulgación, la terapia inmunomoduladora se selecciona del grupo que consiste en una vacuna de cáncer, un agente inmunoestimulador, linfocitos T adoptivos o terapia de anticuerpos, bloqueo del punto de control inmunitario y una combinación de los mismos. En algunas realizaciones, el agente inmunomodulador se selecciona del grupo que consiste en interleucinas, citocinas, quimiocinas, antagonistas de bloqueos de punto de control inmunitario y una combinación de los mismos. En algunas realizaciones, la terapia inmunomoduladora puede ser una terapia de cáncer. En algunas realizaciones, la terapia de cáncer se selecciona del grupo que consiste en cirugía o procedimientos quirúrgicos, radioterapia, quimioterapia o una combinación de los mismos. En algunas
 50 realizaciones, la molécula de unión aislada y el agente inmunomodulador o la terapia inmunomoduladora se administran por separado o conjuntamente.

55 En algunas realizaciones, la invención se basa en los procedimientos para inhibir, retardar o reducir el crecimiento tumoral en un sujeto con cáncer que comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz de una molécula de unión aislada que es el anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a semaforina-4D (SEMA4D) y una cantidad eficaz de la al menos otra terapia inmunomoduladora. En algunas realizaciones, la molécula de unión inhibe la transducción de la señal de Plexina-B1 mediada por SEMA4D. En algunas realizaciones, el cáncer se selecciona del grupo que consiste en carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma, leucemia, cáncer de células

escamosas, cáncer de pulmón microcítico, cáncer de pulmón no microcítico, adenocarcinoma del pulmón, carcinoma escamoso del pulmón, cáncer del peritoneo, cáncer hepatocelular, cáncer gastrointestinal, cáncer gástrico, cáncer de páncreas, cáncer neuroendocrino, glioblastoma, cáncer de cuello uterino, cáncer de ovario, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, cáncer de cerebro, hepatoma, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer colorrectal, carcinoma de endometrio o uterino, cáncer de esófago, carcinoma de glándulas salivares, cáncer de riñón, cáncer de hígado, cáncer de próstata, cáncer de vulva, cáncer de tiroides, cáncer de cabeza y cuello y una combinación de los mismos. En algunas realizaciones, la molécula de unión aislada se une específicamente al mismo epítipo de SEMA4D que un anticuerpo monoclonal de referencia VX15/2503 o 67. En algunas realizaciones, la molécula de unión aislada inhibe de manera competitiva un anticuerpo monoclonal de referencia VX15/2503 o 67 de la unión específica a SEMA4D. La molécula de unión aislada comprende un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo. En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo comprende una cadena pesada variable VH que comprende las VHCDR 1-3 que comprende SEQ ID NOs 6, 7 y 8, respectivamente, y una cadena ligera variable (VL) que comprende las VLCDR 1-3 que comprende SEQ ID NOs 14, 15 y 16, respectivamente. En algunas realizaciones, VH y VL comprenden, respectivamente, SEQ ID NO: 9 y SEQ ID NO: 17 o SEQ ID NO: 10 y SEQ ID NO: 18. En algunas realizaciones, la terapia inmunomoduladora comprende un inhibidor del bloqueo del punto de control inmunitario. En algunas realizaciones, el inhibidor del bloqueo del punto de control inmunitario es un anticuerpo anti-CTLA4, un anticuerpo anti-PD-1 o una combinación de los mismos. En algunas realizaciones, la terapia inmunomoduladora comprende la administración de una vacuna contra el cáncer. En algunas realizaciones, el modulador de Treg es ciclofosfamida. En algunas realizaciones, la molécula de unión aislada y la terapia inmunomoduladora se administran por separado o simultáneamente. La administración de la combinación de la molécula de unión aislada y la terapia inmunomoduladora da como resultado una eficacia terapéutica mejorada en relación con la administración de la molécula de unión aislada o la terapia inmunomoduladora sola. En algunas realizaciones, el sujeto tiene un nivel elevado de linfocitos B, de linfocitos T o tanto linfocitos B como linfocitos T en comparación con otros sujetos con cáncer. En algunas realizaciones, el nivel de linfocitos B y/o de linfocitos T por microlitro de sangre en el sujeto es aproximadamente 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5 o 5 veces el número medio de linfocitos B y/o de linfocitos T en circulación en otros pacientes con cáncer. En algunas realizaciones, el nivel de linfocitos B y/o de linfocitos T por microlitro de sangre en el sujeto varía de aproximadamente 147 a aproximadamente 588 y de aproximadamente 1173 a aproximadamente 3910, respectivamente, por ejemplo, en comparación con otros pacientes con cáncer. En algunas realizaciones, el sujeto tiene niveles de linfocitos B y/o de linfocitos T que se encuentran dentro o por encima del intervalo de linfocitos B y/o de linfocitos T de pacientes sanos, sin cáncer. En algunas realizaciones, los niveles de linfocitos B y/o de linfocitos T por microlitro de sangre en el sujeto varían de aproximadamente 225 a aproximadamente 275 o más y de aproximadamente 1350 a aproximadamente 1650 o más, respectivamente, por ejemplo, en comparación con pacientes sanos sin cáncer.

En algunas realizaciones, la invención se basa en procedimientos para tratar a un sujeto que tiene cáncer con inmunoterapia que comprende: (a) determinar el número de linfocitos B y/o de linfocitos T en un sujeto con cáncer; y (b) administrar al sujeto una cantidad eficaz del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a la semaforina-4D (SEMA4D) y una cantidad eficaz de al menos otra terapia inmunomoduladora si el número de linfocitos B y/o de linfocitos T en el sujeto excede un nivel de umbral predeterminado. En algunas realizaciones, los niveles de umbral predeterminados de linfocitos B y/o de linfocitos T por microlitro de sangre en el sujeto es aproximadamente 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5 o 5 veces el número medio de linfocitos B y/o de linfocitos T en circulación en otros pacientes con cáncer. En algunas realizaciones, los niveles umbral predeterminados de linfocitos B y/o de linfocitos T por microlitro de sangre en el sujeto varían de aproximadamente 147 a aproximadamente 588 y de aproximadamente 1173 a aproximadamente 3910, respectivamente, por ejemplo, en comparación con otros pacientes con cáncer. En algunas realizaciones, los niveles umbral predeterminados de linfocitos B y/o de linfocitos T por microlitro de sangre en el sujeto caen dentro o por encima del intervalo de linfocitos B y/o de linfocitos T de pacientes sanos, sin cáncer. En algunas realizaciones, los niveles umbral predeterminados de linfocitos B y/o de linfocitos T por microlitro de sangre en el sujeto varían de aproximadamente 225 a aproximadamente 275 o más y de aproximadamente 1350 a aproximadamente 1650, o más, respectivamente, por ejemplo, en comparación con pacientes sanos sin cáncer.

En algunas realizaciones, la invención se basa en procedimientos de tratamiento de un sujeto que tiene cáncer con inmunoterapia que comprenden: administrar una combinación de una cantidad eficaz del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a la semaforina-4D (SEMA4D) y a una cantidad eficaz de al menos otra terapia inmunomoduladora a un sujeto con cáncer, en donde la administración de la combinación da como resultado una eficacia terapéutica mejorada en relación con la administración de la molécula de unión aislada o la otra terapia inmunomoduladora sola. En algunas realizaciones, la terapia inmunomoduladora comprende un inhibidor del bloqueo del punto de control inmunitario. En algunas realizaciones, el inhibidor del bloqueo del punto de control inmunitario es un anticuerpo anti-CTLA4, un anticuerpo anti-PD-1 o una combinación de los mismos. En algunas realizaciones, la terapia inmunomoduladora comprende la administración de una vacuna contra el cáncer. En algunas realizaciones, el modulador de Treg es ciclofosfamida. En algunas realizaciones, la molécula de unión aislada y la terapia inmunomoduladora se administran por separado o simultáneamente. En algunas realizaciones, el sujeto tiene niveles elevados de linfocitos B, linfocitos T o tanto linfocitos B como linfocitos T en comparación con otros sujetos con cáncer. En algunas realizaciones, los niveles de linfocitos B y/o de linfocitos T por microlitro de sangre en el sujeto es aproximadamente 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5 o 5 veces el número medio de linfocitos B y/o linfocitos T en circulación en otros pacientes con cáncer. En algunas realizaciones, los niveles de linfocitos B y/o de linfocitos T por microlitro de

sangre en el sujeto varían de aproximadamente 147 a aproximadamente 588 y de aproximadamente 1173 a aproximadamente 3910, respectivamente, por ejemplo, en comparación con otros pacientes con cáncer. En algunas realizaciones, el sujeto tiene niveles de linfocitos B y/o de linfocitos T que se encuentran dentro o por encima del intervalo de linfocitos B y/o de linfocitos T de pacientes sanos, sin cáncer. En algunas realizaciones, los niveles de linfocitos B y/o de linfocitos T por microlitro de sangre en el sujeto varían de aproximadamente 225 a aproximadamente 275 o más y de aproximadamente 1350 a aproximadamente 1650, o más, respectivamente, por ejemplo, en comparación con pacientes sanos sin cáncer. En algunas realizaciones, el cáncer se selecciona del grupo que consiste en carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma, leucemia, cáncer de células escamosas, cáncer de pulmón microcítico, cáncer de pulmón no microcítico, adenocarcinoma de pulmón, carcinoma de pulmón escamoso, cáncer del peritoneo, cáncer hepatocelular, cáncer gastrointestinal, cáncer gástrico, cáncer pancreático, cáncer neuroendocrino, glioblastoma, cáncer de cuello uterino, cáncer de ovario, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, cáncer cerebral, hepatoma, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer colorrectal, carcinoma endometrial o uterino, cáncer de esófago, carcinoma de glándulas salivales, cáncer de riñón, cáncer de hígado, cáncer de próstata, cáncer de vulva, cáncer de tiroides, cáncer de cabeza y cuello, y una combinación de los mismos. En algunas realizaciones de cualquiera de los procedimientos mencionados anteriormente, la molécula de unión aislada se une específicamente al mismo epítipo SEMA4D como un anticuerpo monoclonal de referencia seleccionado del grupo que consiste en VX15/2503 o 67. En algunas realizaciones de cualquiera de los procedimientos mencionados anteriormente, la molécula de unión aislada inhibe de manera competitiva un anticuerpo monoclonal de referencia seleccionado del grupo que consiste en VX15/2503 o 67 de unirse específicamente a SEMA4D. En algunas realizaciones, la molécula de unión aislada comprende un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo. En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende las seis regiones determinantes de complementariedad (CDR) del anticuerpo monoclonal VX15/2503 o 67. En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo es el anticuerpo monoclonal VX15/2503 o 67.

También se describen procedimientos para inhibir, retrasar o reducir el crecimiento de células tumorales que expresan Her2 y Plexina B1, Plexina B2, o una combinación de las mismas, que comprenden poner en contacto las células tumorales con una cantidad eficaz de una molécula de unión aislada que se une específicamente a la semaforina-4D (SEMA4D), en el que el crecimiento de las células tumorales se inhibe, retrasa o reduce. En algunas realizaciones, el contacto comprende la administración de la molécula de unión a SEMA4D a un sujeto con cáncer, en donde las células cancerosas del sujeto expresan Her2 y Plexina B1, Plexina B2, o una combinación de las mismas. En algunas realizaciones, el cáncer es cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de pulmón o cáncer de próstata.

También se describen procedimientos para tratar un sujeto que tiene cáncer que comprende: (a) analizar las células cancerosas del sujeto para la expresión de Her2 y Plexina B1, Plexina B2, o una combinación de los mismos; y (b) administrar al sujeto una cantidad eficaz de una molécula de unión aislada que se une específicamente a la semaforina-4D (SEMA4D) si las células cancerosas del sujeto expresan Her2 y Plexina B1, Plexina B2, o una combinación de las mismas.

Breve descripción de los dibujos/figuras

FIGURAS 1A-1B: Medición del volumen tumoral en ratones implantados con células tumorales Colon26 singénicas. La FIG. 1A muestra la medición del volumen del tumor Colon26 en ratones Balb/c y SCID tratados dos veces por semana con 1 mg (50 mg/kg) de anticuerpo anti-SEMA4D (Ab) 67 o inmunoglobulina de control de isotipo 2B8 (Ig de control 2B8). La FIG. 1B muestra el tiempo de supervivencia, como se define en el Ejemplo 1 a continuación, de ratones Balb/c y SCID tratados con Ab 67 anti-SEMA4D o Ig de control 2B8.

FIGURA 2: Muestra la medición del volumen tumoral Colon26 en ratones Balb/c implantados con células tumorales y tratados primero con anticuerpo anti-CD8 (Clon 2.43, BioXCell) o Ig de rata de control (150 mg/kg) y luego tratados como en la FIG 1A con Ig de control 2B8 o Ab 67 anti-SEMA4D.

FIGURAS 3A-3B: Medición de la densidad de células inmunes en el tumor Colon26 de ratones injertados. La FIG. 3A muestra la densidad de linfocitos T CD8 + según lo determinado por el % de área tumoral teñida con anticuerpo anti-CD8 después del tratamiento con Ig de control o Ab 67 anti-SEMA4D. La FIG. 3B muestra la densidad de linfocitos B CD20 + según lo determinado por el % de área tumoral teñida con anticuerpo anti-CD20 después del tratamiento con Ig de control o Ab 67 anti-SEMA4D.

FIGURAS 4A-4D: Medición de la distribución de macrófagos y linfocitos T CD8 + en el borde delantero del tumor en ratones injertados con Colon26. La FIG. 4A muestra imágenes de tumores representativos de Colon26 de ratones injertados 27 días antes y tratados con Ig de control o Ab 67 anti-SEMA4D como se describe en la FIG. 1. La FIG. 4B muestra la medición de la densidad de macrófagos de tipo M1 en el borde delantero del tumor, definida como una región de 300 píxeles de ancho (250 micrómetros) desde el borde del tumor, según lo determinado por el % de área de píxeles teñida con anticuerpo anti-F4/80. La FIG. 4C muestra la medición de la densidad de macrófagos de tipo M2 en el borde delantero del tumor según lo determinado por el % de área de píxeles teñida con anticuerpo anti-CD206. La FIG. 4D muestra la medición de la densidad de linfocitos T CD8 + en el borde delantero del tumor, según lo determinado por el % de área de píxeles teñida con anticuerpo anti-CD8 de linfocitos T citotóxicos.

FIGURAS 5A-5E: Medición del volumen tumoral en ratones injertados con células tumorales colon26 singénicas. La FIG. 5A muestra la medición del volumen tumoral de Colon26 en ratones Balb/c tratados con IgG1/2B8 de ratón de control o MAb 67-2 anti-SEMA4D (50 mg/kg, IP, semanalmente), con o sin anti-CTLA4/MAb UC10- 4F10-11 (100 mg en el día 8 y 50 mg en los días 11 y 14 después de la inoculación del tumor), y con anti-PD1/RMP1-14

(100 mg en el día 3, dos veces por semana) en combinación con anti-CTLA4/MAb UC10-4F10-11. La FIG. 5B muestra el tiempo de supervivencia de ratones Balb/c tratados con IgG1/2B8 de ratón de control o anti-SEMA4D/MAb 67-2, con o sin anti-CTLA4/MAb UC10-4F10-11, y con anti-PD1/RMP1-14 (100 mg el día 3, dos veces por semana) en combinación con anti-CTLA4/MAb UC10-4F10-11. La FIG. 5C muestra la frecuencia de regresión tumoral en ratones Balb/c tratados con IgG1/2B8 de ratón de control o anti-SEMA4D/MAb 67-2, con o sin anti-CTLA4/MAb UC10-4F10-11, y con γ -PD1/RMP1-14 (100 mg el día 3, dos veces por semana) en combinación con anti-CTLA4/MAb UC10-4F10-11 (p-valores, * 0,05 y ** 0,01). La FIG. 5D muestra mediciones de citocinas proinflamatorias IFN γ en los linfocitos infiltrantes de tumores de ratones tratados con la combinación de anti-SEMA4D/MAb 67-2 y anti-CTLA4/MAb UC10-4F10-11 en comparación con el ratón de control con IgG1/2B8 o monoterapia (ya sea anti-SEMA4D/MAb 67-2 o anti-CTLA4/MAb UC10-4F10-11). La FIG. 5E muestra la frecuencia de respuestas secretoras de IFN γ específicas de péptidos entre linfocitos infiltrantes de tumores recuperados del bazo de ratones tratados con la combinación de anti-SEMA4D/MAb 67-2 y anti-CTLA4/MAb UC10-4F10-11 en comparación con cualquiera de los ratones de control con IgG1/2B8 o monoterapia (ya sea anti-SEMA4D/MAb 67-2 o anti-CTLA4/MAb UC10-4F10-11).

FIGURAS 6A-6E: Medición de un anticuerpo anti-SEMA4D para afectar la infiltración tumoral de linfocitos T CD8 + citotóxicos específicos de tumor. La FIG. 6A muestra la medición de células secretoras de IFN γ en ratones tratados con MAb 67 tanto en presencia como en ausencia de péptido. La FIG. 6B muestra imágenes representativas de ELISPOT. La FIG. 6C muestra la medición de citocinas antitumorales, como IFN γ y TNF α , en linfocitos infiltrantes de tumores (TIL). La FIG. 6D muestra mediciones de citocinas proinflamatorias IFN γ y TNF α en la TIL de ratones tratados con el anticuerpo anti-SEMA4D/MAb 67. La FIG. 6E muestra la frecuencia de respondedores secretoras de IFN γ específicos de péptido en los linfocitos infiltrantes de tumores de ratones tratados con anticuerpo anti-SEMA4D/MAb 67.

FIGURAS 7A-7D: Medición del volumen tumoral en ratones injertados con células tumorales Colon26 singénicas. La FIG. 7A muestra la medición del volumen tumoral de Colon26 en ratones Balb/c tratados con IgG1/2B8 de ratón de control o anti-SEMA4D/MAb 67-2 (50 mg/kg, IP, semanal) junto con Ig de rata de control o anti-PD1 /MAbRMP1-14 de rata (100 mg, dos veces por semana, durante 2 semanas a partir de los 3 días posteriores a la inoculación del tumor). La FIG. 7B muestra el tiempo de supervivencia de ratones Balb/c tratados con IgG1/2B8 de ratón de control o anti-SEMA4D/MAb 67-2 junto con Ig de rata de control o anti-PD1/MAbRMP1-14 de rata. Las figs. 7C y 7D muestran la frecuencia de regresión tumoral en ratones Balb/c tratados con IgG1/2B8 de ratón de control o anti-SEMA4D/MAb 67-2 junto con Ig de rata de control o anti-PD1/MAbRMP1-14 de rata.

FIGURAS 8A-8E: Medición del volumen tumoral en ratones implantados con células tumorales Colon26 singénicas. La FIG. 8A muestra la medición media del volumen tumoral de Colon26 en ratones Balb/c tratados con IgG1/2B8 de ratón de control o anti-SEMA4D/MAb 67-2 (50 mg/kg, IP, semanalmente), con o sin ciclofosfamida (CY) (50 mg/kg, IP). La FIG. 8B muestra la medición mediana del volumen tumoral de Colon26 en ratones Balb/c tratados con IgG1/2B8 de ratón de control o anti-SEMA4D/MAb 67-2 (50 mg/kg, IP, semanalmente), con o sin ciclofosfamida (CY) (50 mg/kg, IP). La FIG. 8C muestra el tiempo de supervivencia de ratones Balb/c tratados con IgG1/2B8 de ratón de control o anti-SEMA4D/MAb 67-2, con o sin ciclofosfamida. Las FIG. 8D y 8E muestran la frecuencia de regresiones tumorales en ratones Balb/c tratados con IgG1/2B8 de ratón de control o anti-SEMA4D /MAb 67-2, con o sin ciclofosfamida (CY).

FIGURAS 9A-9C: Medición del volumen tumoral en ratones implantados con células tumorales Tubo.A5. La FIG. 9A muestra la medición del volumen tumoral en ratones Balb/c tratados con IgG1/2B8 de ratón de control o anti-SEMA4D/MAb 67-2 (50 mg/kg, IP, semanalmente), con o sin anti-Neu/MAb7.16.4 (α Neu) (200 mg IP semanales X2 comenzando cuando el volumen tumoral (VT) es de aproximadamente 200 mm³, en los días 21 y 28). La FIG. 9B muestra el tiempo de supervivencia de ratones Balb/c tratados con IgG1/2B8 de ratón de control o anti-SEMA4D/MAb 67-2, con o sin anti-Neu/MAb7.16.4 (α Neu). La FIG. 9C muestra la frecuencia de regresiones tumorales en ratones Balb/c tratados con IgG1/2B8 de ratón de control o anti-SEMA4D/MAb 67-2, con o sin anti-Neu/MAb7.16.4 (α Neu).

FIGURAS 10A-10E: Medición del volumen tumoral en ratones Balb/c implantados con células tumorales Tubo.A5. La FIG. 10A muestra la medición del volumen tumoral en ratones Balb/c tratados con IgG1/2B8 de ratón de control o anti-SEMA4D/MAb 67-2 (50 mg/kg, IP, semanalmente). La FIG. 10B muestra el tiempo de supervivencia de ratones Balb/c tratados con IgG1/2B8 de ratón de control o anti-SEMA4D/MAb 67-2. Las FIG. 10C-10E muestran la frecuencia de regresiones tumorales en el modelo tumoral Tubo.A5. Específicamente, la FIG. 10C muestra ratones de control injertados con el tumor Tubo.A5. La FIG. 10D muestra ratones que han rechazado los injertos de tumor Tubo.A5 después del tratamiento con anti-SEMA4D/MAb 67-2 y que fueron reexpuestos con tumor Tubo.A5 el día 90 después del injerto original. La FIG. 10E muestra ratones sin exposición previa expuestos con el mismo injerto tumoral que en la FIG. 10D para demostrar la viabilidad del tumor *in vivo*.

FIGURAS 11A-11B: Medición de la infiltración de linfocitos T y MDSC en modelos tumorales Tubo.A5. La FIG. 11A muestra la medición de linfocitos T CD3 + en tumores de ratones Balb/c tratados con IgG1/2B8 de ratón de control o anti-SEMA4D/MAb 67-2 (50 mg/kg, IP, semanalmente). La FIG. 11B muestra la medición de CD11b + Gr1 + MDSC en tumores de ratones Balb/c tratados con IgG1/2B8 de ratón de control o anti-SEMA4D/MAb 67-2 (50 mg/kg, IP, semanalmente).

FIGURAS 12A-12D: Medición del volumen tumoral en ratones implantados con células tumorales Colon 26 o Tubo.A5. La FIG. 12A muestra la medición del volumen tumoral Tubo.A5 en ratones Balb/c tratados con IgG1/2B8.1E7 de ratón de control (50 mg/kg, IP, semanal x 6) o niveles variables de anti-SEMA4D/MAb 67-2 (1, 10 o 50 mg/kg, IP, semanal x 6). La FIG. 12B muestra el tiempo de supervivencia de ratones Balb/c tratados con IgG1/2B8.1E7 de ratón de control (50 mg/kg, IP, semanal x 6) o niveles variables de anti-SEMA4D/MAb 67-2 (1, 10

o 50 mg/kg, IP, semanal x 6). La FIG. 12C muestra la medición del volumen tumoral de Colon 26 en ratones Balb/c tratados con IgG1/2B8.IE7 de ratón control (50 mg/kg, IP, semanal x 5), anti-SEMA4D/MAb 67-2 (50 mg/kg, IP, semanal x 5), anti-CTLA4/MAb UC10-4F10-11 (5 mg/kg, IP, semanal x 5), o una combinación de anti-CTLA4/MAb UC10-4F10-11 (5 mg/kg, IP, semanal x 5) y niveles variables de anti-SEMA4D/MAb 67-2 (0,3, 3, 10 o 50 mg/kg, IP, semanalmente x 5). La FIG. 12D muestra el tiempo de supervivencia de ratones Balb/c tratados con IgG1/2B8.IE7 de ratón control (50 mg/kg, IP, semanal x 5), anti-SEMA4D/MAb 67-2 (50 mg/kg, IP, semanal x 5), anti-CTLA4/MAb UC10-4F10-11 (5 mg/kg, IP, semanal x 5), o una combinación de anti-CTLA4/MAb UC10-4F10-11 (5 mg/kg, IP, semanal x 5) y niveles variables de anti-SEMA4D/MAb 67-2 (0,3, 3, 10 o 50 mg/kg, IP, semanalmente x 5).

FIGURA 13: Resumen de los experimentos realizados en las figuras anteriores que muestran regresiones tumorales y crecimiento después de reexposición tumoral en modelos tumorales Colon26 y Tubo.A5.

Descripción detallada

I. Definiciones

Debe observarse que el término "un" o "una" entidad se refiere a uno o más de esa entidad; por ejemplo, se entiende que "un polinucleótido" representa uno o más polinucleótidos. Como tales, los términos "un"(o "una"), "uno o más", y "al menos uno" pueden usarse indistintamente en el presente documento.

Además, "y/o" cuando se usa en el presente documento debe considerarse como una divulgación específica de cada una de las dos características o componentes especificados con o sin el otro. Por consiguiente, el término "y/o" como se usa en una expresión como "A y/o B" en el presente documento tiene por objeto incluir "A y B", "A o B", "A" (solo), y "B" (solo). De manera análoga, el término "y/o" como se usa en una expresión tal como "A", B, y/o C" tiene por objeto abarcar cada una de las siguientes realizaciones: A, B y C; A, B o C; A o C; A o B; B o C; A y C; A y B; B y C; A (solo); B (solo); y C (solo).

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que un experto en la materia a la que la divulgación se refiere entiende habitualmente. Por ejemplo, the Concise Dictionary of Biomedicine and Molecular Biology, Juo, Pei-Show, 2ª ed., 2002, CRC Press; The Dictionary of Cell and Molecular Biology, 3ª ed., 1999, Academic Press; y the Oxford Dictionary Of Biochemistry And Molecular Biology, Revisado, 2000, Oxford University Press, proporcionan a un experto en la materia un diccionario general de muchos de los términos usados en la presente divulgación.

Unidades, prefijos y símbolos se denotan en su forma aceptada por el Sistema Internacional de Unidades (SI). Los intervalos numéricos incluyen a los números que definen el intervalo. A menos que se indique lo contrario, las secuencias de aminoácidos se escriben de izquierda a derecha en la orientación de amino a carboxi. Los encabezados que se proporcionan en el presente documento no son limitaciones de los diversos aspectos o realizaciones de la divulgación, que se pueden tener por referencia a la memoria descriptiva en su conjunto. En consecuencia, los términos que se definen inmediatamente a continuación se definen con mayor detalle por referencia a la memoria descriptiva en su totalidad.

Siempre que se describan realizaciones con el lenguaje "que comprende", también se proporcionan realizaciones análogas descritas en las expresiones "que consiste en" y/o "que consiste esencialmente en".

Los aminoácidos se citan en el presente documento por sus símbolos de tres letras comúnmente conocidos o mediante los símbolos de una letra recomendados por la Comisión de Nomenclatura Bioquímica IUPAC-IUB. Los nucleótidos, igualmente, se citan por sus códigos de una sola letra comúnmente aceptados.

Tal como se usa en el presente documento, los términos "cáncer" y "canceroso" se refieren o describen la afección fisiológica en mamíferos en la que una población de células se caracteriza por un crecimiento celular no regulado. Los ejemplos de cáncer incluyen, entre otros, carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma y leucemia. Los ejemplos más particulares de tales cánceres incluyen cáncer de células escamosas, cáncer de pulmón microcítico, cáncer de pulmón no microcítico, adenocarcinoma de pulmón, carcinoma de pulmón escamoso, cáncer de peritoneo, cáncer hepatocelular, cáncer gastrointestinal, cáncer gástrico, cáncer pancreático, glioblastoma, cáncer de cuello uterino, cáncer de ovario, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, cáncer de cerebro, hepatoma, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer colorrectal, carcinoma endometrial o uterino, cáncer de esófago, carcinoma de glándulas salivales, sarcoma, cáncer de riñón, cáncer de hígado, cáncer de próstata, cáncer de vulva, cáncer de tiroides, carcinoma hepático y varios tipos de cánceres de cabeza y cuello.

En ciertas realizaciones, los cánceres metastásicos que son susceptibles de tratamiento a través de los procedimientos proporcionados en el presente documento incluyen, pero no se limitan a, sarcomas metastásicos, carcinomas de mama, cáncer de ovario, cáncer de cabeza y cuello, y cáncer pancreático. En ciertas realizaciones, los cánceres metastásicos o las células tumorales que son susceptibles de tratamiento a través de los procedimientos proporcionados en el presente documento expresan receptores de Plexina-B1 y/o Plexina-B2 para SEMA4D.

La "angiogénesis" se refiere a un evento morfogénico complejo de varias etapas durante el cual las células endoteliales, estimuladas por los principales determinantes de la remodelación vascular, modifican dinámicamente

5 sus contactos de célula a célula y de célula a matriz y se mueven direccionalmente para reorganizarse en una ramificación vascular madura (Bussolino y col., Trends Biochem Sci. 22: 251-256 (1997); Risau, Nature 386: 671-674 (1997); Jain, Nat. Med. 9: 685-693 (2003)). La formación de nuevos vasos sanguíneos es una etapa clave durante el desarrollo del embrión, pero también ocurre en adultos en condiciones fisiológicas y patológicas, como retinopatía, artritis reumatoide, isquemia y particularmente crecimiento tumoral y metástasis (Carmeliet, Nat. Med. 9 : 653-660 (2003)).

10 Tal como se usa en el presente documento, el término "laboratorio clínico" se refiere a una instalación para el examen o procesamiento de materiales derivados de un sujeto vivo, por ejemplo, un ser humano. Los ejemplos no limitantes de procesamiento incluyen exámenes biológicos, bioquímicos, serológicos, químicos, inmunohematológicos, hematológicos, biofísicos, citológicos, patológicos, genéticos u otros exámenes de materiales derivados del cuerpo humano con el fin de proporcionar información, por ejemplo, para el diagnóstico, prevención, o tratamiento de cualquier enfermedad o discapacidad, o la evaluación de la salud de sujetos vivos, por ejemplo, seres humanos. Estos exámenes también pueden incluir procedimientos para recolectar u obtener una muestra, preparar, determinar, medir o describir la presencia o ausencia de varias sustancias en el cuerpo de un sujeto vivo, por ejemplo, un ser humano o una muestra obtenida de cuerpo de un sujeto vivo, por ejemplo, un ser humano.

15 Las expresiones "trastorno proliferativo" y "enfermedad proliferativa" se refieren a trastornos asociados con la proliferación celular anómala tal como el cáncer.

20 [0034] "Tumor" y "neoplasia", tal como se usan en el presente documento, se refieren a cualquier masa de tejido que es resultado del crecimiento o proliferación celular excesiva, ya sea benigna (no cancerosa) o maligna (cancerosa) incluyendo lesiones precancerosas. En ciertas realizaciones, los tumores descritos en el presente documento expresan Plexina-B1 y/o Plexina-B2, y pueden expresar SEMA4D y Met activado.

25 Tal como se usa en el presente documento, la expresión "proveedor de beneficios de atención médica" abarca partes individuales, organizaciones o grupos que brindan, presentan, ofrecen, pagan en su totalidad o en parte, o están asociados de otra manera con el acceso de un paciente a una o más atención médica. beneficios, planes de beneficios, seguro de salud y/o programas de cuentas de gastos de atención médica.

30 La expresión "terapia inmunomoduladora" o "inmunoterapia" se refiere al tratamiento que afecta a una enfermedad o trastorno en un sujeto induciendo y/o potenciando una respuesta inmunitaria en ese sujeto. Las terapias inmunomoduladoras incluyen vacunas contra el cáncer, agentes inmunoestimuladores, terapia de linfocitos T o anticuerpos adoptivos y bloqueo del punto de control inmunitario (Lizée y col. 2013. Harnessing the Power of the Immune System to Target Cancer. Annu. Rev. Med. Vol. 64 No. 71-90).

35 La expresión "agente inmunomodulador" se refiere a los agentes activos de inmunoterapia. Los agentes inmunomoduladores incluyen una gran variedad de preparaciones recombinantes, sintéticas y naturales. Los ejemplos de agentes inmunomoduladores incluyen, pero no se limitan a, interleucinas tales como IL-2, IL-7, IL-12; citocinas tales como factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), interferones; diversas quimiocinas tales como CXCL13, CCL26, CXCL7; antagonistas de los bloqueos del punto de control inmunitario, como anti-CTLA-4, anti-PDI o anti-PD-L1 (ligando de PD-1), anti-LAG3, anti-B7-H3, citosina fosfato-guanosina sintética (CpG) oligodesoxinucleótidos, glucanos; y moduladores de linfocitos T reguladores (Treg) como la ciclofosfamida.

40 Los términos "metástasis", "metastatiza", "metastático" y otros equivalentes gramaticales tal como se usan en el presente documento se refieren a células cancerosas que se propagan o transfieren desde el sitio de origen (por ejemplo, un tumor primario) a otras regiones del cuerpo, con el desarrollo de una lesión cancerosa similar en la nueva ubicación. Una célula "metastática" o "metastasis" es aquella que pierde contactos adhesivos con las células vecinas y migra a través del torrente sanguíneo o la linfa desde el sitio primario de la enfermedad para invadir las estructuras del cuerpo vecino. Los términos también se refieren al proceso de metástasis, que incluye, entre otros, el desprendimiento de células cancerosas de un tumor primario, la invasión de las células tumorales a la circulación, su supervivencia y migración a un sitio distante, la unión y la extravasación a un nuevo sitio desde la circulación, y microcolonización en el sitio distante, y crecimiento y desarrollo tumoral en el sitio distante.

45 La expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a la cantidad de un anticuerpo, polipéptido, polinucleótido, molécula orgánica pequeña, u otro fármaco eficaz para "tratar" una enfermedad o trastorno en un sujeto o mamífero. En el caso del cáncer, la cantidad terapéuticamente eficaz del fármaco puede reducir el número de células cancerosas, retardar o detener la división de células cancerosas; reducir o retardar un aumento del tamaño tumoral; inhibir, p. ej., suprimir, retardar, prevenir, detener, retrasar o revertir la infiltración de células cancerosas en órganos periféricos incluyendo, por ejemplo, la propagación del cáncer en tejidos blandos y en hueso; inhibir, por ejemplo, suprimir, retardar, prevenir, reducir, detener, retrasar o revertir la metástasis tumoral; inhibir, por ejemplo, suprimir, retardar, prevenir, detener, retrasar o revertir el crecimiento tumoral; aliviar hasta cierto punto uno o más de los síntomas asociados con el cáncer; reducir la morbilidad y la mortalidad; mejorar la calidad de vida; una combinación de tales efectos. En la medida en que el medicamento impide el crecimiento y/o mata las células cancerosas existentes, puede denominarse citostático y/o citotóxico.

Términos tales como "tratar" o "tratamiento" o "para tratar" o "aliviar" o "para aliviar" se refieren a tanto 1) medidas

terapéuticas que curan, ralentizan, disminuyen los síntomas de, invierten y/o detienen la progresión de una afección o trastorno patológico diagnosticado y 2) medidas profilácticas o preventivas que previenen y/o ralentizan el desarrollo de una afección o trastorno patológico diana. Aquellos en necesidad de tratamiento incluyen aquellos ya con el trastorno; aquellos propensos a tener el trastorno; y aquellos en los que el trastorno va a prevenirse. Un sujeto es "tratado" con éxito de acuerdo con los métodos de la presente divulgación si el paciente muestra uno o más de los siguientes: una reducción en el número o ausencia total de células cancerosas; una reducción en el tamaño del tumor; o retraso o reversión del crecimiento tumoral, inhibición, por ejemplo, de infiltración de células cancerosas en órganos periféricos que incluyen, por ejemplo, la propagación del cáncer en tejidos blandos y huesos ; inhibición de, por ejemplo, supresión, retraso, prevención, contracción, reversión, retraso o ausencia de metástasis tumorales; inhibición de, por ejemplo, supresión, retraso de, prevención, contracción, reversión, retraso o ausencia de crecimiento tumoral; alivio de uno o más síntomas asociados con el cáncer específico; reducción de la morbilidad y mortalidad; mejora en la calidad de vida; o alguna combinación de efectos. Los resultados clínicos beneficiosos o deseados incluyen, entre otros, alivio de síntomas, disminución del grado de la enfermedad, estado de enfermedad estabilizado (es decir, que no empeora), retraso o ralentización de la progresión de la enfermedad, mejora o paliación del estado de enfermedad, y remisión (tanto parcial como total), tanto detectable como indetectable. "Tratamiento" también puede significar prolongar la supervivencia en comparación con la supervivencia esperada si no se recibe tratamiento. Aquellos en necesidad de tratamiento incluyen aquellos ya con la afección o trastorno, además de aquellos propensos a tener la afección o trastorno o aquellos en los que la afección o trastorno va a prevenirse.

Por "sujeto" o "individuo" o "animal" o "paciente" o "mamífero", se indica cualquier sujeto, particularmente un sujeto mamífero, para el que se desea diagnóstico, pronóstico o terapia. Los sujetos mamíferos incluyen seres humanos, animales domésticos, animales de granja, y animales de zoológico, para deportes, o mascotas, tales como perros, gatos, cobayas, conejos, ratas, ratones, caballos, ganado vacuno, vacas, osos,, etc.

Como se usa en el presente documento, expresiones tales como "un sujeto que se beneficiaría de la administración de un anticuerpo anti-SEMA4D como un único agente o en combinación con al menos otra terapia inmunomoduladora" y "un animal en necesidad de tratamiento" incluyen sujetos, tales como sujetos mamíferos, que se beneficiarían de la administración de un anticuerpo anti-SEMA4D como un único agente o en combinación con al menos otra terapia inmunomoduladora.

Una "molécula de unión" o "molécula de unión al antígeno" de la presente divulgación se refiere en su sentido más amplio a una molécula que se une específicamente a un determinante antigénico. En una realización, la molécula de unión se une específicamente a SEMA4D, p. ej., a un polipéptido SEMA4D transmembrana de aproximadamente 150 kDa o un polipéptido SEMA4D soluble de aproximadamente 120 kDa (comúnmente denominado SEMA4Ds). En otra realización, una molécula de unión de la divulgación es un anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno del mismo. En otra realización, una molécula de unión de la divulgación comprende al menos una Región determinante de Complementariedad (RDC) de cadena pesada o ligera de una molécula de anticuerpo. En otra realización, una molécula de unión de la divulgación comprende al menos dos RDC de una o más moléculas de anticuerpo. En otra realización, una molécula de unión de la divulgación comprende al menos tres RDC de una o más moléculas de anticuerpo. En otra realización, una molécula de unión de la divulgación comprende al menos cuatro RDC de una o más moléculas de anticuerpo. En otra realización, una molécula de unión de la divulgación comprende al menos cinco RDC de una o más moléculas de anticuerpo. En otra realización, una molécula de unión de la divulgación comprende al menos seis RDC de una o más moléculas de anticuerpo. En otra realización, la molécula de unión puede ser un antagonista del receptor Plexina-B1 para SEMA4D. Por antagonista se entiende una molécula de unión que interfiere con la función de señalización del receptor. El antagonista puede bloquear competitivamente la unión de un ligando natural pero no puede activar la respuesta fisiológica normal. Las moléculas de unión pueden ser anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos como se describió anteriormente o pueden ser otros medicamentos biológicos o de molécula pequeña que actúan como inhibidores competitivos o interfieren con la señalización de los ligandos naturales. La presente divulgación está dirigida a un procedimiento de inhibición del crecimiento tumoral y de metástasis en un sujeto, por ejemplo, un paciente de cáncer, que comprende administrar al sujeto una molécula de unión anti-SEMA4D, p. ej., un anticuerpo, o un fragmento de unión al antígeno, variante o derivado del mismo, como un único agente o en combinación con al menos otra terapia inmunomoduladora. A menos que se haga específicamente referencia a anticuerpos de tamaño completo tales como los anticuerpos de origen natural, la expresión "anticuerpo anti-SEMA4D" abarca anticuerpos de tamaño completo, así como fragmentos de unión al antígeno, variantes, análogos, o derivados de tales anticuerpos, p. ej., anticuerpo de origen natural o moléculas de inmunoglobulina o moléculas de anticuerpo genomanipuladas o fragmentos que se unen al antígeno de una manera similar a las moléculas de anticuerpo. También se incluyen en moléculas de unión a SEMA4D otras moléculas biológicas o pequeñas que se unen e inhiben la actividad de SEMA4D o de su receptor Plexina-B1.

Como se usa en el presente documento, anticuerpos "humanos" o "completamente humanos" incluyen anticuerpos que tienen la secuencia de aminoácidos de una inmunoglobulina humana e incluyen anticuerpos aislados de bibliotecas de inmunoglobulina humana o de animales transgénicos para una o más inmunoglobulinas humanas, como se describe más adelante y, por ejemplo, en la patente de EE.UU. n.º 5.939.598 de Kucherlapati y col. Anticuerpos "humanos" o "completamente humanos" también incluyen anticuerpos que comprenden al menos el dominio variable de una cadena pesada, o al menos los dominios variables de una cadena pesada y una cadena ligera, en el que el (los) dominio(s) variable(s) tienen la secuencia de aminoácidos del (los) dominio(s) variable(s) de inmunoglobulinas

humanas.

Anticuerpos "humanos" o "completamente humanos" también incluyen anticuerpos "humanos" o "completamente humanos", como se ha descrito anteriormente, que comprenden, consisten esencialmente en, o consisten en, variantes (incluyendo derivados) de moléculas de anticuerpo (p. ej., las regiones VH y/o regiones VL) descritas en el presente documento, cuyos anticuerpos o fragmentos de los mismos se unen inmuno-específicamente a un polipéptido SEMA4D o fragmento o variante del mismo. Pueden usarse técnicas convencionales conocidas por aquellos expertos en la materia para introducir mutaciones en la secuencia de nucleótidos que codifica un anticuerpo anti-SEMA4D humano, incluyendo, entre otros, mutagénesis dirigida al sitio y mutagénesis mediada por PCR que produce sustituciones de aminoácidos. En determinados aspectos, las variantes (incluyendo derivados) codifican menos de 50 sustituciones de aminoácidos, menos de 40 sustituciones de aminoácidos, menos de 30 sustituciones de aminoácidos, menos de 25 sustituciones de aminoácidos, menos de 20 sustituciones de aminoácidos, menos de 15 sustituciones de aminoácidos, menos de 10 sustituciones de aminoácidos, menos de 5 sustituciones de aminoácidos, menos de 4 sustituciones de aminoácidos, menos de 3 sustituciones de aminoácidos, o menos de 2 sustituciones de aminoácidos con respecto a la región VH de referencia, VHCDR1, VHCDR2, VHCDR3, región VL, VLCDR1, VLCDR2, o VLCDR3.

En ciertas realizaciones, las sustituciones de aminoácidos son sustituciones de aminoácidos conservativas, discutidas adicionalmente a continuación. Como alternativa, pueden introducirse mutaciones al azar a lo largo de la totalidad o parte de la secuencia codificante, tal como por mutagénesis de saturación, y los mutantes resultantes pueden identificarse selectivamente para actividad biológica para identificar mutantes que retienen actividad (p. ej., la capacidad de unirse a un polipéptido SEMA4D, p. ej., humana, murina, o tanto humana como murina SEMA4D). Tales variantes (o derivados de los mismos) de anticuerpos "humanos" o "completamente humanos" también pueden denominarse anticuerpos humanos o completamente humanos que son "optimizados" u "optimizados para unión al antígeno" e incluyen anticuerpos que tienen afinidad mejorada hacia el antígeno.

Los términos "anticuerpo" e "inmunoglobulina" se usan indistintamente en el presente documento. Un anticuerpo o inmunoglobulina comprende al menos el dominio variable de una cadena pesada, y normalmente comprende al menos los dominios variables de una cadena pesada y una cadena ligera. Las estructuras de inmunoglobulina básicas en los sistemas de vertebrado son relativamente bien entendidas. Véase, p. ej., Harlow y col. (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual* (2ª ed.; Cold Spring Harbor Laboratory Press).

Como se usa en el presente documento, el término "inmunoglobulina" comprende diversas clases amplias de polipéptidos que pueden distinguirse bioquímicamente. Aquellos expertos en la materia apreciarán que las cadenas pesadas se clasifican como gamma, mu, alfa, delta o épsilon, (γ , μ , α , δ , ϵ) con algunas subclases entre ellas (p. ej., $\gamma 1$ - $\gamma 4$). Es la naturaleza de esta cadena la que determina la "clase" del anticuerpo como IgG, IgM, IgA, IgE, o IgE, respectivamente. Las subclases de inmunoglobulina (isotipos) p.ej., IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, etc., están bien caracterizadas y se sabe que confieren especialización funcional. Versiones modificadas de cada una de estas clases e isotipos son fácilmente perceptibles para el experto en la materia en vista de la presente divulgación y, por consiguiente, están dentro del ámbito de la presente divulgación. Todas las clases de inmunoglobulina están claramente dentro del ámbito de la presente divulgación, la siguiente discusión generalmente se dirigirá a la clase de IgG de moléculas de inmunoglobulina. Con respecto a IgG, una molécula de inmunoglobulina convencional comprende dos polipéptidos de cadena ligera idénticos con peso molecular de aproximadamente 23.000 Daltons, y dos polipéptidos de cadena pesada idénticos con peso molecular de 53.000-70.000. Las cuatro cadenas normalmente se unen por enlaces disulfuro en una configuración en "Y" en la que las cadenas ligeras unen las cadenas pesadas empezando en la boca de la "Y" y continuando a través de la región variable.

Las cadenas ligeras se clasifican o bien como kappa o bien como lambda (k , λ). Cada clase de cadena pesada puede unirse con cualquiera de una cadena ligera kappa o lambda. En general, las cadenas ligeras y pesadas se unen covalentemente entre sí, y las porciones de "cola" de las dos cadenas pesadas están unidas entre sí por enlaces disulfuro covalentes o enlaces no covalentes cuando las inmunoglobulinas se generan o bien por hibridomas, linfocitos B o bien por células huésped genomanipuladas. En la cadena pesada, las secuencias de aminoácidos van de un extremo N-terminal en los extremos ahorquillados de la configuración en Y al extremo C-terminal en el final de cada cadena.

Las cadenas ligeras y pesadas se dividen en regiones de homología estructural y funcional. Los términos "constante" y "variable" se usan funcionalmente. En este sentido, se apreciará que los dominios variables de tanto las porciones de cadena ligera (VL o VK) como pesada (VH) determinan el reconocimiento del antígeno y la especificidad. Por el contrario, los dominios constantes de la cadena ligera (CL) y la cadena pesada (CH1, CH2 o CH3) confieren propiedades biológicas importantes tales como secreción, movilidad transplacentaria, unión al receptor de Fc, unión al complemento, y similares. Convencionalmente, la numeración de los dominios de la región constante aumenta a medida que se vuelven más distales desde el sitio de unión al antígeno o extremo amino-terminal del anticuerpo. La porción del extremo N-terminal es una región variable y en la porción del extremo C-terminal está una región constante; los dominios CH3 y CL comprenden realmente el extremo carboxi-terminal de la cadena pesada y ligera, respectivamente.

Como se ha indicado anteriormente, la región variable permite que el anticuerpo reconozca selectivamente y se una específicamente a epítopos sobre antígenos. Es decir, se combinan el dominio VL y el dominio VH, o el subconjunto

de las regiones determinantes de la complementariedad (RDC) dentro de estos dominios variables, de un anticuerpo para formar la región variable que define un sitio de unión al antígeno tridimensional. Esta estructura de anticuerpo cuaternaria forma el sitio de unión al antígeno presente en el extremo de cada brazo de la Y. Más específicamente, el sitio de unión al antígeno se define por tres RDC sobre cada una de las cadenas VH y VL. En algunos casos, p. ej., ciertas moléculas de inmunoglobulina derivadas de especies de camélido o genomanipuladas basándose en inmunoglobulinas de camélido, una molécula de inmunoglobulina completa puede consistir en cadenas pesadas solo, sin cadenas ligeras. Véase, p. ej., Hamers-Casterman y col., Nature 363:446-448 (1993).

En anticuerpos que de origen natural, las seis "regiones determinantes de la complementariedad" o "RDC" presentes en cada dominio de unión al antígeno son secuencias no contiguas cortas de aminoácidos que están específicamente situadas para formar el dominio de unión al antígeno a medida que el anticuerpo adopta su configuración tridimensional en un entorno acuoso. El resto de los aminoácidos en los dominios de unión al antígeno, denominados regiones "marco conservadas", muestran menos variabilidad intermolecular. Las regiones marco conservadas adoptan en gran medida una conformación de lámina β y las RDC forman bucles que conectan, y en algunos casos forman parte de, la estructura de lámina β . De este modo, las regiones marco conservadas actúan formando un armazón que proporciona el posicionamiento de las RDC en orientación correcta por interacciones intercatenarias, no covalentes. El dominio de unión al antígeno formado por las RDC colocadas define una superficie complementaria al epítipo sobre el antígeno inmunorreactivo. Esta superficie complementaria promueve la unión no covalente del anticuerpo a su epítipo cognado. Los aminoácidos que comprenden las RDC y las regiones marco conservadas, respectivamente, pueden ser fácilmente identificadas para cualquier dominio variable de la cadena pesada o ligera dado por un experto en la materia, ya que han sido definidas con precisión (véase más adelante).

En el caso en el que haya dos o más definiciones de un término que se usa y/o está aceptado dentro de la materia, la definición del término como se usa en el presente documento tiene por objeto incluir todos los significados, a menos que se indique explícitamente lo contrario. Un ejemplo específico es el uso del término "región determinante de la complementariedad" ("RDC") para describir los sitios de combinación de antígenos no contiguos encontrados dentro de la región variable de tanto polipéptidos de cadena pesada como ligera. Esta región particular ha sido descrita por Kabat y col. (1983) U.S. Dept. of Health and Human Services, "Sequences of Proteins of Immunological Interest" y por Chothia y Lesk, J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987), en el que las definiciones incluyen solapamientos o subconjuntos de restos de aminoácidos cuando se comparan entre sí. No obstante, la aplicación de cualquier definición para referirse a una RDC de un anticuerpo o variantes del mismo tiene por objeto estar dentro del ámbito del término que se define y se usa en el presente documento. Los restos de aminoácidos apropiados que abarcan las RDC como se define por cada una de las referencias anteriormente citadas se exponen a continuación en la Tabla 1 como una comparación. Los números exactos de restos que abarcan una RDC particular variarán dependiendo de la secuencia y el tamaño de la RDC. Los expertos en la materia pueden determinar rutinariamente qué restos comprenden una RDC particular dada la secuencia de aminoácidos de la región variable del anticuerpo.

Tabla 1. Definiciones de RDC¹

	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

¹La numeración de todas las definiciones de RDC en la Tabla 1 es según los convenios de numeración expuestos por Kabat y col. (véase más adelante).

Kabat y col. también definieron un sistema de numeración para secuencias del dominio variable que es aplicable a cualquier anticuerpo. Un experto en la materia puede asignar inequívocamente este sistema de "numeración de Kabat" a cualquier secuencia del dominio variable, sin depender de ningún dato experimental más allá de la propia secuencia. Como se usa en el presente documento, "numeración de Kabat" se refiere al sistema de numeración expuesto por Kabat y col. (1983) U.S. Dept. of Health and Human Services, "Sequences of Proteins of Immunological Interest". A menos que se especifique lo contrario, las referencias a la numeración de las posiciones de restos aminoácidos específicos en un anticuerpo anti-SEMA4D o fragmento de unión al antígeno, variante, o derivado del mismo, de la presente divulgación son según el sistema de numeración de Kabat.

Anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno, variantes, o derivados del mismo de la divulgación incluyen, entre otros, anticuerpos policlonales, monoclonales, multispecíficos, biespecíficos, anticuerpos humanos, humanizados, primatizados o quiméricos, anticuerpos monocatenarios, fragmentos de unión al epítipo, p. ej., Fab, Fab' y F(ab')₂, Fd, Fvs, Fv monocatenarios (scFv), Fv unidos por disulfuro (sdFv), fragmentos que comprenden ya sea un dominio VL o VH, fragmentos producidos por una biblioteca de expresión de Fab, y anticuerpos antiidiotípicos (anti-Id) (incluyendo, p. ej., anticuerpos anti-Id para los anticuerpos anti-SEMA4D desvelados en el presente documento). Las moléculas de scFv son conocidas en la técnica y se describen, p. ej., en la patente de EE.UU. n.º 5.892.019. Las moléculas de inmunoglobulina o de anticuerpo de la divulgación pueden ser de cualquier tipo (p. ej., IgG, IgE, IgM, IgD, IgA, e IgY),

clase (p. ej., IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, e IgA2, etc.), o subclase de molécula de inmunoglobulina.

Como se usa en el presente documento, la expresión "porción de cadena pesada" incluye secuencias de aminoácidos derivadas de una cadena pesada de la inmunoglobulina. En ciertas realizaciones, un polipéptido que comprende una porción de cadena pesada comprende al menos uno de: un dominio VH, un dominio CH1, un dominio bisagra (p. ej., región bisagra superior, media y/o inferior), un dominio CH2, un dominio CH3, o una variante o fragmento de los mismos. Por ejemplo, un polipéptido de unión para su uso en la divulgación puede comprender una cadena de polipéptidos que comprende un dominio CH1; una cadena de polipéptidos que comprende un dominio CH1, al menos una porción de un dominio bisagra, y un dominio CH2; una cadena de polipéptidos que comprende un dominio CH1 y un dominio CH3; una cadena de polipéptidos que comprende un dominio CH1, al menos una porción de un dominio bisagra, y un dominio CH3, o una cadena de polipéptidos que comprende un dominio CH1, al menos una porción de un dominio bisagra, un dominio CH2, y un dominio CH3. En otra realización, un polipéptido de la divulgación comprende una cadena de polipéptidos que comprende un dominio CH3. Además, un polipéptido de unión para su uso en la divulgación puede carecer de al menos una porción de un dominio CH2 (p. ej., la totalidad o parte de un dominio CH2). Como se ha expuesto anteriormente, un experto en la materia entenderá que estos dominios (p. ej., las porciones de cadena pesada) pueden modificarse de forma que varíen en la secuencia de aminoácidos de la molécula de inmunoglobulina de origen natural.

En ciertos anticuerpos anti-SEMA4D, o fragmentos de unión al antígeno, variantes, o derivados de los mismos desvelados en el presente documento, las porciones de cadena pesada de una cadena de polipéptidos de un multímero son idénticas a aquellas en una segunda cadena de polipéptidos del multímero. Como alternativa, los monómeros que contienen una porción de cadena pesada de la divulgación no son idénticos. Por ejemplo, cada monómero puede comprender un sitio de unión diana diferente, formando, por ejemplo, un anticuerpo biespecífico. Un anticuerpo biespecífico es una proteína artificial que se compone de fragmentos de dos anticuerpos monoclonales diferentes y, en consecuencia, se une a dos tipos diferentes de antígeno. Las variaciones en el formato de anticuerpo biespecífico se contemplan dentro del alcance de la presente divulgación. Los anticuerpos biespecíficos pueden generarse usando técnicas que son bien conocidas en la materia, por ejemplo, véase, por ejemplo, Ghayur y col., *Expert Review of Clinical Pharmacology* 3.4 (julio de 2010): p491; Lu y col., *J. Biological Chemistry* Vol. 280, núm. 20, pág. 19665-19672 (2005); Marvin y col., *Acta Pharmacologica Sinica* 26 (6): 649-658 (2005); y Milstein C y col., *Nature* 1983; 305: 537-40; 30 Brennan M y col., *Science* 1985; 229: 81-3; Thakur y col., *Curr Opin Mol Ther.* Junio de 2010; 12 (3): 340-9; y la Publicación de Patente de EE.UU. N.º 2007/0004909.

Las porciones de cadena pesada de una molécula de unión para su uso en los procedimientos desvelados en el presente documento pueden derivar de diferentes moléculas de inmunoglobulina. Por ejemplo, una porción de cadena pesada de un polipéptido puede comprender un dominio C_{H1} derivado de una molécula de IgG1 y una región bisagra derivada de una molécula de IgG3. En otro ejemplo, una porción de cadena pesada puede comprender una región bisagra derivada, en parte, de una molécula de IgG1 y, en parte, de una molécula de IgG3. En otro ejemplo, una porción de cadena pesada puede comprender una bisagra quimérica derivada, en parte, de una molécula de IgG1 y, en parte, de una molécula de IgG4.

Como se usa en el presente documento, la expresión "porción de cadena ligera" incluye secuencias de aminoácidos derivadas de una cadena ligera de la inmunoglobulina, p. ej., una cadena ligera kappa o lambda. En determinados aspectos, la porción de cadena ligera comprende al menos uno de un dominio VL o CL.

Anticuerpos anti-SEMA4D, o fragmentos de unión al antígeno, variantes, o derivados de los mismos desvelados en el presente documento pueden describirse o especificarse en términos del (de los) epítipo(s) o porción(es) de un antígeno, p. ej., un polipéptido diana desvelado en el presente documento (p. ej., SEMA4D) que reconocen o al que se unen específicamente. La porción de un polipéptido diana que interacciona específicamente con el dominio de unión al antígeno de un anticuerpo es un "epítipo", o un "determinante antigénico". Un polipéptido diana puede comprender un único epítipo, pero normalmente comprende al menos dos epítopos, y puede incluir cualquier número de epítopos, dependiendo del tamaño, conformación y tipo de antígeno. Además, debe observarse que un "epítipo" sobre un polipéptido diana puede ser o puede incluir elementos no polipeptídicos, p. ej., un epítipo puede incluir una cadena lateral de carbohidrato.

Se cree que el tamaño mínimo de un epítipo de péptido o polipéptido para un anticuerpo tiene aproximadamente cuatro a cinco aminoácidos. Los epítopos de péptido o polipéptido pueden contener al menos siete, al menos nueve y, en algunos casos, entre al menos aproximadamente 15 y aproximadamente 30 aminoácidos. Ya que una RDC puede reconocer un péptido o polipéptido antigénico en su forma terciaria, los aminoácidos que comprenden un epítipo no necesitan ser contiguos, y en algunos casos, incluso pueden no estar en la misma cadena de péptido. Un epítipo de péptido o polipéptido reconocido por los anticuerpos anti-SEMA4D de la presente divulgación puede contener una secuencia de al menos 4, al menos 5, al menos 6, al menos 7, al menos 8, al menos 9, al menos 10, al menos 15, al menos 20, al menos 25, o entre aproximadamente 15 y aproximadamente 30 aminoácidos contiguos o no contiguos de SEMA4D.

Por "se une específicamente a" significa generalmente que un anticuerpo se une a un epítipo mediante su dominio de unión al antígeno, y que la unión implica una determinada complementariedad entre el dominio de unión al antígeno y el epítipo. Según esta definición, se dice que un anticuerpo "se une específicamente" a un epítipo cuando se une

a ese epítipo, mediante su dominio de unión al antígeno más fácilmente de lo que se uniría a un epítipo no relacionado aleatorio. El término "especificidad" se usa en el presente documento para limitar la afinidad relativa por la que un cierto anticuerpo se une a un cierto epítipo. Por ejemplo, puede considerarse que el anticuerpo "A" tiene una especificidad o afinidad más alta para un epítipo dado que el anticuerpo "B", o puede decirse que el anticuerpo "A" se une al epítipo "C" con una especificidad o afinidad más alta que la que tiene para el epítipo "D" relacionado.

Por "se une preferentemente", significa que el anticuerpo se une específicamente a un epítipo más fácilmente de lo que se uniría a un epítipo relacionado, similar, homólogo, o análogo. De este modo, un anticuerpo que "se une preferentemente" a un epítipo dado se uniría más probablemente a ese epítipo que a un epítipo relacionado, incluso cuando tal anticuerpo puede reaccionar de forma cruzada con el epítipo relacionado.

A modo de ejemplo no limitativo, puede considerarse que un anticuerpo se une a un primer epítipo preferentemente si se une a dicho primer epítipo con una constante de disociación (K_D) que es inferior a la K_D del anticuerpo para el segundo epítipo. En otro ejemplo no limitativo, puede considerarse que un anticuerpo se une a un primer antígeno preferentemente si se une al primer epítipo con una afinidad que es al menos un orden de magnitud inferior a la K_D del anticuerpo para el segundo epítipo. En otro ejemplo no limitativo, puede considerarse que un anticuerpo se une a un primer epítipo preferentemente si se une al primer epítipo con una afinidad que es al menos dos órdenes de magnitud inferior a la K_D del anticuerpo para el segundo epítipo.

En otro ejemplo no limitativo, puede considerarse que un anticuerpo se une a un primer epítipo preferentemente si se une al primer epítipo con una constante de disociación ($k(\text{dis})$) que es inferior a la ($k(\text{dis})$) del anticuerpo para el segundo epítipo. En otro ejemplo no limitativo, puede considerarse que un anticuerpo se une a un primer epítipo preferentemente si se une al primer epítipo con una afinidad que es al menos un orden de magnitud inferior a la ($k(\text{dis})$) del anticuerpo para el segundo epítipo. En otro ejemplo no limitativo, puede considerarse que un anticuerpo se une a un primer epítipo preferentemente si se une al primer epítipo con una afinidad que es al menos dos órdenes de magnitud inferior a la ($k(\text{dis})$) del anticuerpo para el segundo epítipo.

Se dice que un anticuerpo inhibe competitivamente la unión de un anticuerpo de referencia a un epítipo dado si se une preferencialmente a ese epítipo hasta el punto que bloquee, en cierta medida, la unión del anticuerpo de referencia al epítipo. La inhibición competitiva puede determinarse por cualquier procedimiento conocido en la técnica, por ejemplo, ensayos de ELISA de competición. Puede decirse que un anticuerpo inhibe competitivamente la unión del anticuerpo de referencia a un epítipo dado en al menos 90 %, al menos 80 %, al menos 70 %, al menos 60 % o al menos 50 %.

Como se usa en el presente documento, el término "afinidad" se refiere a una medida de la resistencia de la unión de un epítipo individual con la RDC de una molécula de inmunoglobulina. Véase, p. ej., Harlow y col. (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2ª ed.) páginas 27-28. Como se usa en el presente documento, el término "avidez" se refiere a la estabilidad total del complejo entre una población de inmunoglobulinas y un antígeno, es decir, la resistencia de combinación funcional de una mezcla de inmunoglobulinas con el antígeno. Véase, p. ej., Harlow en las páginas 29-34. La avidez está relacionada tanto con la afinidad de moléculas de inmunoglobulina individuales en la población con epítipos específicos, como también las valencias de las inmunoglobulinas y el antígeno. Por ejemplo, la interacción entre un anticuerpo monoclonal bivalente y un antígeno con una estructura de epítipo altamente repetitiva, tal como un polímero, sería una de alta avidez.

Los anticuerpos anti-SEMA4D o fragmentos de unión al antígeno, variantes, o derivados de los mismos de la divulgación también pueden describirse o especificarse en términos de su reactividad cruzada. Como se usa en el presente documento, el término "reactividad cruzada" se refiere a la capacidad de un anticuerpo, específico para un antígeno, para reaccionar con un segundo antígeno; una medida de conexión entre dos sustancias antigénicas diferentes. De este modo, un anticuerpo es reactivo de forma cruzada si se une a un epítipo distinto del que indujo su formación. El epítipo reactivo de forma cruzada contiene generalmente muchas de las mismas características estructurales complementarias al igual que el epítipo inductor, y en algunos casos, puede en realidad adaptarse mejor que el original.

Por ejemplo, ciertos anticuerpos tienen un determinado grado de reactividad cruzada, porque se unen a epítipos relacionados, pero no idénticos, p. ej., epítipos con al menos 95 %, al menos 90 %, al menos 85 %, al menos 80 %, al menos 75 %, al menos 70 %, al menos 65 %, al menos 60 %, al menos 55 %, y al menos 50 % de identidad (como se calcula usando procedimientos conocidos en la técnica y descritos en el presente documento) con un epítipo de referencia. Puede decirse que un anticuerpo tiene poca o ninguna reactividad cruzada si no se une a epítipos con menos de 95 %, menos de 90 %, menos de 85 %, menos de 80 %, menos de 75 %, menos de 70 %, menos de 65 %, menos de 60 %, menos de 55 %, y menos de 50 % de identidad (como se calcula usando procedimientos conocidos en la técnica y descritos en el presente documento) con un epítipo de referencia. Un anticuerpo puede ser considerado "altamente específico" para un cierto epítipo, si no se une a ningún otro análogo, ortólogo, u homólogo de ese epítipo.

Las moléculas de unión anti-SEMA4D, p. ej., anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno, variantes o derivados de los mismos, de la divulgación también pueden describirse o especificarse en términos de su afinidad de unión a un polipéptido de la divulgación, p. ej., SEMA4D, p. ej., anticuerpos humanos, murina, o tanto humana como murina SEMA4D. En ciertos aspectos, las afinidades de unión incluyen aquellas con una constante de disociación o K_D inferior

a 5×10^{-2} M, 10^{-2} M, 5×10^{-3} M, 10^{-3} M, 5×10^{-4} M, 10^{-4} M, 5×10^{-5} M, 10^{-5} M, 5×10^{-6} M, 10^{-6} M, 5×10^{-7} M, 10^{-7} M, 5×10^{-8} M, 10^{-8} M, 5×10^{-9} M, 10^{-9} M, 5×10^{-10} M, 10^{-10} M, 5×10^{-11} M, 10^{-11} M, 5×10^{-12} M, 10^{-12} M, 5×10^{-13} M, 10^{-13} M, 5×10^{-14} M, 10^{-14} M, 5×10^{-15} M, o 10^{-15} M. En ciertas realizaciones, la molécula de unión anti-SEMA4D, p. ej., un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo, de la divulgación se une a SEMA4D humana con una Kd de aproximadamente 5×10^{-9} a aproximadamente 6×10^{-9} . En otra realización, la molécula de unión anti-SEMA4D, p. ej., un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo, de la divulgación se une a SEMA4D murina con una Kd de aproximadamente 1×10^{-9} a aproximadamente 2×10^{-9} .

Como se usa en el presente documento, se mantendrá que el término "anticuerpo quimérico" significa cualquier anticuerpo en el que la región inmunorreactiva o sitio se obtiene o deriva de una primera especie y la región constante (que puede estar intacta, parcial o modificada) se obtiene de una segunda especie. En algunas realizaciones, la región de unión diana o sitio será de una fuente no humana (p. ej., ratón o primate) y la región constante es humana.

Como se usa en el presente documento, la expresión "anticuerpo genomanipulado" se refiere a un anticuerpo en el que el dominio variable en cualquiera de la cadena pesada o ligera o ambas está alterado por un reemplazo al menos parcial de una o más RDC de un anticuerpo de especificidad conocida y, si es necesario, por reemplazo de la región marco conservada parcial y cambio de secuencia. Aunque las RDC pueden derivarse de un anticuerpo de la misma clase o incluso subclase que el anticuerpo del que se derivan las regiones marco conservadas, se prevé que las RDC se deriven de un anticuerpo de clase diferente y de un anticuerpo de una especie diferente. Un anticuerpo genomanipulado en el que una o más RDC "donantes" de un anticuerpo no humano de especificidad conocida se injertan en una región marco conservada de la cadena pesada o ligera humana se denomina en el presente documento "anticuerpo humanizado". En determinados aspectos, no es necesario reemplazar todas las RDC con las RDC completas del dominio variable del donante para transferir la capacidad de unión al antígeno de un dominio variable a otro. Más bien, se puede transferir solo aquellos restos que son necesarios para mantener la actividad del sitio de unión a diana.

Se reconoce además que las regiones marco conservadas dentro del dominio variable en una cadena pesada o ligera, o ambas, de un anticuerpo humanizado pueden comprender únicamente restos de origen humano, en cuyo caso estas regiones marco conservadas del anticuerpo humanizado se denominan "regiones marco conservadas completamente humanas" (por ejemplo, MAb XV15/2503, desvelado en la publicación de solicitud de patente de EE. UU. n.º US 2010/0285036 A1 como AM 2503). Como alternativa, uno o más restos de la(s) región(es) marco conservada(s) del dominio variable del donante pueden genomanipularse en la posición correspondiente de la(s) región(es) marco conservada(s) de un dominio variable en una cadena pesada o ligera, o ambas, de un anticuerpo humanizado si fuera necesario para mantener la unión apropiada o para mejorar la unión al antígeno SEMA4D. Una región marco conservada humana que ha sido genomanipulada de esta manera comprendería por tanto una mezcla de restos de la región marco conservada humanos y de donante, y se denomina en el presente documento "región marco conservada parcialmente humana".

Por ejemplo, la humanización de un anticuerpo anti-SEMA4D puede realizarse esencialmente siguiendo el procedimiento de Winter y colaboradores (Jones y col., Nature 321:522-525 (1986); Riechmann y col., Nature 332:323-327 (1988); Verhoeyen y col., Science 239:1534-1536 (1988)), sustituyendo RDC de roedor o de roedor mutante o secuencias de RDC con las secuencias correspondientes de un anticuerpo anti-SEMA4D humano. Véanse también las patentes de EE. UU. n.º 5.225.539; 5.585.089; 5.693.761; 5.693.762; 5.859.205. El anticuerpo anti-SEMA4D humanizado resultante comprendería al menos una RDC de roedor o de roedor mutante dentro de las regiones marco conservadas completamente humanas del dominio variable de la cadena pesada y/o ligera del anticuerpo humanizado. En algunos casos, restos dentro de las regiones marco conservadas de uno o más dominios variables del anticuerpo anti-SEMA4D humanizado están sustituidos con restos no humanos correspondientes (por ejemplo, de roedor) (véanse, por ejemplo, las patentes de EE. UU. n.º 5.585.089; 5.693.761; 5.693.762; y 6.180.370), en cuyo caso el anticuerpo anti-SEMA4D humanizado resultante comprendería regiones marco conservadas parcialmente humanas dentro del dominio variable de la cadena pesada y/o ligera. Se pueden usar procedimientos similares para la humanización de un anticuerpo anti-VEGF.

Además, los anticuerpos humanizados pueden comprender restos que no se encuentran en el anticuerpo receptor o en el anticuerpo donante. Estas modificaciones se hacen para refinar aún más el rendimiento del anticuerpo (p. ej., para obtener afinidad deseada). En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente la totalidad de al menos uno, y normalmente dos, dominios variables, en los que la totalidad o sustancialmente la totalidad de las RDC se corresponden con las de una inmunoglobulina no humana y la totalidad o sustancialmente la totalidad de las regiones marco conservadas son las de una secuencia de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado comprenderá también opcionalmente al menos una porción de una región constante de la inmunoglobulina (Fc), normalmente la de una inmunoglobulina humana. Para más detalles, véanse Jones y col., Nature 331:522-525 (1986); Riechmann y col., Nature 332:323-329 (1988); y Presta, Curr. Op. Struct. Biol. 2:593-596 (1992). En consecuencia, tales anticuerpos "humanizados" pueden incluir anticuerpos en los que sustancialmente menos de un dominio variable humano intacto ha sido sustituido con la secuencia correspondiente de una especie no humana. En la práctica, los anticuerpos humanizados son normalmente anticuerpos humanos en los que algunos restos de RDC y posiblemente algunos restos de la región marco conservada están sustituidos con restos de sitios análogos en anticuerpos de roedor. Véanse, por ejemplo, las patentes de EE. UU. n.º 5.225.539; 5.585.089; 5.693.761; 5.693.762; 5.859.205. Véanse también la patente de EE. UU. n.º 6.180.370 y la publicación internacional n.º WO 01/27160, en la se desvelan

anticuerpos humanizados y técnicas para producir anticuerpos humanizados que tienen afinidad mejorada para un antígeno predeterminado.

II. Descripción de polipéptidos diana – SEMA4D

5 Como se usa en el presente documento, los términos "semaforina-4D", "SEMA4D" y "polipéptido SEMA4D" se usan indistintamente, como son "SEMA4D" y "Sema4D". En ciertas realizaciones, SEMA4D es expresada sobre la superficie de o es secretada por una célula. En otra realización, SEMA4D está unida a una membrana. En otras realizaciones, SEMA4D es soluble, p. ej., SEMA4Ds. En otras realizaciones, SEMA4D puede incluir una SEMA4D de tamaño completo o un fragmento del mismo, o un polipéptido de variante SEMA4D, en el que el fragmento de SEMA4D o polipéptido de variante SEMA4D retiene alguna o todas las propiedades funcionales de SEMA4D de tamaño completo.

10 La proteína humana SEMA4D de tamaño completo es una proteína transmembrana homodimérica que consiste en dos cadenas de polipéptidos de 150 kDa. SEMA4D pertenece a la familia de la semaforina de los receptores de la superficie celular y también se denomina CD100. Tanto SEMA4D/Sema4D humana como de ratón son escindidas proteolíticamente de su forma transmembrana para generar formas solubles de 120 kDa, lo que da lugar a dos isoformas de Sema4D (Kumanogoh y col., *J. Cell Science* 116(7):3464 (2003)). Las semaforinas consisten en proteínas solubles y unidas a membrana que fueron originalmente definidas como factores de guía axonal que desempeñan un papel importante en el establecimiento de conexiones precisas entre neuronas y su diana apropiada. Estructuralmente considerada una semaforina de clase IV, la SEMA4D consiste en una secuencia señal del extremo amino-terminal seguida de un dominio "Sema" característico, que contiene 17 restos de cisteína conservados, un dominio similar a Ig, un tramo rico en lisina, una región transmembrana hidrófoba, y una cola citoplásmica.

20 El polipéptido SEMA4D incluye una secuencia señal de aproximadamente 13 aminoácidos seguida por un dominio de semaforina de aproximadamente 512 aminoácidos, un dominio similar a inmunoglobulina (similar a Ig) de aproximadamente 65 aminoácidos, un tramo rico en lisina de 104 aminoácidos, una región transmembrana hidrófoba de aproximadamente 19 aminoácidos, y una cola citoplásmica de 110 aminoácidos. Un sitio consenso para la fosforilación de tirosina en la cola citoplásmica soporta la asociación prevista de SEMA4D con una tirosina quinasa (Schlossman, y col., Eds. (1995) *Leucocyte Typing V* (Oxford University Press, Oxford).

30 Se sabe que SEMA4D tiene al menos tres receptores funcionales, plexina-B1, plexina-B2 y CD72. Plexina-B1, se expresa en tejidos no linfoides y se ha mostrado que es un receptor de alta afinidad (1 nM) para SEMA4D (Tamagnone y col., *Cell* 99:71-80 (1999)). Se ha mostrado que la estimulación por SEMA4D de la señalización de plexina-B1 induce el colapso del cono de crecimiento de neuronas, e induce el colapso de la extensión del proceso y la apoptosis de oligodendrocitos (Giraudon y col., *J. Immunol.* 172:1246-1255 (2004); Giraudon y col., *NeuroMolecular Med.* 7:207-216 (2005)). Después de la unión a SEMA4D, la señalización de plexina-B1 media en la inactivación de R-Ras, dando lugar a una disminución en la fijación mediada por integrina a la matriz extracelular, así como a la activación de RhoA, dando lugar a un colapso celular por la reorganización del citoesqueleto. Véase Kruger y col., *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 6:789-800 (2005); Pasterkamp, *TRENDS in Cell Biology* 15:61-64 (2005)). La plexina-B2 tiene una afinidad intermedia con SEMA4D un informe reciente indica que la PLXNB2 se expresa en queratinocitos y activa los linfocitos T $\gamma\delta$ positivos en SEMA4D para contribuir a la reparación epitelial (Witherden y col., *Immunity.* 24 de agosto de 2012; 37(2):314-25).

40 En tejidos linfoides se usa CD72 como un receptor de baja afinidad (300 nM) de SEMA4D (Kumanogoh y col., *Immunity* 13:621-631 (2000)). Los linfocitos B y las células presentadoras de antígeno (CPA) expresan CD72, y los anticuerpos anti-CD72 tienen muchos de los mismos efectos que SEMA4Ds, tales como el potenciamiento de las respuestas de linfocitos B inducidas por CD40 y la liberación de linfocitos B de CD23. Se cree que CD72 actúa como regulador negativo de las respuestas de linfocitos B reclutando la tirosina fosfatasa SHP-1, que puede asociarse con muchos receptores inhibidores. La interacción de SEMA4D con CD72 da como resultado la disociación de SHP-1, y la pérdida de esta señal de activación negativa. Se ha demostrado que SEMA4D promueve la estimulación de linfocitos T y la agregación de linfocitos B y la supervivencia *in vitro*. La adición de células que expresan SEMA4D o SEMA4Ds potencia la proliferación de linfocitos B inducida por CD40 y la producción de inmunoglobulina *in vitro*, y acelera las respuestas de anticuerpos *in vivo* (Ishida y col., *Inter. Immunol.* 15:1027-1034 (2003); Kumanogoh y H. Kikutani, *Trends in Immunol.* 22:670-676 (2001)). La SEMA4Ds potencia la maduración inducida por CD40 de CD, que incluye la regulación positiva de moléculas coestimuladoras y el aumento de la secreción de IL-12. Además, SEMA4Ds puede inhibir la migración de células inmunitarias, que puede invertirse mediante la adición de anticuerpos de bloqueo anti-SEMA4D de ratón (Elhabazi y col., *J. Immunol.* 166:4341-4347 (2001); Delaire y col., *J. Immunol.* 166:4348-4354 (2001)).

55 Sema4D se expresa a altos niveles en órganos linfoides, que incluyen el bazo, timo y ganglios linfáticos, y en órganos no linfoides, tales como el cerebro, corazón y riñón. En órganos linfoides, Sema4D se expresa abundantemente en linfocitos T en reposo, pero solo se expresa débilmente en linfocitos B en reposo y células presentadoras de antígenos (CPA), tales como células dendríticas (CD).

La activación celular aumenta la expresión superficial de SEMA4D, así como la generación de SEMA4D soluble (SEMA4Ds). El patrón de expresión de SEMA4D sugiere que desempeña un papel fisiológico importante, así como patológico en el sistema inmunitario. Se ha mostrado que SEMA4D promueve la activación, agregación y

supervivencia de linfocitos B; potencia la proliferación inducida por CD40 y la producción de anticuerpos; potencia la respuesta de anticuerpos a antígenos dependientes de linfocitos T; aumenta la proliferación de linfocitos T; potencia la maduración de células dendríticas y la capacidad para estimular linfocitos T; y está directamente implicada en la desmielinización y degeneración axonal (Shi y col., *Immunity* 13:633-642 (2000); Kumanogoh y col., *J Immunol* 169:1175-1181 (2002); y Watanabe y col., *J Immunol* 167:4321-4328 (2001)).

Los ratones nuligénicos SEMA4D (SEMA4D^{-/-}) han proporcionado evidencia adicional de que SEMA4D desempeña un papel importante tanto en las respuestas inmunitarias humorales como celulares. No se conocen anomalías importantes de tejidos no linfoides en ratones SEMA4D^{-/-}. Las células dendríticas (CD) de los ratones SEMA4D^{-/-} tienen una capacidad aloestimulante deficiente y muestran defectos en la expresión de moléculas coestimuladoras, que pueden ser rescatadas mediante la adición de SEMA4Ds. Los ratones deficientes en SEMA4D (SEMA4D^{-/-}) dejan de desarrollar encefalitis autoinmunitaria experimental inducida por el péptido de glicoproteína de oligodendrocito de mielina, puesto que los linfocitos T específicos de la glicoproteína de oligodendrocito de mielina son deficientemente generados en ausencia de SEMA4D (Kumanogoh y col., *J Immunol* 169:1175-1181 (2002)). También se detecta una cantidad significativa de SEMA4D soluble en los sueros de ratones MRL/lpr propensos a la autoinmunidad (modelo de enfermedades autoinmunitarias sistémicas tales como LES), pero no en ratones normales. Además, los niveles de SEMA4Ds se correlacionan con niveles de auto-anticuerpos y aumentan con la edad (Wang y col., *Blood* 97:3498-3504 (2001)). También se ha mostrado que SEMA4D soluble se acumula en el líquido cefalorraquídeo y los sueros de pacientes con enfermedad desmielinizante, y SEMA4Ds induce la apoptosis de precursores neurales pluripotentes humanos (células de Dev), e inhibe tanto la extensión del proceso como induce la apoptosis de oligodendrocitos de rata *in vitro* (Giraudon y col., *J Immunol* 172(2):1246-1255 (2004)). Esta apoptosis fue bloqueada por un anticuerpo monoclonal (AM) anti-SEMA4D.

III. Anticuerpos anti-SEMA4D

Los anticuerpos anti-SEMA4D y los fragmentos de unión a antígeno de los mismos para su uso de acuerdo con la invención se definen en las reivindicaciones adjuntas.

Se han descrito en la materia anticuerpos que se unen a SEMA4D. Véanse, por ejemplo, la patente de EE.UU. N.º 8.496.938, las publicaciones estadounidenses n.º 2008/0219971 A1, US 2010/0285036 A1, y US 2006/0233793 A1, las solicitudes de patente internacional WO 93/14125, WO 2008/100995, y WO 2010/129917, y Herold y col., *Int. Immunol.* 7(1): 1-8 (1995).

La divulgación generalmente se refiere a un procedimiento de inhibir, retardar o reducir el crecimiento tumoral o la metástasis en un sujeto, p. ej., un paciente humano de cáncer, que comprende la administración de un anticuerpo que se une específicamente a SEMA4D, o un fragmento de unión al antígeno, variante o derivado del mismo. En ciertas realizaciones, el anticuerpo bloquea la interacción de SEMA4D con uno o más de sus receptores, p. ej., plexina-B1 y/o Plexina-B2. En determinadas realizaciones, las células cancerosas expresan Plexina-B1 y/o Plexina-B2. Los anticuerpos anti-SEMA4D que tienen estas propiedades pueden usarse en los procedimientos proporcionados en el presente documento. Los anticuerpos que pueden usarse incluyen, entre otros, AM VX15/2503, 67, 76, 2282 y fragmentos de unión al antígeno, variantes, o derivados de los mismos que se describen completamente en el documento US 2010/0285036 A1 y en el documento US 2008/02 19971 A1. Anticuerpos adicionales que pueden usarse en los procedimientos desvelados en el presente documento incluyen el anticuerpo BD16 descrito en el documento US 2006/0233793 A1, así como fragmentos de unión al antígeno, variantes o derivados de los mismos; o cualquiera de AM 301, AM 1893, AM 657, AM 1807, AM 1656, AM 1808, AM 59, AM 2191, AM 2274, AM 2275, AM 2276, AM 2277, AM 2278, AM 2279, AM 2280, AM 2281, AM 2282, AM 2283, AM 2284, y AM 2285, así como cualquier fragmento, variante o derivado de los mismos como se describen en el documento US 2008/0219971 A1. En ciertas realizaciones, un anticuerpo anti-SEMA4D para su uso en los procedimientos proporcionados en el presente documento se une a anticuerpos humanos, murina, o tanto humana como murina SEMA4D. También son útiles anticuerpos que se unen al mismo epítipo como cualquiera de los anticuerpos mencionados anteriormente y/o anticuerpos que inhiben competitivamente la unión o la actividad de cualquiera de los anticuerpos mencionados anteriormente.

En ciertas realizaciones, un anticuerpo anti-SEMA4D o fragmento de unión al antígeno, variante o derivado del mismo útil en los procedimientos desvelados en el presente documento tiene una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente 80 %, aproximadamente 85 %, aproximadamente 88 %, aproximadamente 89 %, aproximadamente 90 %, aproximadamente 91 %, aproximadamente 92 %, aproximadamente 93 %, aproximadamente 94 %, o aproximadamente 95 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos para una molécula de anticuerpo anti-SEMA4D de referencia, por ejemplo aquellos descritos anteriormente. En una realización adicional, la molécula de unión comparte al menos aproximadamente 96 %, aproximadamente 97 %, aproximadamente 98 %, aproximadamente 99 %, o 100 % de identidad de secuencia con un anticuerpo de referencia.

En otra realización, un anticuerpo anti-SEMA4D o fragmento de unión al antígeno, variante o derivado del mismo útil en los procedimientos desvelados en el presente documento comprende, consiste esencialmente en, o consiste en un dominio variable de la cadena pesada de inmunoglobulina (dominio VH), en la que al menos una de las RDC del dominio VH tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente 80 %, aproximadamente 85 %, aproximadamente 90 %, aproximadamente 95 %, aproximadamente 96 %, aproximadamente 97 %, aproximadamente

98 %, aproximadamente 99 %, o idéntica a CDR1, CDR2 o CDR3 de SEQ ID NO: 9, 10, 25 o 48.

5 En otra realización, un anticuerpo anti-SEMA4D o fragmento de unión al antígeno, variante o derivado del mismo útil en los procedimientos desvelados en el presente documento comprende, consiste esencialmente en, o consiste en un dominio variable de la cadena pesada de inmunoglobulina (dominio VH), en la que al menos una de las RDC del dominio VH tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente 80 %, aproximadamente 85 %, aproximadamente 90 %, aproximadamente 95 %, aproximadamente 96 %, aproximadamente 97 %, aproximadamente 98 %, aproximadamente 99 %, o idéntica a SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27 o SEQ ID NO: 28.

10 En otra realización, un anticuerpo anti-SEMA4D o fragmento de unión al antígeno, variante o derivado del mismo útil en los procedimientos desvelados en el presente documento comprende, consiste esencialmente en, o consiste en un dominio variable de la cadena pesada de inmunoglobulina (dominio VH), en la que al menos una de las RDC del dominio VH tiene una secuencia de aminoácidos idéntica, excepto para 1, 2, 3, 4 o 5 sustituciones de aminoácidos conservadas, con SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27 o SEQ ID NO: 28.

15 En otra realización, un anticuerpo anti-SEMA4D o fragmento de unión al antígeno, variante o derivado del mismo útil en los procedimientos desvelados en el presente documento comprende, consiste esencialmente en, o consiste en un dominio VH que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente 80 %, aproximadamente 85 %, aproximadamente 90 %, aproximadamente 91 %, aproximadamente 92 %, aproximadamente 93 %, aproximadamente 94 %, aproximadamente 95 %, aproximadamente 96 %, aproximadamente 97 %, aproximadamente 98 %, aproximadamente 99 % o 100 % idéntica a SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 25 o SEQ ID NO: 48, en la que el anticuerpo anti-SEMA4D que comprende el dominio VH codificado se une específicamente o preferentemente a SEMA4D.

20 En otra realización, un anticuerpo anti-SEMA4D o fragmento de unión al antígeno, variante o derivado del mismo útil en los procedimientos desvelados en el presente documento comprende, consiste esencialmente en, o consiste en un dominio variable de la cadena ligera de inmunoglobulina (dominio VL), en la que al menos una de las RDC del dominio VL tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente 80 %, aproximadamente 85 %, aproximadamente 90 %, aproximadamente 95 %, aproximadamente 96 %, aproximadamente 97 %, aproximadamente 98 %, aproximadamente 99 %, o idéntica a CDR1, CDR2 o CDR3 de SEQ ID NO: 17, 18, 29 o 47.

25 En otra realización, un anticuerpo anti-SEMA4D o fragmento de unión al antígeno, variante o derivado del mismo útil en los procedimientos desvelados en el presente documento comprende, consiste esencialmente en, o consiste en un dominio variable de la cadena ligera de inmunoglobulina (dominio VL), en la que al menos una de las RDC del dominio VL tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente 80 %, aproximadamente 85 %, aproximadamente 90 %, aproximadamente 95 %, aproximadamente 96 %, aproximadamente 97 %, aproximadamente 98 %, aproximadamente 99 %, o idéntica a SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31 o SEQ ID NO: 32.

30 En otra realización, un anticuerpo anti-SEMA4D o fragmento de unión al antígeno, variante o derivado del mismo útil en los procedimientos desvelados en el presente documento comprende, consiste esencialmente en, o consiste en un dominio variable de la cadena ligera de inmunoglobulina (dominio VL), en la que al menos una de las RDC del dominio VL tiene una secuencia de aminoácidos idéntica, excepto para 1, 2, 3, 4 o 5 sustituciones de aminoácidos conservadas, con SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31 o SEQ ID NO: 32.

35 En una realización adicional, un anticuerpo anti-SEMA4D o fragmento de unión al antígeno, variante o derivado del mismo útil en los procedimientos desvelados en el presente documento comprende, consiste esencialmente en, o consiste en un dominio VL que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente 80 %, aproximadamente 85 %, aproximadamente 90 %, aproximadamente 91 %, aproximadamente 92 %, aproximadamente 93 %, aproximadamente 94 %, aproximadamente 95 %, aproximadamente 96 %, aproximadamente 97 %, aproximadamente 98 %, aproximadamente 99 % o 100 % idéntica a SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 29 o SEQ ID NO: 47, en la que el anticuerpo anti-SEMA4D que comprende el dominio VL codificado se une específicamente o preferentemente a SEMA4D.

40 También se incluyen para su uso en los procedimientos desvelados en el presente documento polinucleótidos que codifican anticuerpos anti-SEMA4D, o fragmentos de unión al antígeno, variantes, o derivados de los mismos descritos en el presente documento, polinucleótidos que codifican tales polipéptidos, vectores que comprenden tales polinucleótidos, y células huésped que comprenden tales vectores o polinucleótidos, todo ello para producir anticuerpos anti-SEMA4D, o fragmentos de unión al antígeno, variantes o derivados de los mismos para su uso en los procedimientos descritos en el presente documento.

45 Variantes biológicamente activas adecuadas de los anticuerpos anti-SEMA4D útiles en la divulgación pueden usarse en los procedimientos de la presente divulgación. Tales variantes retendrán las propiedades de unión deseadas del anticuerpo anti-SEMA4D parental. Procedimientos de producción de variantes de anticuerpo están generalmente disponibles en la técnica.

Procedimientos de mutagénesis y alteraciones de secuencias de nucleótidos son muy conocidos en la técnica.

Véanse, por ejemplo, Walker and Gastra, eds. (1983) *Techniques in Molecular Biology* (MacMillan Publishing Company, New York); Kunkel, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:488-492 (1985); Kunkel y col., *Methods Enzymol.* 154:367-382 (1987); Sambrook y col. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor, N.Y.); patente de EE.UU. n.º 4.873.192; y las referencias citadas en los mismos. La guía con respecto a sustituciones de aminoácidos apropiadas que no afectan la actividad biológica del polipéptido de interés pueden encontrarse en el modelo de Dayhoff y col. (1978) en *Atlas of Protein Sequence and Structure* (Natl. Biomed. Res. Found., Washington, D.C.), págs. 345-352. El modelo de Dayhoff y col. usa la matriz de similitud de aminoácidos de mutación puntual aceptada (MPA) (matriz MPA 250) para determinar sustituciones de aminoácidos conservadoras adecuadas. En determinados aspectos, se usan sustituciones conservadoras, tales como intercambio de un aminoácido con otro que tiene propiedades similares. Ejemplos de sustituciones de aminoácidos conservadoras como se enseñan por la matriz MPA 250 del modelo de Dayhoff y col., incluyen, entre otros, Gly↔Ala, Val↔Ile↔Leu, Asp↔Glu, Lys↔Arg, Asn↔Gln, y Phe↔Trp↔Tyr.

En la construcción de variantes de la molécula de unión a anti-SEMA4D, p. ej., un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo, polipéptidos de interés, se hacen modificaciones de manera que las variantes continúan poseyendo las propiedades deseadas, p. ej., son capaces de unirse específicamente a una SEMA4D, p. ej., anticuerpos humanos, murina, o tanto humana como murina SEMA4D, p. ej., expresada sobre la superficie de o secretada por una célula y que tiene actividad de bloqueo de SEMA4D, como se describe en el presente documento. En determinados aspectos, cualquier mutación realizada en el ADN que codifica el polipéptido de variante conserva el marco de lectura y no crea regiones complementarias que pudieran producir una estructura de ARNm secundaria. Véase la publicación de solicitud de patente EP n.º 75.444.

Procedimientos de medición de la especificidad de unión de la molécula de unión a anti-SEMA4D, p. ej., un anticuerpo, o un fragmento de unión al antígeno, variante o derivado del mismo, incluyen, entre otros, ensayos de unión competitiva convencionales, ensayos para controlar la secreción de inmunoglobulinas por linfocitos T o linfocitos B, ensayos de proliferación de linfocitos T, ensayos de apoptosis, ensayos de ELISA, y similares. Véanse, por ejemplo, tales ensayos desvelados en el documento WO 93/14125; Shi y col., *Immunity* 13:633-642 (2000); Kumanogoh y col., *J Immunol* 169:1175-1181 (2002); Watanabe y col., *J Immunol* 167:4321-4328 (2001); Wang y col., *Blood* 97:3498-3504 (2001); y Giraudon y col., *J Immunol* 172(2):1246-1255 (2004).

Los procedimientos para medir la capacidad antiangiogénica de un anticuerpo anti-SEMA4D o un fragmento de unión a antígeno, variante o derivado del mismo se conoce bien en la materia.

Cuando se discute en el presente documento si cualquier polipéptido particular, que incluye las regiones constantes, RDC, dominios VH, o dominios VL desvelados en el presente documento, es al menos aproximadamente 65 %, aproximadamente 70 %, aproximadamente 75 %, aproximadamente 80 %, aproximadamente 85 %, aproximadamente 90 %, aproximadamente 91 %, aproximadamente 92 %, aproximadamente 93 %, aproximadamente 94 %, aproximadamente 95 %, aproximadamente 96 %, aproximadamente 97 %, aproximadamente 98 %, aproximadamente 99 %, o incluso aproximadamente 100 % idéntico a otro polipéptido, el % de identidad puede determinarse usando procedimientos y programas informáticos/software conocidos en la técnica tales como, pero no se limitan a, el programa BESTFIT (Wisconsin Sequence Analysis Package, Versión 8 para Unix, Genetics Computer Group, University Research Park, 575 Science Drive, Madison, Wis. 53711). BESTFIT usa el algoritmo de homología local de Smith y Waterman (1981) *Adv. Appl. Math.* 2: 482-489, para encontrar el mejor segmento de homología entre dos secuencias. Cuando se usa BESTFIT o cualquier otro programa de alineamiento de secuencias para determinar si una secuencia particular es, por ejemplo, 95 % idéntica a una secuencia de referencia según la presente divulgación, los parámetros se establecen, por supuesto, de modo que el porcentaje de identidad se calcula sobre la longitud completa de la secuencia de polipéptidos de referencia y que se permiten huecos en la homología de hasta 5 % del número total de aminoácidos en la secuencia de referencia.

Para los fines de la presente divulgación, el porcentaje de identidad de secuencia puede determinarse usando el algoritmo de búsqueda de homología de Smith-Waterman usando una búsqueda de huecos afin con una penalización por apertura de hueco de 12 y una penalización por extensión de hueco de 2, matriz BLOSUM de 62. El algoritmo de búsqueda de homología de Smith-Waterman se enseña en Smith y Waterman (1981) *Adv. Appl. Math.* 2:482-489. Una variante puede, por ejemplo, diferenciarse de un anticuerpo anti-SEMA4D de referencia (p. ej., AM VX15/2503, 67, 76 o 2282) en tan solo 1 a 15 restos de aminoácidos, en tan solo 1 a 10 restos de aminoácidos, tales como 6-10, en tan solo 5, en tan solo 4, 3, 2, o incluso 1 resto de aminoácido.

La región constante de un anticuerpo anti-SEMA4D puede ser mutada para alterar la función efectora de varias formas. Por ejemplo, véanse la patente de EE.UU. n.º 6.737.056B1 y la publicación de solicitud de patente de EE. UU. n.º 2004/0132101A1, que desvelan mutaciones de Fc que optimizan la unión del anticuerpo a receptores de Fc.

En ciertos anticuerpos anti-SEMA4D, o fragmentos, variantes o derivados de los mismos útiles en los procedimientos proporcionados en el presente documento, la porción Fc puede ser mutada para reducir la función efectora usando técnicas conocidas en la técnica. Por ejemplo, la delección o inactivación (a través de mutaciones puntuales u otros medios) de un dominio de la región constante puede reducir la unión al receptor de Fc del anticuerpo modificado circulante aumentando así la localización tumoral. En otros casos, modificaciones de la región acorde con la presente divulgación moderan la unión del complemento y reducen por tanto la semivida en suero. Pueden usarse otras

modificaciones de la región constante para modificar los enlaces disulfuro o fracciones de oligosacárido que permiten la localización mejorada debido a la elevada especificidad por antígenos o flexibilidad del anticuerpo. El perfil fisiológico resultante, la biodisponibilidad y otros efectos bioquímicos de las modificaciones, tales como la localización del tumor, biodistribución y semivida en suero, pueden medirse y cuantificarse fácilmente usando técnicas inmunológicas muy conocidas sin experimentación indebida.

Los anticuerpos anti-SEMA4D para su uso en los procedimientos proporcionados en el presente documento incluyen derivados que se modifican, p. ej., por la unión covalente de cualquier tipo de molécula al anticuerpo de modo que la unión covalente no prevenga que el anticuerpo se una específicamente al epítipo cognado. Por ejemplo, pero no a modo de limitación, los derivados de anticuerpos incluyen anticuerpos que se han modificado, p. ej., mediante glicosilación, acetilación, pegilación, fosforilación, amidación, derivatización mediante grupos protectores/bloqueadores conocidos, escisión proteolítica, enlace a un ligando celular u otra proteína, etc. Cualquiera de las numerosas modificaciones químicas puede llevarse a cabo por técnicas conocidas, incluyendo, entre otros, escisiones químicas específicas, acetilación, formilación, etc. Adicionalmente, el derivado puede contener uno o más aminoácidos no clásicos.

Una "sustitución de aminoácidos conservadora" es una en la que el resto de aminoácido se reemplaza con un resto de aminoácido que tiene una cadena lateral con una carga similar. Familias de restos de aminoácidos que tienen cadenas laterales con cargas similares se han definido en la técnica. Estas familias incluyen aminoácidos con cadenas laterales básicas (p. ej., lisina, arginina, histidina), cadenas laterales ácidas (p. ej., ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales polares sin carga (p. ej., glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína), cadenas laterales no polares (p. ej., alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano), cadenas laterales beta-ramificadas (p. ej., treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (p. ej., tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina). Como alternativa, pueden introducirse mutaciones al azar a lo largo de la totalidad o parte de la secuencia codificante, tal como por mutagénesis de saturación, y los mutantes resultantes pueden identificarse selectivamente para actividad biológica para identificar mutantes que retienen actividad (p. ej., la capacidad de unirse a un polipéptido anti-SEMA4D, para bloquear la interacción de SEMA4D con su receptor, o para inhibir, retardar o reducir la metástasis en un sujeto, p. ej., un paciente de cáncer).

Por ejemplo, es posible introducir mutaciones solo en regiones marco conservadas o solo en regiones RDC de una molécula de anticuerpo. Las mutaciones introducidas pueden ser mutaciones sustitutivas silenciosas o neutras, **es decir**, no tienen, o tienen poco efecto sobre la capacidad de un anticuerpo para unirse al antígeno. Estos tipos de mutaciones pueden ser útiles para optimizar el uso de codones, o mejorar la producción de anticuerpos del hibridoma. Como alternativa, mutaciones sustitutivas no neutras pueden alterar la capacidad de un anticuerpo para unirse al antígeno. Un experto en la materia sería capaz de diseñar y probar moléculas mutantes con propiedades deseadas tales como sin alteración en la actividad de unión al antígeno o alteración en la actividad de unión (p. ej., mejoras en la actividad de unión al antígeno o cambio en la especificidad del anticuerpo). Después de la mutagénesis, la proteína codificada puede expresarse rutinariamente y la actividad funcional y/o biológica de la proteína codificada, (p. ej., la capacidad para unirse inmunoespecíficamente a al menos un epítipo de un polipéptido SEMA4D) puede determinarse usando técnicas descritas en el presente documento o modificando rutinariamente técnicas conocidas en la técnica.

En ciertas realizaciones de la divulgación, los anticuerpos anti-SEMA4D para su uso en los procedimientos proporcionados en el presente documento comprenden al menos una región determinante de la complementariedad (RDC) optimizada. Por "RDC optimizada" se tiene por objeto que la RDC se haya modificado y optimizado para mejorar la afinidad de unión y/o actividad anti-SEMA4D que se imparte a un anticuerpo anti-SEMA4D que comprende la RDC optimizada. "Actividad anti-SEMA4D" o "actividad de bloqueo de SEMA4D" puede incluir actividad que modula una o más de las siguientes actividades asociadas con SEMA4D: activación, agregación y supervivencia de linfocitos B; proliferación inducida por CD40 y la producción de anticuerpos; respuesta de anticuerpos a antígenos dependientes de linfocitos T; proliferación de linfocitos T u otras células inmunitarias; maduración de células dendríticas; desmielinización y degeneración axonal; apoptosis de precursores neurales pluripotentes y/u oligodendrocitos; inducción de migración de células endoteliales; inhibición de la migración espontánea de monocitos; inhibición, retraso o reducción del crecimiento de células tumorales o metástasis, unión a plexina-B1 de la superficie celular u otro receptor; o cualquier otra asociación de actividad con SEMA4D soluble o SEMA4D que se expresa sobre la superficie de células SEMA4D+. En una realización particular, la actividad anti-SEMA4D incluye la capacidad para inhibir, retrasar o reducir las metástasis tumorales, bien en combinación con la inhibición, el retraso o la reducción del crecimiento primario de células tumorales, o independientemente del crecimiento primario de células tumorales y de metástasis tumoral. La actividad anti-SEMA4D también puede atribuirse a una disminución en la incidencia o gravedad de enfermedades asociadas con la expresión de SEMA4D, incluyendo, entre otros, ciertos tipos de cánceres, incluyendo linfomas, enfermedades autoinmunitarias, enfermedades inflamatorias, que incluyen enfermedades inflamatorias del sistema nervioso central (SNC) y del sistema nervioso periférico (SNP), rechazos de trasplantes y angiogénesis invasiva. Ejemplos de anticuerpos optimizados basados en los AM anti-SEMA4D BD16 murinos, se describieron en la publicación de EE. UU. n.º 2008/0219971 A1, solicitudes de patente internacional WO 93/14125 y Herold y col., *Int. Immunol.* 7(1): 1-8 (1995). Las modificaciones pueden implicar el reemplazo de restos de aminoácidos dentro de la RDC de modo que un anticuerpo anti-SEMA4D retiene la especificidad para el antígeno SEMA4D y tiene afinidad de unión mejorada y/o actividad anti-SEMA4D mejorada.

IV. Características de unión de anticuerpos anti-SEMA4D

Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos para una variante de SEMA4D se exponen en SEQ ID NO: 13 y SEQ ID NO: 14, respectivamente, y para otra variante de SEMA4D se exponen en SEQ ID NO: 15 y SEQ ID NO: 16. En algunas realizaciones, se proporciona el anticuerpo anti-SEMA4D designado como VX15 / 2503. Los anticuerpos que tienen las características de unión del anticuerpo VX15 / 2503 también se describen en el presente documento. Dichos anticuerpos incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos que compiten en ensayos de unión competitiva con VX15/2503, así como anticuerpos que se unen a un epítipo (como se define a continuación) capaz de unirse a VX15/2503. Los métodos para evaluar si los anticuerpos tienen las mismas o similares características de unión incluyen procedimientos cuantitativos tradicionales como, por ejemplo, determinar y comparar la afinidad o avidéz del anticuerpo por el epítipo antigénico (por ejemplo, péptido SEMA4D). Otros procedimientos ejemplares para comparar las características de unión de los anticuerpos incluyen el análisis competitivo por transferencia de Western, inmunoensayos enzimáticos, ELISA y citometría de flujo. Los procedimientos para evaluar y comparar las características de unión anticuerpo-antígeno son bien conocidos en la técnica. También se proporcionan variantes y fragmentos de VX15 / 2503 que conservan la capacidad de unirse específicamente a SEMA4D. Los anticuerpos VX15/2503 y 67 comparten las mismas 6 RDC y se unen al mismo epítipo SEMA4D.

En algunas realizaciones, los anticuerpos anti-SEMA4D, o los fragmentos, variantes o derivados de unión a antígeno de los mismos descritos en el presente documento pueden describirse o especificarse en términos del(los) epítipo(s) o porción(es) de un antígeno, por ejemplo, un polipéptido diana desvelado en el presente documento (por ejemplo, SEMA4D) que reconocen o se unen específicamente. La porción de un polipéptido diana que interactúa específicamente con el dominio de unión al antígeno de un anticuerpo es un "epítipo" o un "determinante antigénico".

En algunas realizaciones, se pretende que un "epítipo" sea la parte de una molécula antigénica que se usa para producir un anticuerpo y/o al que se unirá específicamente un anticuerpo. Un "epítipo SEMA4D" comprende la parte de la proteína SEMA4D a la que se une un anticuerpo anti-SEMA4D. Los epítopos pueden comprender restos de aminoácidos lineales (es decir, restos dentro del epítipo que están dispuestos secuencialmente uno tras otro de forma lineal), restos de aminoácidos no lineales (denominados en el presente documento "epítopos no lineales" o "epítopos conformacionales"; estos epítopos no están dispuestos secuencialmente), o restos de aminoácidos lineales y no lineales. Los epítopos no lineales o los epítopos conformacionales también pueden incluir restos de aminoácidos que contribuyen a la conformación general de la estructura de reconocimiento del anticuerpo, pero no necesariamente se unen al anticuerpo. Típicamente, los epítopos son secuencias cortas de aminoácidos, p. ej., de aproximadamente cinco aminoácidos de longitud. Las técnicas sistemáticas para identificar epítopos se conocen en la materia y se describen, por ejemplo, en los ejemplos expuestos a continuación.

Un polipéptido diana puede comprender un único epítipo, pero típicamente comprende al menos dos epítopos, y puede incluir cualquier número de epítopos, dependiendo del tamaño, la conformación y el tipo de antígeno. Además, debe observarse que un "epítipo" en un polipéptido diana puede ser o puede incluir elementos no polipeptídicos, por ejemplo, un epítipo puede incluir una cadena lateral de carbohidrato.

Se cree que el tamaño mínimo de un péptido o epítipo de polipéptido para un anticuerpo es de aproximadamente cuatro a cinco aminoácidos. Los epítopos peptídicos o polipeptídicos pueden contener al menos siete, al menos nueve o al menos aproximadamente 15 a aproximadamente 30 aminoácidos. Dado que una RDC puede reconocer un péptido o polipéptido antigénico en su forma terciaria, los aminoácidos que comprenden un epítipo no necesitan ser contiguos, y en algunos casos, ni siquiera pueden estar en la misma cadena peptídica. Un epítipo peptídico o polipeptídico reconocido por los anticuerpos anti-SEMA4D de la presente descripción puede contener una secuencia de al menos 4, al menos 5, al menos 6, al menos 7, al menos 8, al menos 9, al menos 10, al menos 15, al menos 20, al menos 25, o entre aproximadamente 15 y aproximadamente 30 aminoácidos contiguos o no contiguos de SEMA4D.

En algunas realizaciones, el epítipo tiene al menos el 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o el 100 % de identidad con una secuencia de aminoácidos del polipéptido diana (por ejemplo, la secuencia establecida en SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 44 o SEQ ID NO: 46).

En algunas realizaciones, el epítipo es idéntico a una secuencia de aminoácidos del polipéptido diana (por ejemplo, la secuencia establecida en SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 44, o SEQ ID NO: 46) excepto 4, 3, 2, 1 o 0 sustituciones de aminoácidos. En otra realización, el epítipo es idéntico a una secuencia de aminoácidos del polipéptido diana (p. ej., la secuencia establecida en SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 44 o SEQ ID NO: 46) excepto por sustituciones conservadoras de aminoácidos (p. ej., 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1 o 0 sustituciones conservadoras de aminoácidos).

En algunas realizaciones, el epítipo comprende una secuencia establecida en SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 44 o SEQ ID NO: 46. En otra realización, el epítipo es la secuencia establecida en SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 44 o SEQ ID NO: 46. En algunas realizaciones, el epítipo es un epítipo lineal. En algunas realizaciones, el epítipo es un epítipo conformacional.

En algunas realizaciones, el epítipo comprende, consiste esencialmente o consiste en LKVPVFYALFTPQLNNV (SEQ ID NO: 42, correspondiente a los restos 304 a 320 de la secuencia de aminoácidos SEMA4D de longitud completa establecida en SEQ ID NO: 1), KWTSFLKARLIASRP (SEQ ID NO: 44, correspondiente a los restos 270 a 284 de la secuencia de aminoácidos SEMA4D de longitud completa establecida en SEQ ID NO: 1, en la que la posición 281 puede ser una cisteína o una alanina), o EFVFRVLIPIARV (SEQ ID NO: 46; correspondiente a los restos 243 a 256

de la secuencia de aminoácidos SEMA4D de longitud completa establecida en SEQ ID NO: 1). En algunas realizaciones, el epítipo comprende una o más de las secuencias de aminoácidos establecidas en SEQ ID NO: 42, 44 y 46. En algunas realizaciones, el epítipo es un epítipo discontinuo comprendido en el dominio que abarca los restos de aminoácidos 243 a 320 de SEQ ID NO: 1.

- 5 V. Procedimientos de tratamiento utilizando anticuerpos terapéuticos anti-SEMA4D en combinación con al menos una terapia de inmunomodulación

La invención se refiere a anticuerpos anti-SEMA4D y fragmentos de unión a antígeno de los mismos para uso terapéutico como se define en las reivindicaciones adjuntas.

10 Los procedimientos de la divulgación están dirigidos al uso de moléculas de unión anti-SEMA4D, por ejemplo, anticuerpos, que incluyen fragmentos de unión a antígeno, variantes y derivados de los mismos, como agentes únicos o en combinación con al menos una otra terapia inmunomoduladora, para inhibir, retrasar o reducir el crecimiento tumoral o metástasis en un sujeto que necesite inhibición, retraso o reducción, por ejemplo, un paciente con cáncer. En ciertas realizaciones, las células cancerosas expresan un receptor SEMA4D. Aunque la siguiente discusión se refiere a la administración de un anticuerpo anti-SEMA4D, los procedimientos desvelados en el presente documento son igualmente aplicables a los fragmentos de unión a antígeno, variantes y derivados de estos anticuerpos que conservan las propiedades deseadas de los anticuerpos de la divulgación, por ejemplo, capaces de unirse específicamente a SEMA4D, por ejemplo, SEMA4D humano, de ratón o humano y de ratón, que tiene actividad neutralizante de SEMA4D y/o bloquea la interacción de SEMA4D con sus receptores. Los procedimientos descritos en el presente documento también son aplicables a otros productos biológicos o fármacos de molécula pequeña que conservan las propiedades deseadas de los anticuerpos de la divulgación, por ejemplo, capaces de unirse específicamente a SEMA4D, por ejemplo, SEMA4D humano, de ratón o humano y de ratón, que tiene actividad neutralizadora de SEMA4D y/o bloquea la interacción de SEMA4D con sus receptores.

25 En ciertas realizaciones, las células cancerosas expresan un receptor SEMA4D, tal como, por ejemplo, Plexina-B1 o Plexina-B2. En otras realizaciones, las células cancerosas expresan otros receptores que pueden funcionar junto con un receptor SEMA4D. Un ejemplo de tal receptor es HER2 (ErbB2). Los ejemplos de cánceres en los que se ha observado la expresión de Plexina-B1 o Plexina-B2 en combinación con Her2 incluyen cáncer de pulmón, cáncer de mama, cáncer de próstata y cáncer de ovario.

30 En una realización, la terapia inmunomoduladora puede incluir vacunas contra el cáncer, agentes inmunoestimuladores, terapia con linfocitos T o anticuerpos adoptivos e inhibidores del bloqueo del punto de control inmunitario (Lizée y col. 2013. Harnessing the Power of the Immune System to Target Cancer. Annu. Rev. Med. Vol. 64 No. 71-90).

35 **Vacunas contra el cáncer.** Las vacunas contra el cáncer activan el sistema inmunitario del cuerpo y la resistencia natural a una célula anómala, como el cáncer, lo que da como resultado la erradicación o el control de la enfermedad. Las vacunas contra el cáncer generalmente consisten en un antígeno tumoral en una formulación inmunogénica que activa células auxiliares específicas de antígeno tumoral y/o los CTL y los linfocitos B. Las vacunas pueden estar en una variedad de formulaciones, que incluyen, entre otras, células dendríticas, especialmente células dendríticas autólogas pulsadas con células tumorales o antígenos tumorales, células tumorales heterólogas transfectadas con un agente inmunoestimulante como GM-CSF, virus recombinante o proteínas o péptidos que generalmente se administran junto con un potente adyuvante inmune como CpG.

40 **Agentes inmunoestimuladores.** Los agentes inmunoestimuladores actúan para mejorar o aumentar la respuesta inmunitaria a los tumores, que se suprime en muchos pacientes con cáncer a través de diversos mecanismos. Las terapias inmunomoduladoras pueden dirigirse a linfocitos, macrófagos, células dendríticas, células citolíticas naturales (células NK) o subconjuntos de estas células, como los linfocitos T citotóxicos (CTL) o los linfocitos T citolíticos naturales (NKT). Debido a las cascadas inmunitarias que interactúan, un efecto en un conjunto de células inmunes a menudo se amplificará al extenderse a otras células, p. ej., la actividad de células presentadoras de antígeno mejorada promueve la respuesta de los linfocitos T y B. Los ejemplos de agentes inmunoestimuladores incluyen, entre otros, HER2, citocinas como G-CSF, GM-CSF e IL-2, fracciones de la membrana celular de bacterias, glucolípidos que se asocian con CD1d para activar los linfocitos T citolíticos naturales (NKT), oligonucleótidos CpG.

50 Los macrófagos, las células mielofagocíticas del sistema inmunitario, son una parte fundamental de los mecanismos de defensa innatos, que pueden promover la inmunidad específica al inducir el reclutamiento y la activación de los linfocitos T. A pesar de esto, su presencia dentro del microambiente tumoral se ha asociado con una progresión tumoral mejorada y se ha demostrado que promueve el crecimiento y la diseminación de las células cancerosas, la angiogénesis y la inmunosupresión. Los actores clave en la configuración de su fenotipo son las señales microambientales a las que están expuestos los macrófagos, que ajustan selectivamente sus funciones dentro de un espectro funcional que abarca los extremos M1 (macrófago inhibidor de tumores) y M2 (macrófago promotor de tumores). Sica y col., Seminars in Cancer Biol. 18: 349-355 (2008). Increased macrophage numbers during cancer generally correlates with poor prognosis (Qualls y Murray, Curr. Topics in Develop. Biol. 94: 309-328 (2011)). De los múltiples tipos de células del estroma únicas comunes a los tumores sólidos, los macrófagos asociados a tumores (TAM) son importantes para fomentar la progresión del tumor. Dirigirse a las vías moleculares que regulan la

polarización TAM es una gran promesa para la terapia contra el cáncer. Ruffell et al., Trends in Immunol. 33: 119-126 (2012).

Transferencia de células adoptivas. La transferencia de células adoptivas puede emplear respuestas citotóxicas basadas en linfocitos T para atacar las células cancerosas. Los linfocitos T autólogos que tienen una reactividad natural o genéticamente modificada al cáncer de un paciente se generan y crecen *in vitro* y luego se transfieren nuevamente al paciente con cáncer. Un estudio demostró que la transferencia adoptiva de linfocitos autólogos infiltrantes de tumores crecidos *in vitro* era un tratamiento eficaz para pacientes con melanoma metastásico (Rosenberg SA, Restifo NP, Yang JC, Morgan RA, Dudley ME (Abril 2008). "Adoptive cell transfer: a clinical path to effective cancer immunotherapy". Nat. Rev. Cancer 8 (4): 299-308). Esto se puede lograr tomando linfocitos T que se encuentran dentro del tumor extirpado del paciente. Estos linfocitos T se denominan linfocitos infiltrantes de tumores (LIT) y se supone que han viajado hacia el tumor debido a su especificidad por los antígenos tumorales. Dichos linfocitos T pueden inducirse a multiplicarse *in vitro* usando altas concentraciones de IL-2, anti-CD3 y células alimentadoras alorreactivas. Estos linfocitos T se transfieren nuevamente al paciente junto con la administración exógena de IL-2 para aumentar aún más su actividad anticancerígena. En otros estudios, los linfocitos T autólogos se han transducido con un receptor de antígeno quimérico que los hace reactivas a un antígeno tumoral dirigido (Liddy y col., Nature Med. 18: 980-7, (2012); Grupp y col., Nueva Inglaterra J. Med. 368: 1509-18, (2013)).

Otras terapias de transferencia de células adoptivas emplean células dendríticas autólogas expuestas a antígenos tumorales naturales o modificados *ex vivo* que se vuelven a infundir en el paciente. Provenge es una terapia aprobada por la FDA en la que las células autólogas se incuban con una proteína de fusión de fosfatasa ácida prostática y GM-CSF para tratar pacientes con tumores de próstata. Se cree que GM-CSF promueve la diferenciación y actividad de las células dendríticas presentadoras de antígeno (Small et al., J. Clin. Oncol. 18: 3894-903 (2000); Patente de Estados Unidos 7.414.108)).

Bloqueo del punto de control inmunitario. Las terapias de bloqueo del punto de control inmunitario mejoran la inmunidad de los linfocitos T al eliminar un control de retroalimentación negativa que limita las respuestas inmunes en curso. Estos tipos de terapias se dirigen a vías inhibitorias en el sistema inmunitario que son cruciales para modular la duración y amplitud de las respuestas inmunitarias fisiológicas en los tejidos periféricos (anti-CTLA4) o en el tejido tumoral que expresa PD-L1 (anti-PDI o anti-PD-LI) para minimizar el daño colateral del tejido. Los tumores pueden evolucionar para aprovechar ciertas vías de puntos de control inmunitario como un mecanismo principal de resistencia inmunitaria contra los linfocitos T que son específicos para los antígenos tumorales. Dado que muchos puntos de control inmunitarios se inician por interacciones ligando-receptor, estos puntos de control pueden ser bloqueados por anticuerpos contra el receptor o ligando o pueden ser modulados por formas recombinantes solubles de los ligandos o receptores. La neutralización de los puntos de control inmunitario permite que los linfocitos T específicos de tumor continúen funcionando en el microambiente tumoral inmunosupresor. Ejemplos de terapias de bloqueo del punto de control inmunitario son aquellas que se dirigen al antígeno 4 asociado a linfocitos T citotóxicos (CTLA-4), PD-1, su ligando PD-L1, LAG3 y B7-H3.

Ciclofosfamida. La ciclofosfamida, un agente quimioterapéutico de uso común, puede mejorar las respuestas inmunitarias. La ciclofosfamida suprime diferencialmente la función de los linfocitos T reguladores (Tregs) en relación con los linfocitos T efectoras. Los Tregs son importantes para regular las respuestas inmunitarias contra el cáncer. Los Tregs infiltrantes de tumores se han asociado previamente con mal pronóstico. Si bien los agentes que se dirigen específicamente a Tregs no están disponibles actualmente, la ciclofosfamida se ha convertido en un agente clínicamente factible que puede suprimir preferentemente Tregs en relación con otros linfocitos T y, por lo tanto, permite una inducción más eficaz de respuestas inmunes antitumorales.

Otras terapias inmunomoduladoras: la terapia con un anticuerpo SEMA4D o un fragmento de unión a antígeno del mismo, se puede combinar con quimioterapia de baja dosis o radioterapia. Aunque la quimioterapia estándar a menudo es inmunosupresora, se ha demostrado que las dosis bajas de agentes quimioterapéuticos como ciclofosfamida, doxorubicina y paclitaxel mejoran las respuestas a la terapia de vacuna contra el cáncer (Machiels et al., Cancer Res. 61: 3689-3697 (2001)) En algunos casos, la quimioterapia puede inactivar diferencialmente los linfocitos T reguladores (Treg) y las células supresoras derivadas de mieloides (MDSC) que regulan negativamente las respuestas inmunes en el entorno del tumor. La radioterapia se ha empleado generalmente para explotar el efecto tumoricida directo de la radiación ionizante. De hecho, las altas dosis de radiación pueden, como la quimioterapia, ser inmunosupresoras. Sin embargo, numerosas observaciones sugieren que, en condiciones apropiadas de fraccionamiento y secuenciación de la dosis, la radioterapia puede mejorar las respuestas inmunes específicas del tumor y los efectos de los agentes inmunomoduladores. Uno de los diversos mecanismos que contribuyen a este efecto es la presentación cruzada por las células dendríticas y otras células presentadoras de antígeno de los antígenos tumorales liberados por la muerte de las células tumorales inducida por la radiación (Higgins y col., Cancer Biol. Ther. 8: 1440-1449 (2009)). En efecto, la radioterapia puede inducir la vacunación *in situ* contra un tumor (Ma y col., Seminar Immunol. 22: 113-124 (2010)) y esto podría amplificarse mediante la combinación con terapia con una molécula de unión SEMA4D o Plexina-B1, por ejemplo, un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno, variante o derivado del mismo.

Una terapia inmunomoduladora puede ser un agente inmunomodulador, que incluye, pero no se limita a, interleucinas tales como IL-2, IL-7, IL-12; citocinas tales como factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF), interferones; diversas quimiocinas tales como CXCL13, CCL26, CXCL7; antagonistas de bloqueos del punto de control inmunitario tales como anti-CTLA-4, anti-PD-1, anti-PD-LI, anti-LAG3 y anti-B7-H3; Citosina fosfato-guanosina sintética

(CpG), oligodesoxinucleótidos, glucanos, moduladores de los linfocitos T reguladores (Tregs) como la ciclofosfamida u otros agentes inmunomoduladores. Un agente inmunomodulador es un anticuerpo agonista contra 4-1BB (CD137). Como se informó recientemente, dicho anticuerpo agonista contra 4-1BB puede dar lugar a una nueva clase de linfocitos T KLRG1 + que son altamente citotóxicos para los tumores (Curran y col., J. Exp. Med. 210: 743-755 (2013)).

5 En todos los casos, la terapia inmunomoduladora adicional se administra antes, durante o después del anticuerpo anti-SEMA4D o fragmento de unión al antígeno del mismo, Cuando las terapias combinadas comprenden la administración de un anticuerpo anti-SEMA4D o un fragmento de unión a antígeno del mismo, en combinación con la administración de otro agente inmunomodulador, los procedimientos de la divulgación abarcan la coadministración, usando formulaciones separadas o una sola formulación farmacéutica, con administración simultánea o consecutiva en cualquier orden.

La terapia inmunomoduladora puede ser un agente de terapia contra el cáncer, que incluye, entre otros, cirugía o procedimientos quirúrgicos (por ejemplo, esplenectomía, hepatectomía, linfadenectomía, leucoforesis, trasplante de médula ósea y similares); radioterapia; quimioterapia, opcionalmente en combinación con trasplante autólogo de médula ósea u otra terapia contra el cáncer; donde la terapia adicional contra el cáncer se administra antes, durante

15 o después de la molécula de unión a anti-SEMA4D, por ejemplo, un fragmento de anticuerpo o antígeno de unión, variante o derivado de la misma. Cuando las terapias combinadas comprenden la administración de una molécula de unión anti-SEMA4D, por ejemplo, un anticuerpo, fragmento de unión a antígeno, variante o derivado del mismo, en combinación con la administración de otro agente terapéutico, los procedimientos de la divulgación abarcan la administración conjunta, usando formulaciones o una sola formulación farmacéutica, con administración simultánea o consecutiva en cualquier orden.

En otra realización, la divulgación se dirige al uso de moléculas de unión anti-SEMA4D o anti-Plexina-B1, por ejemplo, anticuerpos, que incluyen fragmentos de unión a antígeno, variantes y derivados de los mismos, como agentes únicos o en combinación con al menos otra terapia inmunomoduladora, para tratar a pacientes con cáncer con niveles elevados de linfocitos B, linfocitos T o linfocitos B y linfocitos T en circulación en comparación con otros pacientes con tumores sólidos, como los que se encuentran en el cerebro, ovario, mama, colon y otros tejidos pero excluyendo cánceres hematológicos. Tal como se usa en el presente documento, el término "elevado" se refiere a pacientes con cáncer que tienen al menos 1,5 veces, por ejemplo, aproximadamente 1,5 a aproximadamente 5 veces, por ejemplo, aproximadamente 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5 o 5 o más veces el número medio de linfocitos B y/o linfocitos T en circulación que otros pacientes con cáncer. En un ejemplo no limitante, en un grupo de 34 pacientes con tumores sólidos, el número medio de linfocitos B fue de 98 por microlitro de sangre y el número medio de linfocitos T fue de 782 por microlitro de sangre. En consecuencia, el número medio de linfocitos B y linfocitos T por microlitro de sangre observado en este subconjunto de pacientes con cáncer con niveles elevados de linfocitos B y linfocitos T puede variar de aproximadamente 147 a aproximadamente 588 y de aproximadamente 1173 a aproximadamente 3910, respectivamente, en comparación con otros pacientes con cáncer.

En otra realización, la divulgación se dirige al uso de moléculas de unión anti-SEMA4D o anti-Plexina-B1, por ejemplo, anticuerpos, que incluyen fragmentos de unión a antígeno, variantes y derivados de los mismos, como agentes únicos o en combinación con al menos otra terapia inmunomoduladora, para tratar a pacientes con cáncer con niveles de linfocitos B, linfocitos T o linfocitos B y linfocitos T en circulación que se encuentran dentro o por encima del rango de individuos normales. Tal como se usa en el presente documento, el término "normal" se refiere a los niveles de linfocitos B y/o T que se encuentran en pacientes sanos sin cáncer. Tal como se usa en el presente documento, el término "dentro" se refiere a una diferencia del diez (10) por ciento en los niveles de linfocitos B y/o T. En un ejemplo no limitante, el rango de niveles normales incluye, por ejemplo, un recuento de linfocitos B de aproximadamente 250 células por microlitro o más y/o un recuento de linfocitos T de aproximadamente 1500 células por microlitro o más. Por lo tanto, el número medio de linfocitos B y linfocitos T por microlitro de sangre en pacientes con cáncer con niveles elevados de linfocitos B y linfocitos T puede variar de aproximadamente 225 a aproximadamente 275 o más y de aproximadamente 1350 a aproximadamente 1650 y más, respectivamente, en comparación a pacientes sanos sin cáncer. Por supuesto, un experto en la materia debería apreciar que los niveles de linfocitos B y T pueden variar dependiendo de una variedad de factores, por ejemplo, tipo de cáncer, etapa del cáncer, etc., y, por lo tanto, los niveles que están por debajo de los proporcionados anteriormente también pueden constituir niveles elevados para un determinado tipo o etapa de cáncer.

En algunas realizaciones de la divulgación, los recuentos absolutos de linfocitos T y B se miden usando un ensayo inmunofenotípico basado en citometría de flujo validado (reactivo TBNK de 6 colores BD Mutitest), que es un ensayo inmunofluorescente directo de seis colores que también utiliza tubos BD Trucount y un citómetro de flujo BD FACScanto. Este ensayo se usa de manera rutinaria para determinar los porcentajes y los recuentos absolutos de los linfocitos T, B y las células NK, así como las subpoblaciones de linfocitos T CD4 y CD8 en la sangre periférica. Las células sanguíneas periféricas se seleccionan primero en linfocitos CD45+. Los linfocitos B se definen como células CD3 + dentro de esta selección y los linfocitos B se definen como células CD19 + CD3- dentro de esta selección. Los porcentajes simplemente se toman directamente del citómetro de flujo después de establecer la selección apropiada, y los recuentos absolutos se calculan utilizando la siguiente fórmula (tomada directamente del manual del procedimiento BD): [(n.º de eventos en la población celular / n.º de eventos en la región de conteo absoluto)] * [(n.º de cuentas / testa) / volumen de prueba] = recuento absoluto de población celular, en la que "a" es el valor que se encuentra en la etiqueta de la bolsa de aluminio del tubo BD Trucount.

También debe apreciarse que los procedimientos descritos en el presente documento también son aplicables a la sustitución de moléculas de unión anti-Plexina-B1 por moléculas de unión anti-SEMA4D. En algunas realizaciones de la divulgación, se puede usar una molécula de unión anti-Plexina-B1 para inhibir la interacción de SEMA4D con Plexina-B1 bloqueando la unión de SEMA4D a Plexina-B1 y/o evitando la activación de Plexina-B1 por SEMA4D.

5 También debe apreciarse que los procedimientos descritos en el presente documento también son aplicables al uso de fármacos de molécula pequeña u otros productos biológicos para inhibir la actividad de SEMA4D o Plexina-B1. En algunas realizaciones de la divulgación, se puede usar un fármaco de molécula pequeña o un producto biológico distinto de una molécula de unión anti-SEMA4D para inhibir la interacción de SEMA4D con Plexina-B1 bloqueando la unión de SEMA4D a Plexina-B1 y/o evitando activación de Plexina-B1 por SEMA4D.

10 En una realización, el tratamiento incluye la aplicación o administración a un paciente de una molécula de unión a anti-SEMA4D, p. ej., un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo como se describe en el presente documento, como en combinación con al menos otra terapia inmunomoduladora para un paciente, o una aplicación o administración de la molécula de unión a anti-SEMA4D como un único agente o en combinación con al menos otra terapia inmunomoduladora para un tejido aislado o línea celular de un paciente, en el que el paciente tiene, o tiene el riesgo de desarrollar metástasis de células cancerosas. En otra realización, el tratamiento también pretende incluir la aplicación o administración de una composición farmacéutica que comprende las moléculas de unión a anti-SEMA4D, p. ej., un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo a un paciente, en combinación con al menos otra terapia inmunomoduladora o aplicación o administración de una composición farmacéutica que comprende la molécula de unión a anti-SEMA4D y al menos otra terapia inmunomoduladora para un tejido o línea celular aislada de un paciente, en el que el paciente tiene, o tiene el riesgo de desarrollar metástasis de células cancerosas.

15 Las moléculas de unión a anti-SEMA4D, por ejemplo, anticuerpos o fragmentos de unión de los mismos como se describe en el presente documento, como agentes únicos o en combinación con al menos una otra terapia inmunomoduladora, son útiles para el tratamiento de diversos tumores malignos y no malignos. Por "actividad antitumoral" se entiende una reducción en la tasa de producción o acumulación de SEMA4D asociada directamente con el tumor o indirectamente con las células del estroma del entorno del tumor, y por lo tanto una disminución en la tasa de crecimiento de un tumor existente o de un tumor que surge durante la terapia, y/o la destrucción de un tumor existente células neoplásicas (tumoraes) o células neoplásicas recién formadas y, por lo tanto, una disminución en el tamaño total de un tumor y/o cantidad de sitios metastásicos durante la terapia. Por ejemplo, terapia con al menos un anticuerpo anti-SEMA4D como un solo agente o en combinación con al menos otra terapia inmunomoduladora provoca una respuesta fisiológica, por ejemplo, una reducción en las metástasis, que es beneficiosa con respecto al tratamiento de patologías asociadas con células que expresan SEMA4D en un ser humano.

20 En una realización, la divulgación se refiere al uso de moléculas de unión a anti-SEMA4D, p. ej., anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno, variantes o derivados de los mismos, como un agente único o en combinación con al menos otra terapia inmunomoduladora como un medicamento, en el tratamiento o la profilaxis de cáncer o para su uso en una condición precancerosa o lesión para inhibir, reducir, prevenir, retrasar o minimizar el crecimiento o la metástasis de células tumorales.

25 Según los procedimientos de la presente divulgación, al menos una molécula de unión a anti-SEMA4D, p. ej., un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno, variante, o derivado del mismo, como un agente único o en combinación con al menos otra terapia inmunomoduladora puede usarse para promover una respuesta terapéutica positiva con respecto a una célula humana maligna. Por "respuesta terapéutica positiva" con respecto al tratamiento del cáncer se pretende una mejora en la enfermedad en asociación con la actividad antitumoral de estas moléculas de unión, por ejemplo, anticuerpos o fragmentos de los mismos, y/o una mejora en los síntomas asociados con la enfermedad. En particular, los procedimientos proporcionados en el presente documento están dirigidos a inhibir, prevenir, reducir, aliviar, retardar o disminuir el crecimiento de un tumor y/o el desarrollo de metástasis de tumores primarios en un paciente. Esa es la prevención de crecimientos tumorales distales, se puede observar. Así, por ejemplo, una mejora en la enfermedad puede caracterizarse como una respuesta completa. Por "respuesta completa" se entiende la ausencia de metástasis clínicamente detectables con la normalización de cualquier estudio radiográfico previamente anómalo, p. ej., en el sitio del tumor primario o la presencia de metástasis tumorales en la médula ósea. Como alternativa, una mejora en la enfermedad puede clasificarse como una respuesta parcial. Por "respuesta parcial" se entiende al menos una disminución del 50 % en todas las metástasis medibles (es decir, el número de células tumorales presentes en el sujeto en un sitio remoto del tumor primario). Como alternativa, una mejora en la enfermedad puede clasificarse como supervivencia libre de recaída o "supervivencia libre de progresión". Por "supervivencia libre de recaída" se entiende el tiempo hasta la recurrencia de un tumor en cualquier sitio. La "supervivencia libre de progresión" es el tiempo antes de que se pueda detectar un mayor crecimiento del tumor en un sitio que se está controlando.

30 La inhibición, el retraso o la reducción de metástasis se pueden evaluar utilizando técnicas de detección tales como obtención de imágenes, por ejemplo, imágenes de anticuerpos fluorescentes, imágenes de escaneo óseo y muestreo de biopsia tumoral, incluida la aspiración de médula ósea (BMA) o inmunohistoquímica. Además de estas respuestas terapéuticas positivas, el sujeto que se somete a terapia con la molécula de unión a anti-SEMA4D, por ejemplo, un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno, variante o derivado del mismo, puede experimentar el efecto beneficioso de una mejora en los síntomas asociados con la enfermedad.

La respuesta clínica se puede evaluar utilizando técnicas de detección tales como exploración por imágenes de resonancia magnética (IRM), imágenes radiográfica, exploración tomográfica computarizada (CT), citometría de flujo o análisis de clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS), histología, patología macroscópica y química de la sangre, que incluyen, entre otros, cambios detectables por ELISA, RIA, cromatografía y similares.

- 5 Para aplicar los procedimientos y sistemas de la divulgación en ciertas realizaciones, se pueden obtener muestras de un paciente antes o después de la administración de una terapia que comprende cualquiera de: (1) una cantidad eficaz de una molécula de unión aislada que se une específicamente a semaforina-4D (SEMA4D) Y una cantidad eficaz de al menos otra terapia inmunomoduladora; o (2) una cantidad eficaz de una molécula de unión aislada que se une específicamente a la semaforina-4D (SEMA4D) a un sujeto que tiene un tumor que es Her2+ y Plexina B1+ o Plexina B2+. En algunos casos, se pueden obtener muestras o imágenes sucesivas del paciente después de que se haya iniciado la terapia, o después de que haya cesado la terapia, o tanto antes como después de la terapia. Las muestras o imágenes pueden, por ejemplo, ser solicitadas por un proveedor de asistencia sanitaria (p. ej., un médico) o un proveedor de prestaciones de asistencia sanitaria, obtenidas y/o procesadas por el mismo o por otro proveedor de asistencia sanitaria (p. ej., enfermero, un hospital) o un laboratorio clínico, y después de ser procesadas, los resultados pueden ser enviados a otro proveedor de asistencia sanitaria, el proveedor de prestaciones de asistencia sanitaria, o al paciente. De la misma forma, la medición/determinación de uno o más puntajes, comparaciones entre los puntajes, la evaluación de los puntajes y las decisiones respecto al tratamiento pueden ser realizadas por uno o más proveedores de asistencia sanitaria, los proveedores de prestaciones de asistencia sanitaria, y/o los laboratorios clínicos.
- 20 Tal como se usa en el presente documento, el término "proveedor de asistencia sanitaria" se refiere a individuos o instituciones que interactúan y administran directamente a sujetos vivos, por ejemplo, pacientes humanos. Entre los ejemplos no limitantes de proveedores de asistencia sanitaria se incluyen médicos, enfermeras, técnicos, terapeutas, farmacéuticos, asesores, profesionales de medicina alternativa, instalaciones médicas, consultorios médicos, hospitales, salas de emergencia, clínicas, centros de atención urgente, clínicas/instalaciones de medicina alternativa y cualquier otra entidad que proporciona tratamiento general y/o especializado, evaluación, mantenimiento, terapia, medicación y/o asesoramiento relacionado con todo o parte del estado de salud del paciente, incluidos, entre otros, medicina general, medicina especializada, cirugía y/o cualquier otro tipo de tratamiento, evaluación, mantenimiento, terapia, medicación y/o asesoramiento.

- 30 En algunos aspectos, un proveedor de asistencia sanitaria puede administrar o instruir a otro proveedor de asistencia sanitaria a administrar una terapia que comprende cualquiera de: (1) una cantidad eficaz de una molécula de unión aislada que se une específicamente a semaforina-4D (SEMA4D) y una cantidad eficaz de al menos otra terapia inmunomoduladora; o (2) una cantidad eficaz de una molécula de unión aislada que se une específicamente a semaforina-4D (SEMA4D), en la que el sujeto tiene, o se sospecha que tiene células tumorales que son Her2+ y Plexina B1+ o Plexina B2+. Un proveedor de asistencia sanitaria puede implementar o instruir a otro proveedor de asistencia sanitaria o paciente a realizar las siguientes acciones: obtener una muestra, procesar una muestra, enviar una muestra, recibir una muestra, transferir una muestra, analizar o medir una muestra, cuantificar una muestra, proporcionar los resultados obtenidos después de analizar/medir/cuantificar una muestra, recibir los resultados obtenidos después de analizar/medir/cuantificar una muestra, comparar los resultados obtenidos después de analizar/medir/cuantificar una o más muestras, proporcionar la comparación/puntaje de una o más muestras, obtener la comparación/puntaje de una o más muestras, administrar una terapia (p. ej., (1) una cantidad eficaz de una molécula de unión aislada que se une específicamente a semaforina-4D (SEMA4D) y una cantidad eficaz de al menos otra terapia inmunomoduladora; o (2) una cantidad eficaz de una molécula de unión aislada que se une específicamente a semaforina-4D (SEMA4D) a un sujeto, en el que el sujeto tiene, o se sospecha que tiene células tumorales que son Her2+ y Plexina B1+ o Plexina B2+, comenzar la administración de una terapia, dejar de administrar una terapia, continuar con la administración de una terapia, interrumpir temporalmente la administración de una terapia, aumentar la cantidad de un agente terapéutico administrado, disminuir la cantidad de un agente terapéutico administrado, continuar la administración de una cantidad de un agente terapéutico, aumentar la frecuencia de administración de un agente terapéutico, disminuir la frecuencia de administración de un agente terapéutico, mantener la misma frecuencia de dosificación en un agente terapéutico, reemplazar una terapia o agente terapéutico con al menos otra terapia o agente terapéutico, combinar una terapia o agente terapéutico con al menos otra terapia o agente terapéutico adicional. En algunos aspectos, un proveedor de prestaciones de asistencia sanitaria puede autorizar o negar, por ejemplo, una recogida de una muestra, un procesamiento de una muestra, una presentación de una muestra, una recepción de una muestra, una transferencia de una muestra, un análisis o medición de una muestra, una cuantificación de una muestra, provisión de los resultados obtenidos después de analizar/medir/cuantificar una muestra, transferencia de los resultados obtenidos después de analizar/medir/cuantificar una muestra, comparación/puntaje de los resultados obtenidos después de analizar/medir/cuantificar una o más muestras, transferencia de la comparación/puntaje de una o más muestras, administración de una terapia o agente terapéutico, comienzo de la administración de una terapia o agente terapéutico, cese de la administración de una terapia o agente terapéutico, continuación de la administración de una terapia o agente terapéutico, interrupción temporal de la administración de una terapia o agente terapéutico, aumento de la cantidad de agente terapéutico administrado, disminución de la cantidad de agente terapéutico administrado, continuación de la administración de una cantidad de un agente terapéutico, aumento de la frecuencia de administración de un agente terapéutico, disminución de la frecuencia de administración de un agente terapéutico, mantener la misma frecuencia de dosificación en un agente terapéutico, reemplazar una terapia o agente terapéutico

con al menos otra terapia o agente terapéutico, o combinar una terapia o agente terapéutico con al menos otra terapia o agente terapéutico adicional.

Además, un proveedor de prestaciones de asistencia sanitaria puede, p. ej., autorizar o denegar la prescripción de una terapia, autorizar o denegar la cobertura de una terapia, autorizar o denegar el reembolso del costo de una terapia, determinar o denegar la elegibilidad para una terapia, etc.

En algunos aspectos, un laboratorio clínico puede, por ejemplo, recoger u obtener una muestra, procesar una muestra, presentar una muestra, recibir una muestra, transferir una muestra, analizar o medir una muestra, cuantificar una muestra, proporcionar los resultados obtenidos después de analizar/medir/cuantificar una muestra, recibir los resultados obtenidos después de analizar/medir/cuantificar una muestra, comparar los resultados obtenidos después de analizar/medir/cuantificar una o más muestras, proporcionar la comparación/puntaje de una o más muestras, obtener la comparación/puntaje de una o más muestras, u otras actividades relacionadas.

VI. Procedimientos de diagnóstico y tratamiento

En ciertas realizaciones, la presente divulgación proporciona procedimientos para tratar a un sujeto, por ejemplo, un paciente con cáncer, en el que el sujeto tiene niveles elevados de linfocitos B, linfocitos T o tanto linfocitos B como linfocitos T, que comprende administrar una combinación de una cantidad eficaz de una molécula de unión aislada que se une específicamente a la semaforina-4D (SEMA4D) y a una cantidad eficaz de al menos otra terapia inmunomoduladora si los niveles de linfocitos B, linfocitos T o linfocitos B y linfocitos T del sujeto están por encima de un nivel umbral predeterminado de linfocitos B, linfocitos T o tanto linfocitos B como linfocitos T, o están elevados en relación con el nivel de linfocitos B, linfocitos T o tanto linfocitos B como linfocitos T, en una o más muestras de control que pueden incluir, entre otras, muestras de otros pacientes con cáncer o de pacientes sanos sin cáncer. Los niveles de linfocitos B, linfocitos T o de linfocitos B y linfocitos T pueden ser medidos por un proveedor de asistencia sanitaria o por un laboratorio clínico, en el que una muestra, por ejemplo, una muestra de sangre, se obtiene del paciente por el proveedor de asistencia sanitaria o por el laboratorio clínico. En un aspecto, el nivel de linfocitos B, linfocitos T o tanto linfocitos B como linfocitos T del paciente, se puede medir en un ensayo inmunofenotípico basado en citometría.

En ciertas realizaciones, la presente divulgación también proporciona un procedimiento para tratar a un sujeto, por ejemplo, un paciente con cáncer, que comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz de una molécula de unión aislada que se une específicamente a la semaforina-4D (SEMA4D) si la expresión de Her2 y de Plexina B1 o Plexina B2 en una muestra tomada de las células tumorales del sujeto está por encima de los niveles de umbral predeterminados, o es elevada en relación con la expresión de Her2 y Plexina B1 o plexina B2 en una o más muestras de control. La expresión de Her2, plexina B1 y/o plexina B2 en las células tumorales del sujeto puede ser medida por un proveedor de asistencia sanitaria o por un laboratorio clínico a nivel de proteína y/o a nivel de ARNm. En ciertos aspectos, la expresión de Her2, Plexina B1 y/o Plexina B2 se puede medir *in situ*, por ejemplo, mediante técnicas de imagen. En ciertos aspectos, la expresión de Her2, Plexina B1 y/o Plexina B2 se puede medir en una muestra de células tumorales obtenida del sujeto mediante una biopsia. En un aspecto, la expresión de Her2, Plexina B1 y/o Plexina B2 en células tumorales se puede medir en un inmunoensayo que emplea anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos que reconocen proteínas Her2, Plexina B1 y/o Plexina B2, o fragmentos de unión a antígeno, variantes o derivados de los mismos. En otro aspecto, la expresión de Her2, Plexina B1 y/o Plexina B2 se puede medir a través de un ensayo cuantitativo de expresión génica, por ejemplo, un ensayo de RT-PCR.

La presente divulgación también proporciona procedimientos, ensayos y kits para facilitar la determinación por parte de un proveedor de asistencia sanitaria, un proveedor de beneficios de asistencia sanitaria o un laboratorio clínico en cuanto a si un sujeto, por ejemplo, un paciente con cáncer, se beneficiará del tratamiento con: (1) una cantidad eficaz de una molécula de unión aislada que se une específicamente a la semaforina-4D (SEMA4D) y una cantidad eficaz de al menos otra terapia inmunomoduladora; o (2) una cantidad eficaz de una molécula de unión aislada que se une específicamente a la semaforina-4D (SEMA4D), en el que el sujeto tiene, o se sospecha que tiene, células tumorales que son Her2 + y Plexina B1+ o Plexina B2+. Los procedimientos, ensayos y kits proporcionados en el presente documento también facilitarán la determinación por parte de un proveedor de asistencia sanitaria, un proveedor de beneficios de asistencia sanitaria o un laboratorio clínico para determinar si un sujeto, por ejemplo, un paciente con cáncer, se beneficiará del tratamiento con (1) una cantidad eficaz de una molécula de unión aislada que se une específicamente a semaforina-4D (SEMA4D) y una cantidad eficaz de al menos otra terapia inmunomoduladora; o (2) una cantidad eficaz de una molécula de unión aislada que se une específicamente a la semaforina-4D (SEMA4D) (por ejemplo, cuando las células tumorales del sujeto expresan, o se puede determinar que expresan, Her2 y Plexina B1 o Plexina B2).

La presente divulgación proporciona un procedimiento para tratar a un sujeto, por ejemplo, un paciente con cáncer, que comprende administrar una cantidad eficaz de una molécula de unión aislada que se une específicamente a la semaforina-4D (SEMA4D) y una cantidad eficaz de al menos otra terapia inmunomoduladora; si el nivel de linfocitos B, linfocitos T o de linfocitos T y linfocitos B en una muestra tomada del paciente está por encima de un nivel umbral predeterminado, o está por encima del nivel de linfocitos B, linfocitos T o de linfocitos T y linfocitos B en una o más muestras de control. En algunos aspectos, la muestra se obtiene del paciente y se envía para medir el nivel de linfocitos B, linfocitos T o de linfocitos T y linfocitos B en la muestra, por ejemplo, a un laboratorio clínico.

La divulgación también proporciona un procedimiento para tratar a un sujeto, por ejemplo, un paciente con cáncer que comprende (a) enviar una muestra tomada del sujeto para medir el nivel de linfocitos B, linfocitos T o de linfocitos T y linfocitos B en la muestra; y (b) administrar una cantidad eficaz de una molécula de unión aislada que se une específicamente a semaforina-4D (SEMA4D) y una cantidad eficaz de al menos otra terapia inmunomoduladora para el sujeto si el nivel de linfocitos B, linfocitos T o de linfocitos T y linfocitos B del sujeto está por encima de un nivel umbral predeterminado, o está por encima del nivel de linfocitos B, linfocitos T o de linfocitos T y linfocitos B en una o más muestras de control.

La divulgación también proporciona un procedimiento para tratar a un sujeto, por ejemplo, un paciente con cáncer, que comprende (a) medir el nivel de linfocitos B, linfocitos T o de linfocitos T y linfocitos B en una muestra obtenida de un sujeto, por ejemplo, un paciente con cáncer, en el que se mide el nivel de linfocitos B, linfocitos T o de linfocitos T y linfocitos B del sujeto en la muestra, por ejemplo, en un ensayo inmunofenotípico basado en citometría; (b) determinar si el nivel de linfocitos B, linfocitos T o de linfocitos T y linfocitos B en la muestra está por encima de un nivel umbral predeterminado, o está por encima del nivel de linfocitos B, linfocitos T o de linfocitos T y linfocitos B en una o más muestras de control; y, (c) aconsejar, instruir o autorizar a un proveedor de asistencia sanitaria a administrar una cantidad eficaz de una molécula de unión aislada que se une específicamente a la semaforina-4D (SEMA4D) y una cantidad eficaz de al menos otra terapia inmunomoduladora al sujeto si el nivel de linfocitos B, linfocitos T o de linfocitos T y linfocitos B del sujeto está por encima de un nivel umbral predeterminado, o está por encima del nivel de linfocitos B, linfocitos T o de linfocitos T y linfocitos B en una o más muestras de control.

En algunos aspectos, el nivel de linfocitos B, linfocitos T o de linfocitos T y linfocitos B del sujeto se puede medir en un ensayo inmunofenotípico basado en citometría. En ciertos aspectos, el ensayo puede realizarse en una muestra obtenida del sujeto, por el profesional de la salud que trata al paciente, por ejemplo, usando un ensayo como se describe en el presente documento, formulado como un kit de diagnóstico de "punto de atención". En algunos aspectos, se puede obtener una muestra del sujeto y se puede enviar, por ejemplo, a un laboratorio clínico, para medir el nivel de linfocitos B, linfocitos T o linfocitos T y linfocitos B en la muestra según a las instrucciones del profesional de la salud, incluido, entre otros, el uso de un ensayo inmunofenotípico basado en citometría como se describe en el presente documento. En ciertos aspectos, el laboratorio clínico que realiza el ensayo puede aconsejar al proveedor de asistencia sanitaria o un proveedor de beneficios de asistencia sanitaria sobre si el sujeto puede beneficiarse del tratamiento con una cantidad eficaz de una molécula de unión aislada que se une específicamente a la semaforina-4D (SEMA4D) y a una cantidad eficaz de al menos otra terapia inmunomoduladora, si el nivel de linfocitos B, linfocitos T o de linfocitos T y linfocitos B está por encima de un nivel umbral predeterminado, o está por encima del nivel de linfocitos B, linfocitos T, o de linfocitos T y linfocitos B en una o más muestras de control.

En ciertos aspectos, los resultados de un inmunoensayo tal como se proporciona en el presente documento pueden presentarse a un proveedor de beneficios de asistencia sanitaria para determinar si el seguro del paciente cubrirá el tratamiento con una molécula de unión aislada que se une específicamente a la semaforina-4D (SEMA4D) y al menos otra terapia inmunomoduladora.

VII. Composiciones farmacéuticas y procedimientos de administración

Los procedimientos de preparación y administración de moléculas de unión a anti-SEMA4D, p. ej., anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno, variantes, o derivados de los mismos como un único agente o en combinación con al menos otra terapia inmunomoduladora a un sujeto en necesidad de los mismos son muy conocidos o son fácilmente determinados por aquellos expertos en la materia. La vía de administración de la molécula de unión a anti-SEMA4D, p. ej., anticuerpo o fragmento de unión al antígeno, variante o derivado del mismo como un agente único o en combinación con al menos otra terapia inmunomoduladora, puede ser, por ejemplo, oral, parenteral, por inhalación o tópica a la vez o en momentos diferentes para cada agente terapéutico. El término parenteral, como se usa en el presente documento, incluye, p. ej., administración intravenosa, intraarterial, intraperitoneal, intramuscular, subcutánea, rectal o vaginal. Aunque todas estas formas de administración son claramente contempladas como que están dentro del ámbito de la divulgación, un ejemplo de una forma para administración sería una solución para inyección, en particular para inyección intravenosa o intraarterial o goteo. Una composición farmacéutica adecuada para inyección puede comprender un tampón (p. ej., tampón acetato, fosfato o citrato), un tensioactivo (p. ej., polisorbato), opcionalmente un agente estabilizador (p. ej., albúmina humana), etc. Sin embargo, en otros procedimientos compatibles con las enseñanzas en el presente documento, pueden administrarse moléculas de unión a anti-SEMA4D, p. ej., anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno, variantes, o derivados de los mismos o en combinación con al menos otra terapia inmunomoduladora, directamente al sitio de la población celular adversa, aumentado así la exposición del tejido enfermo al agente terapéutico.

Como se analiza en el presente documento, pueden administrarse moléculas de unión a anti-SEMA4D, p. ej., anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno, variantes, o derivados de los mismos como un agente único o en combinación con al menos otra terapia inmunomoduladora, pueden administrarse en una cantidad farmacéuticamente eficaz para el tratamiento *in vivo* de enfermedades tales como trastornos neoplásicos, incluyendo tumores sólidos. En este sentido, se apreciará que las moléculas de unión desveladas pueden formularse para facilitar la administración y promover la estabilidad del agente activo. En ciertas realizaciones, las composiciones farmacéuticas según la presente divulgación comprenden un vehículo estéril farmacéuticamente aceptable, no tóxico, tal como solución salina fisiológica, tampones no tóxicos, conservantes y similares. Para los fines de la presente solicitud, debe mantenerse

una cantidad farmacéuticamente eficaz de moléculas de unión a anti-SEMA4D, p. ej., un anticuerpo, o un fragmento de unión al antígeno, variante o derivado del mismo, como un agente único o en combinación con al menos otra terapia inmunomoduladora que significa una cantidad suficiente para lograr la unión eficaz a una diana y para lograr un beneficio, es decir, para inhibir, retrasar o reducir la metástasis en un paciente de cáncer.

- 5 Las composiciones farmacéuticas usadas en la presente divulgación comprenden vehículos farmacéuticamente, que incluyen, p. ej., intercambiadores iónicos, alúmina, estearato de aluminio, lecitina, proteínas del suero, tales como seroalbúmina humana, sustancias tampón tales como fosfatos, glicina, ácido sórbico, sorbato potásico, mezclas de glicéridos parciales de ácidos grasos vegetales saturados, agua, sales o electrolitos, tales como sulfato de protamina, hidrogenofosfato disódico, hidrogenofosfato potásico, cloruro de sodio, sales de zinc, sílice coloidal, trisilicato de
10 magnesio, polivinilpirrolidona, sustancias a base de celulosa, polietilenglicol, carboximetilcelulosa de sodio, poliácridatos, ceras, polímeros en bloque de polietileno-polioxiopropileno, polietilenglicol y grasa de lana.

Preparaciones para administración parenteral incluyen soluciones, suspensiones y emulsiones estériles acuosas o no acuosas. Ejemplos de disolventes no acuosos son propilenglicol, polietilenglicol, aceites vegetales tales como aceite de oliva, y ésteres orgánicos inyectables tales como oleato de etilo. Vehículos acuosos incluyen, p. ej., agua,
15 soluciones alcohólicas/acuosas, emulsiones o suspensiones, que incluyen solución salina y medios tamponados. Los vehículos farmacéuticamente aceptables pueden incluir, entre otros, 0,01-0,1 M, o aproximadamente tampón fosfato 0,05 M o solución salina al 0,8 %. Otros vehículos parenterales comunes incluyen soluciones de fosfato de sodio, dextrosa de Ringer, dextrosa y cloruro sódico, Ringer con lactato, o aceites no volátiles. Vehículos intravenosos incluyen recargadores de fluidos y de nutrientes, recargadores de electrolitos, tales como aquellos a base de dextrosa
20 de Ringer, y similares. También pueden estar presentes conservantes y otros aditivos tales como, por ejemplo, antimicrobianos, antioxidantes, agentes quelantes y gases inertes, y similares.

Más particularmente, las composiciones farmacéuticas adecuadas para uso inyectable incluyen soluciones o dispersiones acuosas estériles (en las que son solubles en agua) y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles. En tales casos, la composición ha puede ser estéril y debe ser fluida en la medida en que exista fácil inyectabilidad. Debe ser estable en las condiciones de fabricación y almacenaje y puede estar preservada contra la acción contaminante de microorganismos, tales como bacterias y hongos. El vehículo puede ser un disolvente o un medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, polioliol (p. ej., glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido, y similares), y mezclas adecuadas de los mismos. Puede mantenerse la fluidez adecuada, por ejemplo, mediante la utilización de un recubrimiento como la lecitina, por el mantenimiento de un determinado tamaño de partícula en el caso de dispersión y usando tensioactivos. Las formulaciones adecuadas para su uso en los procedimientos terapéuticos desvelados en el presente documento se describen en Remington's
25 Pharmaceutical Sciences (Mack Publishing Co.) 16ª ed. (1980).

La prevención de la acción de microorganismos pueden lograrse por diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido ascórbico, timerosal y similares. En determinadas realizaciones, pueden ser incluidos en la composición agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes, tales como manitol, sorbitol, o cloruro de sodio. La absorción prolongada de las composiciones inyectables puede lograrse incluyendo en la composición un agente que retrasa la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

En cualquier caso, pueden prepararse soluciones inyectables estériles incorporando un compuesto activo (p. ej., un anticuerpo anti-SEMA4D, o un fragmento de unión al antígeno, variante o derivado del mismo, por sí mismo o en combinación al menos otra terapia inmunomoduladora) en una determinada cantidad requerida en un disolvente apropiado con uno o una combinación de componentes enumerados en el presente documento, según se requiera, seguido de esterilización por filtración. Generalmente, se preparan dispersiones incorporando el compuesto activo en un vehículo estéril, que contiene un medio de dispersión básico y los otros componentes de los enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los procedimientos de preparación pueden incluir el secado al vacío o la liofilización, que puede producir un polvo de un principio activo más cualquier ingrediente deseado adicional a partir de una solución previamente esterilizada por filtración del mismo. Las preparaciones para inyecciones se procesan, se envasan en recipientes tales como ampollas, bolsas, botellas, jeringas o viales, y se sellan bajo condiciones asépticas según procedimientos conocidos en la técnica. Además, Las preparaciones pueden envasarse y venderse en forma de un kit. Tales artículos de fabricación pueden tener etiquetas o prospectos que indican que las composiciones asociadas son útiles para tratar un sujeto que
40
45
50 padece, o está predispuesto a una enfermedad o trastorno.

Las formulaciones parenterales pueden ser una dosis en bolo única, una infusión o una dosis de bolo de carga seguida de una dosis de mantenimiento. Estas composiciones pueden administrarse a intervalos fijos o variables específicos, p. ej., una vez al día, o en una base "según sea necesario".

55 Ciertas composiciones farmacéuticas pueden administrarse por vía oral en una forma de dosificación aceptable que incluye, p. ej., cápsulas, comprimidos, suspensiones o soluciones acuosas. Ciertas composiciones farmacéuticas también se pueden administrar por aerosol nasal o inhalación. Tales composiciones pueden prepararse como soluciones en solución salina, empleando alcohol bencílico u otros conservantes adecuados, promotores de la absorción para potenciar la biodisponibilidad, y/u otros agentes solubilizantes o dispersantes convencionales.

La cantidad de una molécula de unión a anti-SEMA4D, p. ej., anticuerpo o fragmento, variante o derivado del mismo, como un agente único o en combinación con al menos otra terapia inmunomoduladora a combinar con los materiales de vehículo para producir una forma de dosificación única variará dependiendo del huésped tratado y el modo de administración particular. La composición puede administrarse como una dosis única, dosis múltiple o durante un periodo de tiempo establecido en una infusión. Los regímenes de dosificación también se pueden ajustar para proporcionar la óptima respuesta deseada (p. ej., una respuesta terapéutica o profiláctica).

En consonancia con el ámbito de la presente divulgación, pueden administrarse anticuerpos anti-SEMA4D, o fragmentos de unión al antígeno, variantes o derivados de los mismos como un agente único o en combinación con al menos otra terapia inmunomoduladora a un ser humano u otro animal según los procedimientos mencionados anteriormente de tratamiento en una cantidad suficiente para producir un efecto terapéutico. Los anticuerpos anti-SEMA4D, o fragmentos de unión al antígeno, variantes o derivados de los mismos como un agente único o en combinación con al menos otra terapia inmunomoduladora pueden administrarse a tal ser humano u otro animal en una forma de dosificación convencional preparada combinando el anticuerpo proporcionado en el presente documento con un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable convencional según técnicas conocidas. Un experto en la materia reconocerá que la forma y carácter del vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable están dictados por la cantidad de principio activo con la que va a combinarse, la vía de administración y otras variables muy conocidas. Los expertos en la materia apreciarán además que puede usarse un cóctel que comprende una o más especies de moléculas de unión a anti-SEMA4D, p. ej., anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno, variantes o derivados de los mismos, tal como se proporcionan en el presente documento.

Por "dosis o cantidad terapéuticamente eficaz" o "cantidad eficaz" se tiene por objeto una cantidad de molécula de unión a anti-SEMA4D, p. ej., anticuerpo o fragmento de unión al antígeno, variante o derivado del mismo, como un agente único o en combinación con al menos otra terapia inmunomoduladora que cuando se administra provoca una respuesta terapéutica positiva con respecto al tratamiento de un paciente con una enfermedad a tratar, por ejemplo, una inhibición, retraso o reducción de la metástasis en el paciente.

Las dosis terapéuticas eficaces de las composiciones de la presente divulgación, para la inhibición, el retraso o la reducción de la metástasis, varían dependiendo de muchos factores diferentes, incluyendo medios de administración, sitio diana, estado fisiológico del paciente, si el paciente es un ser humano o animal, otros medicamentos administrados, y si el tratamiento es profiláctico o terapéutico. En ciertas realizaciones, el paciente es un ser humano, pero también pueden tratarse mamíferos no humanos que incluyen mamíferos transgénicos. Pueden valorarse dosificaciones de tratamiento usando procedimientos rutinarios conocidos por los expertos en la materia para optimizar la seguridad y eficacia.

La cantidad de una molécula de unión a anti-SEMA4D, p. ej., anticuerpo o fragmento de unión, variante o derivado del mismo, administrada como un agente único o en combinación con al menos otra terapia inmunomoduladora es fácilmente determinada por un experto en la materia sin experimentación indebida dada la divulgación de la presente divulgación. Los factores que influyen en el modo de administración y la cantidad respectiva de una molécula de unión a anti-SEMA4D, p. ej., anticuerpo, fragmento de unión al antígeno, variante o derivado del mismo a administrar como un agente único o en combinación con al menos otra terapia inmunomoduladora incluyen, entre otros, la gravedad de la enfermedad, el historial de la enfermedad, la probabilidad de metástasis y la edad, altura, peso, salud y condición física del individuo que recibe la terapia. De la misma forma, la cantidad de una molécula de unión a anti-SEMA4D, p. ej., anticuerpo o fragmento, variante o derivado del mismo, como un agente único o en combinación con al menos otra terapia inmunomoduladora a administrar dependerá del modo de administración y si el sujeto recibirá una dosis única o dosis múltiples de este agente.

La divulgación también proporciona el uso de una molécula de unión a anti-SEMA4D, p. ej., anticuerpo, o fragmento de unión al antígeno, variante o derivado del mismo, como un agente único o en combinación con al menos otra terapia inmunomoduladora en la fabricación de un medicamento para tratar un sujeto con un cáncer, en la que el medicamento se usa en un sujeto que ha sido pretratado con al menos otra terapia. Por "pretratado" o "pretratamiento" se tiene por objeto que el sujeto haya recibido una o más de otras terapias (p. ej., ha sido tratado con al menos otra terapia de cáncer) antes de recibir el medicamento que comprende la molécula de unión a anti-SEMA4D, p. ej., anticuerpo o fragmento de unión al antígeno, variante o derivado del mismo como un agente único o en combinación con al menos otra terapia inmunomoduladora. "Pretratado" o "pretratamiento" incluye sujetos que han sido tratados con al menos otra terapia en el plazo de 2 años, en el plazo de 18 meses, en el plazo de 1 año, en el plazo de 6 meses, en el plazo de 2 meses, en el plazo de 6 semanas, en el plazo de 1 mes, en el plazo de 4 semanas, en el plazo de 3 semanas, en el plazo de 2 semanas, en el plazo de 1 semana, en el plazo de 6 días, en el plazo de 5 días, en el plazo de 4 días, en el plazo de 3 días, en el plazo de 2 días, o incluso en el plazo de 1 día antes del inicio del tratamiento con el medicamento que comprende la molécula de unión a anti-SEMA4D, por ejemplo, el anticuerpo monoclonal VX15/2503 desvelado en el presente documento, o fragmento de unión al antígeno, variante o derivado del mismo como un agente único o en combinación con al menos otra terapia inmunomoduladora. No es necesario que el sujeto sea un respondedor al pretratamiento con la terapia o terapias previas. De este modo, el sujeto que recibe el medicamento que comprende la molécula de unión a anti-SEMA4D, p. ej., un anticuerpo, o un fragmento de unión al antígeno, variante o derivado del mismo como un agente único o en combinación con al menos otra terapia inmunomoduladora podría haber respondido, podría haber dejado de responder (por ejemplo, el cáncer fue refractario) al pretratamiento con la terapia previa, o a una o más de las terapias previas en las que el pretratamiento comprendió terapias múltiples.

- Ejemplos de otras terapias contra el cáncer para las cuales un sujeto puede haber recibido un tratamiento previo antes de recibir el medicamento que comprende la molécula de unión anti-SEMA4D, por ejemplo, fragmento, variante o derivado de unión a anticuerpo o antígeno del mismo como un agente único o en combinación con al menos otra terapia inmunomoduladora incluye, entre otras, cirugía; radioterapia; quimioterapia, opcionalmente en combinación con trasplante autólogo de médula ósea, en el que los agentes quimioterapéuticos adecuados incluyen, pero no se limitan a, los enumerados anteriormente en el presente documento; otra terapia de anticuerpos monoclonales anticancerígenos; terapia contra el cáncer basada en moléculas pequeñas, incluidas, entre otras, las moléculas pequeñas enumeradas anteriormente en el presente documento; terapias contra el cáncer basadas en vacunas / inmunoterapia; terapia con esteroides; otra terapia contra el cáncer; o cualquier combinación de los mismos.
- La práctica de la presente divulgación empleará, a menos que se indique lo contrario, técnicas convencionales de biología celular, cultivo celular, biología molecular, biología transgénica, microbiología, ADN recombinante e inmunología, que están dentro de las habilidades en la técnica. Tales técnicas se explican detalladamente en la literatura. Véanse, por ejemplo, Sambrook y col., ed. (1989) *Molecular Cloning A Laboratory Manual* (2ª ed.; Cold Spring Harbor Laboratory Press); Sambrook y col., ed. (1992) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, (Cold Springs Harbor Laboratory, NY); D. N. Glover ed., (1985) *DNA Cloning*, Volúmenes I y II; Gait, ed. (1984) *Oligonucleotide Synthesis*; Mullis y col., patente de EE. UU. n.º 4.683.195; Hames y Higgins, eds. (1984) *Nucleic Acid Hybridization*; Hames y 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 y Calos eds. (1987) *Gene Transfer Vectors For Mammalian Cells*, (Cold Spring Harbor Laboratory); Wu y col., eds., *Methods in Enzymology*, Vols. 154 y 155; Mayer y Walker, eds. (1987) *Immunochemical Methods In Cell And Molecular Biology* (Academic Press, Londres); Weir y Blackwell, eds., (1986) *Handbook Of Experimental Immunology*, Volúmenes I-IV; *Manipulating the Mouse Embryo*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., (1986); y en Ausubel y col. (1989) *Current Protocols in Molecular Biology* (John Wiley y Sons, Baltimore, Md.).
- Principios generales de la genomanipulación de anticuerpos se exponen en Borrebaeck, ed. (1995) *Antibody Engineering* (2ª ed.; Oxford Univ. Press). Principios generales de la genomanipulación de proteínas se exponen en Rickwood y col., eds. (1995) *Protein Engineering, A Practical Approach* (IRL Press at Oxford Univ. Press, Oxford, Eng.). Principios generales de anticuerpos y unión de anticuerpo-hapteno se exponen en: Nisonoff (1984) *Molecular Immunology* (2ª ed.; Sinauer Associates, Sunderland, Mass.); y Steward (1984) *Antibodies, Their Structure and Function* (Chapman y Hall, Nueva York, N.Y.). Adicionalmente, los procedimientos convencionales en inmunología conocidos en la técnica y no descritos específicamente son generalmente seguidos como en *Current Protocols in Immunology*, John Wiley & Sons, Nueva York; Stites y col., eds. (1994) *Basic and Clinical Immunology* (8ª ed; Appleton & Lange, Norwalk, Conn.) y Mishell and Shiigi (eds) (1980) *Selected Methods in Cellular Immunology* (W.H. Freeman y Co., NY).
- Los trabajos de referencia convencionales que exponen principios generales de inmunología incluyen *Current Protocols in Immunology*, John Wiley & Sons, Nueva York; Klein (1982) J., *Immunology: The Science of Self-Nonself Discrimination* (John Wiley & Sons, NY); Kennett y col., 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 y col., (Elsevier, Ámsterdam); Goldsby y col., eds. (2000) *Kuby Immunology* (4ª ed.; H. Freeman & Co.); Roitt y col. (2001) *Immunology* (6ª ed.; Londres: Mosby); Abbas y col. (2005) *Cellular and Molecular Immunology* (5ª ed.; Elsevier Health Sciences Division); Kontermann y Dubel (2001) *Antibody Engineering* (Springer Verlag); Sambrook y Russell (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Press); Lewin (2003) *Genes VIII* (Prentice Hall 2003); Harlow y Lane (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Press); Dieffenbach and Dveksler (2003) *PCR Primer* (Cold Spring Harbor Press).

Los siguientes ejemplos se presentan como ilustración.

Ejemplos

Ejemplo 1: Prueba de la capacidad de un anticuerpo anti-SEMA4D para retrasar el crecimiento tumoral en ratones inmunocompetentes

- Diseño experimental.** El diseño experimental básico es el siguiente. Las células tumorales Colon26 se implantaron por vía subcutánea en el flanco de ratones Balb/c inmunocompetentes singénicos (5×10^5 células) o ratones SCID inmunodeficientes (1×10^5 células) en solución salina de 0,2 ml. El tratamiento con Ig 2B8 de control o Ab 67 anti-SEMA4D se inició el día 2 después del implante tumoral. Los ratones ($n = 20$) se trataron dos veces por semana con 1,0 mg (aproximadamente 50 mg/kg) de anticuerpo monoclonal mediante inyección intraperitoneal (IP). Los tumores se midieron con calibradores 3 veces/semana comenzando 3 días después del implante. Los ratones se pesaron 2 veces/semana a partir del día 3. Los animales se sacrificaron cuando el volumen del tumor alcanzó 1000 mm^3 .

El tratamiento con anti-SEMA4D retrasó el crecimiento tumoral en ratones con sistema inmunitario competente. El crecimiento del tumor se midió mediante calibradores y las mediciones se usaron para calcular el volumen del tumor usando la fórmula $(a^2 \times l) / 2$, donde a = ancho, medición más pequeña y l = longitud, en mm, del

tumor. El volumen tumoral medio (Figura 1A) y las curvas de supervivencia de Kaplan Meier (Figura 1B), definidas como el tiempo hasta la finalización en la que el volumen tumoral = 1000 mm³, se muestran en las Figs 1A y 1B. El análisis estadístico se realizó mediante el análisis de varianza bidireccional (ANOVA) y el análisis de Log Rank, respectivamente, que mostraron un efecto de tratamiento estadísticamente significativo con el anticuerpo anti-SEMA4D en ratones Balb/c.

Se logró un retraso del crecimiento tumoral del 29% (29%) en ratones Balb / c, sin embargo, no se observó un retraso del crecimiento tumoral relacionado con el tratamiento en ratones SCID. El retraso del crecimiento tumoral (TGD), se define como el aumento en la mediana del tiempo hasta la finalización (THF) en un grupo de tratamiento en comparación con el grupo control: % TGD = [(TC) / C] x 100, donde T = mediana del THF para un grupo de tratamiento, C = mediana del THF para el grupo de control. Los animales Balb/c tratados con anticuerpo anti-SEMA4D 67 mostraron una reducción estadísticamente significativa en el volumen del tumor primario en el momento del sacrificio sobre los animales control (P <0,0001). Este hallazgo muestra que el anticuerpo anti-SEMA4D fue eficaz para retrasar el crecimiento tumoral en ratones con un sistema inmunitario competente, pero no en ratones inmunodeficientes.

Ejemplo 2: Prueba de la capacidad de un anticuerpo anti-SEMA4D para retrasar el crecimiento tumoral en presencia de linfocitos T CD8+ efectores

Diseño experimental. Se implantaron células tumorales Colon26 por vía subcutánea en el flanco de ratones Balb/c (5x10⁵ células en 0,2 ml de solución salina). El anticuerpo anti-CD8 agotador (Clon 2.43, BioXCell) o el Ig de rata de control (Clon LTF-2, BioXCell) (150 mg/kg) se administraron mediante inyección intraperitoneal (IP) en los días -1, 0, 1, 11 y semanalmente a partir de entonces. El tratamiento con Ig 2B8 de control o Ab 67 anti-SEMA4D se inició el día 2. Los ratones (n = 20) se trataron dos veces por semana con 1,0 mg (aproximadamente 50 mg/kg) de anticuerpo monoclonal mediante inyección intraperitoneal. Los tumores se midieron con calibradores 3 veces/semana comenzando 3 días después del implante. Los animales se sacrificaron cuando el volumen tumoral medio del grupo de control alcanzó 1000 mm³, el día 30 para los grupos tratados con Ig de rata y el día 26 para los grupos tratados con anti-CD8.

El tratamiento con anti-SEMA4D retrasó el crecimiento tumoral en presencia de linfocitos T CD8 +. El volumen del tumor se midió mediante calibradores utilizando la fórmula (a² x l) / 2, donde a = ancho, medición más pequeña y l = longitud, en mm, del tumor. Las diferencias estadísticas en el volumen del tumor se determinaron usando un análisis de varianza unidireccional de dos colas (ANOVA) que compara los grupos tratados con anticuerpos con el grupo de Ig 2B8 de control. El volumen tumoral medio se muestra en la FIG. 2.

También se determinó la inhibición del crecimiento tumoral. La inhibición del crecimiento tumoral (TGI) se midió usando la siguiente fórmula: % TGI = 1 - [(Tf-Ti) / media (Cf-Ci)]; El% de TGI informado es la media de % de TGI para cada tumor tratado. Las diferencias estadísticas en el volumen del tumor se determinaron utilizando un análisis de varianza unidireccional de dos colas (ANOVA) seguido de la prueba de comparaciones múltiples de Dunnett que compara los grupos tratados con el grupo control 2B8. El 30 por ciento (30%) de inhibición del crecimiento tumoral se logró después del tratamiento con anticuerpo anti-SEMA4D, sin embargo, no se observó ningún efecto relacionado con el tratamiento cuando se agotaron los linfocitos T CD8 +. Estos resultados muestran que la inhibición del crecimiento tumoral con anti-SEMA4D dependía de la presencia de linfocitos T CD8+ efectores.

Ejemplo 3: Prueba de la capacidad de un anticuerpo anti-SEMA4D para aumentar la densidad de linfocitos infiltrantes de tumores (LIT)

Diseño experimental. Las células tumorales Colon26 se implantaron por vía subcutánea en un flanco de ratones Balb/c (5x10⁵ células en solución salina de 0,2 ml). El tratamiento con Ig 2B8 de control o Ab 67 anti-SEMA4D se inició el día 2 (50 mg/kg IP, dos veces por semana, n = 10). Los tumores se midieron con calibradores 3 veces/semana comenzando 3 días después del implante. Los animales se sacrificaron el día 27, cuando el volumen tumoral medio del grupo de control alcanzó los 1000 mm³. Los tumores, incluido el estroma y la piel circundantes, se recogieron y fijaron en formalina durante 24 horas, luego se transfirieron a etanol al 70%. Luego se procesaron las muestras para inclusión en parafina y se cortaron secciones de 5 micrómetros de los bloques resultantes.

Las secciones adyacentes se tiñeron para Sema4D, CD8 y CD20 utilizando los siguientes procedimientos:

a. Para la detección de Sema4D, los portaobjetos se cocieron a 60 °C durante 1 hora, luego se desparafinaron y se rehidrataron a través de xileno y baños de etanol graduados. La recuperación del epítipo se llevó a cabo hirviendo durante 20 minutos con solución Target Recovery Recovery Solution (Dako, Carpintería, CA) seguido de un enfriamiento de 30 minutos. Los portaobjetos se lavaron dos veces con PBS que contenía Tween-20 al 0,05 % (TPBS), luego se inactivaron las peroxidases endógenas con un bloqueo de 10 minutos con bloqueo de doble enzima (Dako, Carpintería, CA). Los portaobjetos se lavaron con TPBS dos veces, luego se bloqueó la unión no específica mediante una incubación de 20 minutos con suero de cabra normal al 2,5% en TPBS. Después de un solo lavado con TPBS, los portaobjetos se incubaron durante 60 minutos con anti-Sema4D de conejo a 2 mg/ml en TPBS, seguido de 2 lavados con TPBS. Luego, los portaobjetos se incubaron durante 20 minutos con un polímero anti-conejo de cabra marcado con Envision HRP (Dako, Carpintería, CA) seguido de 2 lavados con TPBS y una incubación DAB + de 5 minutos (Dako, Carpintería, CA). Las secciones fueron teñidas con hematoxilina

Harris, destañadas, azuladas con agua corriente, deshidratadas, y no acuosas montadas con Permount.

b. Se detectó CD8 usando el procedimiento anterior, pero usando un anticuerpo policlonal de conejo comercial (Abbiotec) a 2 mg/ml.

5 c. Se detectó CD20 usando el procedimiento anterior, pero usando suero de burro normal para el bloqueo, y usando un anticuerpo primario de cabra anti-CD20 (Santa Cruz) a 1 mg/ml seguido de una incubación de 20 minutos con anticuerpo anti-cabra marcado con HRP (Golden Bridge).

d. Los portaobjetos se fotografiaron con un aumento de 20X usando una cámara Retiga QICAM-12 bit acoplada a un microscopio Olympus Ix50.

10 **El tratamiento anti-SEMA4D aumentó la frecuencia de células inmunes infiltrantes de tumor (LIT).** La densidad de células inmunitarias se midió escaneando secciones de todo el tumor, cuantificando áreas de linfocitos infiltrantes de tumores CD8 + o CD20 + (LIT), y luego normalizándolas al área total del tumor. Se utilizaron secciones de 9 (Ig de control) o 10 (Ab 67 anti-SEMA4D) ratones por grupo para el análisis. La significación estadística se calculó para CD8 y CD20 utilizando la prueba T no emparejada de dos colas con un IC del 95%.

15 El tratamiento de tumores de Colon26 con el anticuerpo 67 anti-SEMA4D dio como resultado un aumento tanto en la densidad de linfocitos T CD8 + como en la densidad de linfocitos T CD20 +, en comparación con el grupo control. El aumento en la densidad de los linfocitos T CD20 + fue estadísticamente significativo al 95% con un P-valor de 0,0388. El aumento en la densidad de los linfocitos T CD8 + mostró una tendencia pero no fue estadísticamente significativo. Estos hallazgos muestran que el tratamiento anti-SEMA4D de los tumores Colon26 resultó en una mayor frecuencia de células inmunitarias infiltrantes de tumores. Los resultados se muestran gráficamente en las Figs. 3A y 3B.

20 **Ejemplo 4: Prueba de la capacidad de un anticuerpo anti-SEMA4D para afectar a la migración y a la distribución de subconjuntos de macrófagos M1 y M2 y linfocitos T CD8 + en el borde de ataque del tumor.**

El tratamiento anti-SEMA4D alteró la distribución de macrófagos y linfocitos T CD8 + en el borde de ataque del tumor.

25 La distribución de macrófagos se midió escaneando secciones de todo el tumor, cuantificando el área de M1 (tinción con anti-F4/80 de rata conjugada con Alexa647 (Biolegend, clon BM8) a 2 mg/ml) y M2 (tinción con anti-CD206 de rata conjugado con biotina (Biolegend, clon C068C2) a 2 mg/ml) y luego se normaliza al área total del tumor para determinar la densidad de M1 y M2 dentro del tumor. Se utilizaron secciones de 9 (Ig de control) o 10 (Ab 67 anti-SEMA4D) ratones tratados por grupo para el análisis. Para determinar la densidad celular en el frente de crecimiento del tumor, se definió una región de 300 píxeles de ancho (250 micrómetros) desde el borde del tumor. La significación estadística para M1 y M2 se calculó utilizando ANOVA unidireccional con Kruskal-Wallace y la prueba post-hoc de Dunn para un IC del 95%. El cambio en la densidad del macrófago M1 normalizado al borde delantero del tumor fue significativo.

30 Se midieron los números de linfocitos T CD8 + en secciones de tumor completas teñidas con anticuerpo anti-CD8 (Abbiotec n.º de Cat 250596 a 1:250) y sistema de detección DAB. El número de eventos CD8+ en secciones tumorales completas se enumeró después del umbral para la señal positiva usando el software Imagepro. La densidad de CD8 + para cada animal se calculó dividiendo el número de eventos de CD8+ entre el área total de píxeles del tumor. Se promediaron las densidades individuales de CD8 para llegar a la distribución de linfocitos T CD8 + en animales tratados con 2B8 y mAb67 (n = 10). La significación estadística se calculó utilizando ANOVA unidireccional con Kruskal-Wallace y la prueba post hoc de Dunn para un IC del 95%.

35 La distribución de SEMA4D se midió escaneando secciones de todo el tumor teñido para SEMA4D con un anticuerpo contra un epítipo distinto del reconocido por Ab 67 y analizando la distribución de Sema4D. Se utilizaron secciones de 9 (Ig de control) o 10 (Ab 67 anti-SEMA4D) ratones tratados por grupo para el análisis.

40 Las células tumorales Colon26 expresaron niveles bajos de SEMA4D cuando se cultivaron *in vitro*, pero SEMA4D se reguló positivamente *in vivo* en el borde de ataque del tumor. Esto condujo al establecimiento de un gradiente de expresión de SEMA4D con alta concentración en la periferia del tumor. El tratamiento con anticuerpo anti-SEMA4D neutralizó SEMA4D e interrumpió el gradiente de expresión. Esto dio como resultado un cambio sorprendente en la migración y distribución de macrófagos, como se muestra en la FIG. 4A. En particular, los tumores tratados con Ab 67 anti-SEMA4D tenían niveles más altos de macrófagos proinflamatorios M1 + en el borde de ataque al tumor como se muestra en la FIG. 4B. El aumento de macrófagos M1 + fue estadísticamente significativo. Los tumores tratados con Ab 67 anti-SEMA4D también mostraron una disminución en la frecuencia de macrófagos M2 pro-tumorales en el borde de ataque del tumor como se muestra en la FIG. 4C. Estos hallazgos mostraron que el tratamiento con Ab 67 anti-SEMA4D alteró la distribución de macrófagos de una manera que aumentó la densidad de macrófagos inhibidores de tumores, es decir, M1, en el borde de ataque del tumor, mientras que disminuyó la presencia de macrófagos promotores de tumores, es decir, M2, en esa misma región. Además, estos hallazgos mostraron un aumento general en la densidad de linfocitos T CD8 + dentro de tumores aislados de ratones tratados con MAb 67, como se muestra en la FIG. 4D. Estos hallazgos sugieren que la neutralización de SEMA4D con MAb 67-2 facilita la entrada de macrófagos M1 antitumorales en la zona de células tumorales altamente proliferativas y linfocitos T CD8 + en toda la zona y se extiende hasta el borde de ataque (recuadro).

Ejemplo 5: Prueba de la capacidad de un anticuerpo anti-SEMA4D para retrasar el crecimiento tumoral en

ratones cuando se usa en combinación con anticuerpos anti-CTLA4

Diseño experimental. Se implantaron 5×10^5 células tumorales Colon26 por vía subcutánea en el flanco de ratones Balb/c hembra. El tratamiento con IgG1/2B8 de ratón de control o anti-SEMA4D/MAb 67-2 se inició 1 día después de la inoculación (50 mg / kg, IP, semanalmente x 5), con o sin anti-CTLA4 / MAb UC10-4F10-11 (100 mg en el día 8 y 50 mg en los días 11 y 14 después de la inoculación del tumor). El tratamiento con anti-PD1/RMP1-14 se inició 1 día después de la inoculación (100 mg el día 3, dos veces por semana) en combinación con anti-CTLA4 / MAb UC10-4F10-11. Había 20 ratones por grupo. Los tumores se midieron con calibradores 2x/semana comenzando 5 días después del implante. Los animales se sacrificaron cuando el volumen del tumor alcanzó 1000 mm^3 .

La combinación de anticuerpos anti-SEMA4D y anti-CTLA4 retrasó el crecimiento tumoral en ratones. El crecimiento del tumor se midió mediante calibradores y las mediciones se usaron para calcular el volumen del tumor usando la fórmula $(a^2 \times l) / 2$, donde a = ancho, medición más pequeña y l = longitud, en mm, del tumor. El volumen tumoral medio y las curvas de supervivencia de Kaplan Meier, definidas como el tiempo hasta el punto final donde el volumen tumoral = 1000 mm^3 , se muestran en las Figs. 5A y 5B, respectivamente. El análisis estadístico se realizó utilizando el análisis de variación de dos vías (ANOVA) y el análisis de Log Rank, respectivamente, que mostraron un efecto de tratamiento estadísticamente significativo con el anticuerpo anti-SEMA4D (9% de retraso del crecimiento tumoral, TGD **) y el anticuerpo anti-CTLA4 (2% de TGD, ns), y un aumento muy significativo en el retraso del crecimiento tumoral con la combinación de anticuerpos anti-SEMA4D y anti-CTLA4 (TGD máximo, 114% ****). Las respuestas fueron duraderas durante al menos 60 días.

También se determinó la frecuencia de regresiones tumorales en el modelo de tumor de Colon 26. La regresión es la falta de tumor palpable, definido por un tumor que mide $<50 \text{ mm}^3$ para al menos dos mediciones consecutivas. Como se muestra en la FIG. 5C, la combinación de anticuerpos anti-SEMA4D y anti-CTLA4 aumenta el número de regresiones en el modelo tumoral Colon26. Las regresiones para la terapia de combinación (anticuerpos anti-SEMA4D + antiCTLA4) son estadísticamente significativas en comparación con la Ig de control ($p < 0,0001$) y en comparación con las monoterapias anti-CTLA4 o anti-SEMA4D ($p = 0,0022$), según lo determinado por la prueba exacta de Fisher. Es importante destacar que estos hallazgos muestran que la combinación de anticuerpos anti-SEMA4D y anti-CTLA4 fue sinérgica: es decir, la combinación fue significativamente más efectiva, lo que resultó en una mayor frecuencia de regresiones tumorales duraderas, que el tratamiento con anticuerpo anti-SEMA4D solo o solo con anticuerpo anti-CTLA4. Además, estos resultados demuestran que la combinación de anticuerpos anti-SEMA4D y anti-CTLA4 es al menos tan efectiva como, o mejor que, la combinación de anti-PD1 y anti-CTLA4.

Se determinó además que el tratamiento con anticuerpo anti-SEMA4D aumenta la actividad de los CTL reactivos a tumores y también aumenta la actividad de CTL mediada por anti-CTLA4. Se realizó un estudio de seguimiento para examinar el efecto de la monoterapia anti-CTLA, en comparación con la terapia de combinación anti-CTLA4 y anti-SEMA4D sobre la frecuencia de leucocitos infiltrantes de tumores específicos de tumor (LIT) y la secreción de citocinas proinflamatorias. En este estudio de seguimiento, se aislaron células inmunes de tumores y bazos de ratones con tumor de Colon26 tratados *in vivo* con Control IgG1/MAb2B8, anti-CTLA4/MAbUC10-4F10, o la combinación de anti-CTLA4 / MAbUC10-4F10 y anti-SEMA4D / MAb67. Los tejidos se recolectaron el día 15, 1 día después de la dosis final de anticuerpo anti-CTLA4 y justo antes de la regresión del tumor. El total de LIT CD45+ se evaluó para determinar los niveles de citocinas secretadas, y ELISPOT determinó la frecuencia de los linfocitos T CD8 + secretores de IFN γ en presencia de péptido inmunodominante específico de tumor Colon26 restringido por MHC-I. La frecuencia de los respondedores específicos de MHC I se calculó restando el control de medios de los pocillos que contienen péptidos.

Como se muestra en la FIG. 5D, se observaron niveles aumentados de citocinas proinflamatorias IFN γ en los tumores de ratones tratados con monoterapia con anticuerpo anti-CTLA4 ($p = 0,0135$), que se mejoró significativamente después del tratamiento con la terapia de combinación de anti-CTLA4 y anti-SEMA4D ($p = 0,0002$ en comparación con el control o la monoterapia). En la Fig. 5E, se observó una mayor frecuencia de respondedores secretores de IFN γ específicos de péptido en los bazos de ratones tratados con anticuerpo anti-CTLA4. Se esperaba este hallazgo porque se documentó que anti-CTLA4 induce la activación de linfocitos T en la periferia. No se descubrió que la terapia combinada de anti-CTLA4 y anti-SEMA4D mejorara aún más la actividad en el bazo. Por el contrario, se observó un aumento sustancial en la frecuencia de respondedores secretores de IFN γ específicos de péptidos en los LIT después del tratamiento con monoterapia anti-CTLA4, que se mejoró significativamente después del tratamiento con terapia de combinación anti-CTLA4 y anti-SEMA4D. Este hallazgo sugiere que la adición del tratamiento anti-SEMA4D puede mejorar significativamente la actividad de Los linfocitos T CD8 + específicos del tumor de una manera localizada específica del tumor.

Ejemplo 6: Prueba de la capacidad de un anticuerpo anti-SEMA4D para afectar la infiltración tumoral de linfocitos T CD8+ citotóxicos específicos de tumor

El tratamiento con MAb 67-2 aumenta la frecuencia de LIT específicos de tumor y la secreción de citocinas proinflamatorias. Después de cuatro semanas de tratamiento de anti-SEMA4D *in vivo*, los tumores se disociaron y enriquecieron para células CD45 + mediante separación magnética. Los LIT CD45+, agrupados a partir de 5 ratones, se incubaron en presencia y ausencia de péptido tumoral inmunodominante, AH-1, a diversas densidades celulares. Las células secretoras de IFN γ se midieron por ELISPOT; La respuesta específica del péptido se determinó restando el promedio de los pocillos sin péptido. Cada muestra se probó en réplicas de 6 y se grafica arriba. La significación

estadística se determinó con la prueba t no paramétrica de Mann-Whitney.

Se observó un aumento en las células secretoras de IFN γ en ratones tratados con MAb 67 tanto en presencia como en ausencia de péptido, como se muestra en la FIG. 6A, los LIT CD45 + TIL, especialmente los linfocitos T citotóxicos CD8 + específicos de péptido restringidos al MHC-I, representan células efectoras activadas después del tratamiento con MAb 67-2. La FIG. 6B muestra imágenes representativas de ELISPOT. Luego, los LIT CD45+ se cultivaron ex vivo durante 48 horas y se analizaron para determinar la secreción de citocinas usando análisis de CBA. Como se muestra en la FIG. 6C, MAb 67-2 promueve la secreción de citocinas antitumorales, como IFN γ y TNF α , en LIT. La significación estadística se determinó con la prueba t no paramétrica de Mann-Whitney.

Se realizó un estudio de seguimiento para examinar el efecto del tratamiento con MAb 67-2 sobre la frecuencia de leucocitos infiltrantes de tumores específicos de tumor (LIT) y la secreción de citocinas proinflamatorias. En este estudio de seguimiento, se aislaron células inmunes de tumores de ratones con tumor de colon26 tratados in vivo con Control IgG1 / MAb2B8 o anti-SEMA4D / MAb67. El LIT CD45+ total se evaluó para determinar los niveles de citocinas secretadas, y ELISPOT determinó la frecuencia de los linfocitos T CD8 + secretores de IFN γ en presencia de péptido inmunodominante específico de tumor Colon26 restringido por MHC-I. La frecuencia de los respondedores específicos de MHC I se calculó restando el control de medios de los pocillos que contienen péptidos.

Como se muestra en la FIG. 6D, se observaron niveles aumentados de citocinas proinflamatorias IFN γ y TNF α en los LIT de ratones tratados con anticuerpo anti-SEMA4D. Además, como se muestra en la FIG. 6E, se observó una mayor frecuencia de respondedores secretores de IFN γ específicos de péptido en los LIT de ratones tratados con anticuerpo anti-SEMA4D. Este hallazgo sugiere que la adición del tratamiento anti-SEMA4D puede mejorar significativamente la actividad de los linfocitos T CD8 + específicos del tumor de una manera localizada específica del tumor.

Ejemplo 7: Prueba de la capacidad de un anticuerpo anti-SEMA4D para retrasar el crecimiento tumoral en ratones cuando se usa en combinación con anticuerpos anti-PD1

Diseño experimental. Se implantaron 5×10^5 células tumorales Colon26 por vía subcutánea en el costado de ratones Balb/c hembra. El tratamiento con IgG1 / 2B8 de ratón de control o anti-SEMA4D/MAb 67-2 de rata se inició 1 día después de la inoculación (50 mg/kg, IP, semanalmente). Cada grupo de ratones también se trató con Ig de rata de control o anti-PD1 de rata. / MAbRMP1-14 (100 mg, dos veces por semana, X 2 semanas a partir de los 3 días posteriores a la inoculación del tumor). Había 20 ratones por grupo. Los tumores se midieron con calibradores 3 veces por semana comenzando 5 días después del implante. Los animales fueron sacrificados cuando el volumen del tumor alcanzó 1000 mm^3

La combinación de anticuerpos anti-SEMA4D y anti-PD1 retrasó el crecimiento tumoral en ratones. El crecimiento del tumor se midió mediante calibradores y se usaron mediciones para calcular el volumen del tumor usando la fórmula $(a^2 \times l) / 2$, donde a = ancho, la medición más pequeña y l = longitud, en mm, del tumor. El volumen tumoral medio y las curvas de supervivencia de Kaplan Meier, definidas como el tiempo hasta el punto final donde el volumen tumoral = 1000 mm^3 , se muestran en las Figs. 7A y 7B, respectivamente. El análisis estadístico se realizó utilizando el análisis de varianza de dos vías (ANOVA) y el análisis de Log Rank, respectivamente, que mostraron un efecto de tratamiento estadísticamente significativo con el anticuerpo anti-SEMA4D combinado con el anticuerpo anti-PD1 en ratones Balb/c. Estos hallazgos muestran que la combinación de anticuerpos anti-SEMA4D y anti-PD1 fue más efectiva que el tratamiento con anti-SEMA4D o solo con el anticuerpo anti-PD1.

La frecuencia de regresiones en el modelo de tumor de Colon 26 también se midió y se muestra en las Figs. 7C y 7D. La regresión es la falta de tumor palpable, definido por un tumor que mide $<50 \text{ mm}^3$ para al menos dos mediciones consecutivas. La combinación de anticuerpos anti-SEMA4D y anti-PD1 aumenta el número de regresiones en el modelo de tumor de Colon26. Las regresiones para la terapia de combinación (anticuerpos α SEMA4D + α PD1) son estadísticamente significativas en comparación con el Ig de control ($p = 0,0083$) o el agente único anti-PD-1 ($p = 0,02$), según lo determinado por la prueba exacta de Fisher.

Ejemplo 8: Prueba de la capacidad de un anticuerpo anti-SEMA4D para retrasar el crecimiento tumoral en ratones cuando se usa en combinación con ciclofosfamida

Diseño experimental. Se implantaron 5×10^5 células tumorales Colon26 por vía subcutánea en el flanco de ratones Balb/c hembra. El tratamiento con IgG1 / 2B8 de ratón de control o anti-SEMA4D / MAb 67-2 se inició 1 día después de la inoculación (50 mg/kg, IP, semanalmente). El tratamiento con ciclofosfamida (50 mg/kg, IP) se administró los días 12 y 20. Hubo 20 ratones por grupo. Los tumores se midieron con calibradores 3 veces por semana comenzando 5 días después del implante. Los animales se sacrificaron cuando el volumen del tumor alcanzó 1000 mm^3 .

La combinación de anticuerpos anti-SEMA4D y ciclofosfamida retrasó el crecimiento tumoral en ratones. El crecimiento del tumor se midió mediante calibradores y las mediciones se usaron para calcular el volumen del tumor usando la fórmula $(a^2 \times l) / 2$, donde a = ancho, medición más pequeña y l = longitud, en mm, del tumor. El volumen tumoral medio, el volumen tumoral medio y las curvas de supervivencia de Kaplan Meier, definidas como el tiempo hasta la finalización en la que el volumen tumoral = 1000 mm^3 , se muestran en las Figs. 8A, 8B y 8C, respectivamente. El análisis estadístico se realizó utilizando el análisis de varianza de dos vías (ANOVA) y el análisis Log Rank, respectivamente, que mostraron un efecto de tratamiento estadísticamente significativo con el anticuerpo anti-

SEMA4D combinado con ciclofosfamida en ratones Balb/c.

Específicamente, los hallazgos muestran un retraso de crecimiento tumoral (TGD) del 232% cuando se usaron anticuerpos anti-SEMA4D en combinación con ciclofosfamida. Este hallazgo fue estadísticamente significativo en comparación con la Ig de control ($p < 0,0001$), según lo determinado por el análisis Log Rank de Mantel Cox. También hubo un 3% de TGD cuando se usó el tratamiento solo con anticuerpos anti-SEMA4D (estadísticamente significativo en comparación con la Ig de control ($p = 0,0282$)) y un 96% de TGD cuando el tratamiento con ciclofosfamida se usó solo (estadísticamente significativo en comparación con la Ig de control ($p < 0,0001$), según lo determinado por el análisis Log Rank de Mantel Cox. Las respuestas fueron duraderas durante al menos 81 días. Estos hallazgos muestran que la combinación de anticuerpos anti-SEMA4D y ciclofosfamida fue más efectiva para retrasar el crecimiento tumoral que el tratamiento solo con el anticuerpo anti-SEMA4D o solo con ciclofosfamida.

La frecuencia de regresión en el modelo de tumor de Colon 26 también se midió y se mostró en las Figs. 8D y 8E. La regresión es la falta de tumor palpable, definido por un tumor que mide $< 50 \text{ mm}^3$ para al menos dos mediciones consecutivas. La combinación de anticuerpos anti-SEMA4D y ciclofosfamida aumenta el número de regresiones en el modelo de tumor de Colon26. Las regresiones para la terapia de combinación (anticuerpos α SEMA4D + ciclofosfamida) son estadísticamente significativas en comparación con la Ig de control ($p < 0,003$), según lo determinado por la prueba exacta de Fisher. Estos datos demuestran una mayor eficacia y respuesta al tratamiento con ciclofosfamida cuando se combina con el anticuerpo anti-SEMA4D.

Ejemplo 9: Prueba de la capacidad de un anticuerpo anti-SEMA4D para retrasar el crecimiento tumoral en ratones cuando se usa en combinación con anticuerpos anti-HER2 / neu

Diseño experimental. Se implantaron 3×10^4 células tumorales Tubo.A5 por vía subcutánea en la almohadilla de grasa mamaria de ratones Balb / c hembra. El tratamiento con el control IgG1 / 2B8.1E7 de ratón o anti-SEMA4D / MAb 67-2 se inició 7 días después de la inoculación (50 mg / kg, IP, X6 semanal). Tratamiento con anti-Neu / MAb7.16.4 (200mg IP semanalmente X2, iniciado cuando el volumen tumoral fue de aproximadamente 200 mm³, en los días 21 y 28). Había 15 ratones por grupo. Los tumores se midieron con calibradores 2x / semana comenzando 11 días después del implante. Los animales se sacrificaron cuando el volumen del tumor alcanzó 800 mm³.

La combinación de anticuerpos anti-SEMA4D y anti-HER2/Neu retrasó el crecimiento tumoral en ratones. El crecimiento del tumor se midió mediante calibradores y las mediciones se usaron para calcular el volumen del tumor usando la fórmula $(a^2 \times l) / 2$, donde a = ancho, medición más pequeña y l = longitud, en mm, del tumor. El volumen tumoral medio y las curvas de supervivencia de Kaplan Meier, definidas como el tiempo hasta el punto final donde el volumen tumoral = 800 mm³, se muestran en las Figs. 9A y 9B, respectivamente. El análisis estadístico se realizó utilizando el análisis de varianza de dos vías (ANOVA) y el análisis de Log Rank, respectivamente, que mostraron un efecto de tratamiento estadísticamente significativo con el anticuerpo anti-SEMA4D combinado con el anticuerpo anti-Her2/Neu en ratones Balb/c. Los resultados muestran un 48% de retraso en el crecimiento tumoral cuando el anticuerpo anti-SEMA4D se usa en combinación con el anticuerpo anti-Neu y que esto es estadísticamente significativo en comparación con el uso de un anticuerpo de control irrelevante ($p = 0,017$) o monoterapia anti-Neu ($p = 0.006$), según lo determinado por el análisis Log Rank de Mantel Cox.

La frecuencia de regresiones tumorales en el modelo de tumor Tubo también se midió y se muestra en la FIG. 9C. La regresión es la falta de tumor palpable, definido como un tumor que mide $< 50 \text{ mm}^3$ para al menos dos mediciones consecutivas. La combinación de anticuerpos anti-SEMA4D y anti-Neu aumenta el número de regresiones en ratones con Tubo. Las regresiones para la terapia de combinación (anticuerpos α SEMA4D + α Neu) son estadísticamente significativas en comparación con la Ig de control ($p = 0,016$), según lo determinado por la prueba exacta de Fisher.

Ejemplo 10: Prueba de la capacidad de un anticuerpo anti-SEMA4D para retrasar el crecimiento del modelo de carcinoma mamario in vivo

Diseño experimental. Se implantaron 3×10^4 células tumorales Tubo.A5 por vía subcutánea en la almohadilla de grasa mamaria de ratones Balb/c hembra. El tratamiento con IgG1 / 2B8.1E7 de ratón de control o anti-SEMA4D / MAb 67-2 se inició 6 días después de la inoculación (50 mg/kg, IP, X6 semanal). Hubo 20 ratones por grupo, sin embargo, algunos ratones fueron excluidos del análisis debido a la muerte prematura antes de alcanzar la finalización resultante de la ulceración o la mala salud general. Los tumores se midieron con calibradores 2 veces por semana a partir de 13 días después del implante. Los animales se sacrificaron cuando el volumen del tumor alcanzó 800 mm³.

El tratamiento con anticuerpos anti-SEMA4D retrasó el crecimiento tumoral en ratones. El crecimiento del tumor se midió mediante calibradores y las mediciones se usaron para calcular el volumen del tumor usando la fórmula $(a^2 \times l) / 2$, en la que a = ancho, medición más pequeña y l = longitud, en mm, del tumor. El volumen tumoral medio y las curvas de supervivencia de Kaplan Meier, definidas como el tiempo hasta la finalización en la que el volumen tumoral = 800 mm³, se muestran en las Figs. 10A y 10B, respectivamente. El análisis estadístico se realizó utilizando el análisis de varianza de dos vías (ANOVA) y el análisis de Log Rank, respectivamente, que mostraron un efecto de tratamiento estadísticamente significativo con el anticuerpo anti-SEMA4D. Los hallazgos muestran un retraso máximo en el crecimiento tumoral (133%) con el tratamiento con anticuerpos anti-SEMA4D; Esto es estadísticamente significativo en comparación con el uso de un anticuerpo de control irrelevante ($p < 0,0001$), según lo determinado por el análisis

Log Rank de Mantel Cox.

La frecuencia de regresiones tumorales en el modelo tumoral Tubo.A5 también se midió y se muestra en la FIG. 10C-10E. La regresión es la falta de tumor palpable, definido como un tumor que mide $<50 \text{ mm}^3$ para al menos dos mediciones consecutivas. A los 90 días después del implante, el 85% (12/14) de los ratones tratados con MAb67 eran regresores libres de tumor y uno de los 14 nunca había desarrollado un tumor medible, en comparación con las regresiones 0/14 en los ratones tratados con Ig de control. En el día 90, los ratones que habían rechazado completamente sus tumores primarios (13/14 de los ratones tratados con MAb67) fueron expuestos con Tubo.A5 viable (30.000) en el lado contralateral; ratones sin exposición previa se incluyeron como controles para el injerto. Como se muestra en la FIG. 10D, los 13 ratones que fueron tratados con anti-SEMA4D rechazaron el desafío tumoral posterior, lo que sugiere una respuesta de memoria inmunológica, en contraste con los ratones sin tratamiento previo que no rechazaron el desafío tumoral como se muestra en la FIG. 10E. La frecuencia de regresión es estadísticamente significativa en comparación con la Ig de control ($p < 0,0001$), según lo determinado por la prueba exacta de Fisher.

Ejemplo 11: Efecto del anticuerpo anti-SEMA4D sobre la infiltración de linfocitos T y MDSC en modelos de tumor Tubo.A5

Diseño experimental. Los tumores Tubo.A5 se implantaron en ratones singeneicos BALB/c. El tratamiento con Ig de control de murino o MAb 67 anti-SEMA4D se inició el día 6 (50 mg/kg IP, semanalmente). Los tumores se recolectaron el día 39, justo antes de la regresión tumoral. El FACS se realizó en fracciones de células de Linfocitos de tumores de 14-21 ratones / grupo. Se muestran las réplicas medias de ensayo; La significación se determinó mediante la prueba t de dos colas.

Como se muestra en las Figs. 11A y 11B, la terapia con anticuerpos anti-SEMA4D aumenta la infiltración de linfocitos T CD3 + y disminuye las MDSC CD11b + Gr1 + en tumores de ratones tratados con anti-SEMA4D. Estos datos sugieren un aumento en la respuesta de las linfocitos T antitumogénicos y una disminución en las células inmunosupresoras, como MDSC. Estos datos son consistentes con la modulación del equilibrio inmune observado en el modelo Colon26.

Ejemplo 12: Titulación de dosis de MAb67 en modelos tumorales Tubo.A5 y Colon26

Diseño experimental para el modelo de tumor Tubo.A5. Se implantaron 3×10^4 células tumorales Tubo.A5 por vía subcutánea en la almohadilla de grasa mamaria de ratones Balb/c hembra. El tratamiento con IgG1/2B8.1E7 de ratón de control (50 mg/kg, IP, semanal x 6) o anti-SEMA4D/MAb 67-2 (1, 10 o 50 mg/kg, IP, semanal x 6) se inició 6 días después de la inoculación. Hubo al menos 20 ratones por grupo, sin embargo, algunos ratones fueron excluidos del análisis debido a la muerte prematura antes de alcanzar la finalización debido a la ulceración o a la mala salud general. Los tumores se midieron con calibradores 2 veces por semana a partir de 13 días después del implante. Los animales se sacrificaron cuando el volumen del tumor alcanzó 800 mm^3 .

Diseño experimental para el modelo de tumor de Colon26. Se implantaron 5×10^5 células tumorales Colon26 por vía subcutánea en el flanco de ratones Balb /c hembra. El tratamiento con IgG1/2B8.1E7 de ratón de control (50 mg/kg, IP, semanal x 5) o anti-SEMA4D/MAb 67-2 (0,3, 3, 10 o 50 mg/kg, IP, semanal x 5) se inició 1 día después de la inoculación, con o sin anti-CTLA4/MAb UC10-4F10-11 ($100 \mu\text{g} \sim 5 \text{ mg/kg}$ el día 8 y $50 \mu\text{g} \sim 2,5 \text{ mg/kg}$ los días 11 y 14 después de la inoculación tumoral). Había 15 ratones por grupo. Los tumores se midieron con calibradores 2x/semana comenzando 5 días después del implante. Los animales fueron sacrificados cuando el volumen del tumor alcanzó $> 1000 \text{ mm}^3$.

La dosis mínima efectiva es de aproximadamente 3 mg/kg. El tratamiento del tumor Tubo.A5 con 50 o 10 mg/kg de MAb67 dio como resultado un retraso en el crecimiento del tumor que fue estadísticamente significativo en comparación con la IgG de control ($p < 0,0001$ y $p = 0,0015$ respectivamente), pero no significativamente diferente entre sí. Las frecuencias de regresión de 38% (9/24) y 54% (6/13) en tumor Tubo.A5 tratado con 50 o 10 mg/kg de MAb67 también fueron significativamente significativas ($p = 0,0069$ y $p = 0,0014$). En contraste, 1 mg/kg de Mab67 fue ineficaz y no retrasó significativamente el crecimiento tumoral ($p = 0,01441$). En este modelo, se determinó que la dosis eficaz mínima estaba entre 1 y 10 mg/kg. El crecimiento del tumor se midió mediante calibradores y se usaron mediciones para calcular el volumen del tumor usando la fórmula $(a^2 \times l)/2$, en la que a = ancho, medición más pequeña y l = longitud, en mm, del tumor. El volumen tumoral medio y las curvas de supervivencia de Kaplan Meier, definidas como el tiempo hasta la finalización, en la que el volumen tumoral = 800 mm^3 , se muestran en las Figs. 12A y 12B, respectivamente. El análisis estadístico se realizó utilizando el análisis de varianza de dos vías (ANOVA) y el análisis de Log Rank, respectivamente,

Se investigó el refinamiento adicional de la dosis eficaz de MAb67 en el modelo Colon26 y se determinó que era $> 3 \text{ mg/kg}$. El tratamiento de los tumores de Colon26 con anti-CTLA4 + anti-SEMA4D dio como resultado un retraso máximo del crecimiento tumoral (119%) en comparación con la monoterapia con anti-CTLA4 cuando las dosis de anti-SEMA4D/MAb 67 fueron $> 3 \text{ mg/kg}$; a 10 mg/kg de MAb67, $p = 0,0101$ y a 3 mg/kg, $p = 0,0571$, en comparación con la monoterapia con anti-CTLA4 y se determinó mediante el análisis Log Rank de Mantel Cox. Todas las dosis entre 3-50 mg/kg no fueron significativamente diferentes entre sí. En contraste, cuando se administró anti-CTLA4 en combinación con 0,3 mg/kg de MAb67, la diferencia fue estadísticamente diferente del tratamiento con 10 mg/kg de

MAb 67 ($p = 0,0325$) pero no fue estadísticamente significativa en comparación con el tratamiento con monoterapia anti-CTLA4 ($p = 0,4945$). El crecimiento del tumor se midió mediante calibradores y se usaron mediciones para calcular el volumen del tumor usando la fórmula $(a^2 \times l)/2$, en la que a = ancho, medición más pequeña y l = longitud, en mm, del tumor. El volumen tumoral medio y las curvas de supervivencia de Kaplan Meier, definidas como el tiempo hasta la finalización en la que el volumen tumoral = 1000 mm^3 , se muestran en las Figs. 12C y 12D, respectivamente. El análisis estadístico se realizó utilizando el Análisis de varianza de dos vías (ANOVA) y el análisis de Log Rank, respectivamente.

Ejemplo 13: Efecto del anticuerpo anti-SEMA4D en retrasar el crecimiento tumoral en Colon26 y Tubo.A5 Modelos tumorales

10 **Diseño experimental.** La FIG. 13 es un resumen de los experimentos realizados en los ejemplos anteriores que muestran regresiones tumorales y crecimiento después de una reexposición tumoral en modelos tumorales Colon26 y Tubo.A5. El diseño experimental de los respectivos experimentos se resume en los ejemplos anteriores.

La terapia con anticuerpos anti-SEMA4D da como resultado regresiones tumorales completas y duraderas. Como se muestra en la FIG. 13, el tratamiento con terapia con anticuerpos anti-SEMA4D produce un aumento estadísticamente significativo en la regresión tumoral en comparación con el tratamiento con IgG1 de ratón de control en los modelos Colon26 y Tubo.A5, del 7 % ($P < 0,001$ ***) y del 85 % ($P < 0,0001$ ****), respectivamente. Además, el tratamiento con terapia con anticuerpos anti-SEMA4D no es significativamente diferente del tratamiento solo con anti-PDI (7 % solo con anti-SEMA4D solo frente al 8 % solo con anti-PDI, ns), pero se mejora significativamente cuando se usa en combinación con terapia anti-PDI (28 % para terapia combinada frente al 7 % para anti-SEMA4D u 8 % para monoterapia anti-PDI, $P < 0,0001$ ****). Además, el tratamiento con terapia de anticuerpos anti-SEMA4D en combinación con la terapia anti-CTLA4 da como resultado un aumento estadísticamente significativo en la regresión tumoral en comparación con el tratamiento solo con anti-CTLA4 (74 % para la terapia combinada frente al 20 % para la monoterapia anti-CTLA4, $P < 0,0001$ ****). Además, el tratamiento con terapia de anticuerpos anti-SEMA4D en combinación con la terapia anti-CTLA4 produce un aumento estadísticamente significativo en la regresión tumoral en comparación con el tratamiento con anti-SEMA4D en combinación con anti-PDI (74 % para la terapia combinada de anti-SEMA4D/anti-CTLA4 frente al 60 % para la terapia combinada anti-SEMA4D/anti-PDI, $P < 0,001$ ****). La mayor sinergia aparente entre el anti-SEMA4D en combinación con el anti-CTLA4 en comparación con el anti-SEMA4D en combinación con el anti-PDI indica que no todos los inhibidores del bloqueo del punto de control inmunitario son equivalentes a este respecto y que las diferencias en el mecanismo pueden asociarse con un beneficio terapéutico diferencial del tratamiento. Por último, el tratamiento con anti-SEMA4D en combinación con ciclofosfamida da como resultado un aumento estadísticamente significativo en la regresión tumoral en comparación con el tratamiento solo con ciclofosfamida (40 % para terapia combinada frente al 10 % para monoterapia con ciclofosfamida, $P < 0,01$ **).

Muchas modificaciones y otras realizaciones de las realizaciones expuestas en el presente documento vendrán a la mente de un experto en la materia a la que se pertenece la presente divulgación que tienen el beneficio de las enseñanzas presentadas en las anteriores descripciones y los dibujos asociados. Aunque se emplean en el presente documento términos específicos, estos se usan únicamente en un sentido genérico y descriptivo y no con fines limitativos.

LISTADO DE SECUENCIAS

40 <110> Evans, Elizabeth E.
Smith, Ernest S.
Zauderer, Maurice

<120> USO DE MOLÉCULAS INHIBIDORAS DE SEMAFORINA-4D EN COMBINACIÓN CON UNA TERAPIA INMUNOMODULADORA PARA INHIBIR EL CRECIMIENTO TUMORAL Y LA METÁSTASIS

<130> 58008-133124

45 <140> A asignar
<141> Con la presente

<150> 61/907845
<151> 22-11-2013

50 <150> 61/884771
<151> 30-09-2013

<150> 61/874241
<151> 05-09-2013

<150> 61839170
<151> 25-06-2013

<160> 48

<170> PatentIn versión 3.3

<210> 1

<211> 862

5 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 1

Met Arg Met Cys Thr Pro Ile Arg Gly Leu Leu Met Ala Leu Ala Val
1 5 10 15

Met Phe Gly Thr Ala Met Ala Phe Ala Pro Ile Pro Arg Ile Thr Trp
20 25 30

Glu His Arg Glu Val His Leu Val Gln Phe His Glu Pro Asp Ile Tyr
35 40 45

Asn Tyr Ser Ala Leu Leu Leu Ser Glu Asp Lys Asp Thr Leu Tyr Ile
50 55 60

Gly Ala Arg Glu Ala Val Phe Ala Val Asn Ala Leu Asn Ile Ser Glu
65 70 75 80

Lys Gln His Glu Val Tyr Trp Lys Val Ser Glu Asp Lys Lys Ala Lys
85 90 95

Cys Ala Glu Lys Gly Lys Ser Lys Gln Thr Glu Cys Leu Asn Tyr Ile
100 105 110

ES 2 782 834 T3

Arg Val Leu Gln Pro Leu Ser Ala Thr Ser Leu Tyr Val Cys Gly Thr
 115 120 125

Asn Ala Phe Gln Pro Ala Cys Asp His Leu Asn Leu Thr Ser Phe Lys
 130 135 140

Phe Leu Gly Lys Asn Glu Asp Gly Lys Gly Arg Cys Pro Phe Asp Pro
 145 150 155 160

Ala His Ser Tyr Thr Ser Val Met Val Asp Gly Glu Leu Tyr Ser Gly
 165 170 175

Thr Ser Tyr Asn Phe Leu Gly Ser Glu Pro Ile Ile Ser Arg Asn Ser
 180 185 190

Ser His Ser Pro Leu Arg Thr Glu Tyr Ala Ile Pro Trp Leu Asn Glu
 195 200 205

Pro Ser Phe Val Phe Ala Asp Val Ile Arg Lys Ser Pro Asp Ser Pro
 210 215 220

Asp Gly Glu Asp Asp Arg Val Tyr Phe Phe Phe Thr Glu Val Ser Val
 225 230 235 240

Glu Tyr Glu Phe Val Phe Arg Val Leu Ile Pro Arg Ile Ala Arg Val
 245 250 255

Cys Lys Gly Asp Gln Gly Gly Leu Arg Thr Leu Gln Lys Lys Trp Thr
 260 265 270

Ser Phe Leu Lys Ala Arg Leu Ile Cys Ser Arg Pro Asp Ser Gly Leu
 275 280 285

Val Phe Asn Val Leu Arg Asp Val Phe Val Leu Arg Ser Pro Gly Leu
 290 295 300

Lys Val Pro Val Phe Tyr Ala Leu Phe Thr Pro Gln Leu Asn Asn Val
 305 310 315 320

Gly Leu Ser Ala Val Cys Ala Tyr Asn Leu Ser Thr Ala Glu Glu Val
 325 330 335

Phe Ser His Gly Lys Tyr Met Gln Ser Thr Thr Val Glu Gln Ser His
 340 345 350

Thr Lys Trp Val Arg Tyr Asn Gly Pro Val Pro Lys Pro Arg Pro Gly

ES 2 782 834 T3

355		360		365
Ala Cys Ile Asp Ser Glu Ala Arg Ala Ala Asn Tyr Thr Ser Ser Leu				
370		375		380
Asn Leu Pro Asp Lys Thr Leu Gln Phe Val Lys Asp His Pro Leu Met				
385		390		395
Asp Asp Ser Val Thr Pro Ile Asp Asn Arg Pro Arg Leu Ile Lys Lys				
	405		410	415
Asp Val Asn Tyr Thr Gln Ile Val Val Asp Arg Thr Gln Ala Leu Asp				
	420		425	430
Gly Thr Val Tyr Asp Val Met Phe Val Ser Thr Asp Arg Gly Ala Leu				
	435		440	445
His Lys Ala Ile Ser Leu Glu His Ala Val His Ile Ile Glu Glu Thr				
	450		455	460
Gln Leu Phe Gln Asp Phe Glu Pro Val Gln Thr Leu Leu Leu Ser Ser				
		470		475
Lys Lys Gly Asn Arg Phe Val Tyr Ala Gly Ser Asn Ser Gly Val Val				
		485		490
Gln Ala Pro Leu Ala Phe Cys Gly Lys His Gly Thr Cys Glu Asp Cys				
	500		505	510
Val Leu Ala Arg Asp Pro Tyr Cys Ala Trp Ser Pro Pro Thr Ala Thr				
	515		520	525
Cys Val Ala Leu His Gln Thr Glu Ser Pro Ser Arg Gly Leu Ile Gln				
	530		535	540
Glu Met Ser Gly Asp Ala Ser Val Cys Pro Asp Lys Ser Lys Gly Ser				
	545		550	555
Tyr Arg Gln His Phe Phe Lys His Gly Gly Thr Ala Glu Leu Lys Cys				
		565		570
Ser Gln Lys Ser Asn Leu Ala Arg Val Phe Trp Lys Phe Gln Asn Gly				
	580		585	590
Val Leu Lys Ala Glu Ser Pro Lys Tyr Gly Leu Met Gly Arg Lys Asn				
	595		600	605

ES 2 782 834 T3

Leu Leu Ile Phe Asn Leu Ser Glu Gly Asp Ser Gly Val Tyr Gln Cys
 610 615 620

Leu Ser Glu Glu Arg Val Lys Asn Lys Thr Val Phe Gln Val Val Ala
 625 630 635 640

Lys His Val Leu Glu Val Lys Val Val Pro Lys Pro Val Val Ala Pro
 645 650 655

Thr Leu Ser Val Val Gln Thr Glu Gly Ser Arg Ile Ala Thr Lys Val
 660 665 670

Leu Val Ala Ser Thr Gln Gly Ser Ser Pro Pro Thr Pro Ala Val Gln
 675 680 685

Ala Thr Ser Ser Gly Ala Ile Thr Leu Pro Pro Lys Pro Ala Pro Thr
 690 695 700

Gly Thr Ser Cys Glu Pro Lys Ile Val Ile Asn Thr Val Pro Gln Leu
 705 710 715 720

His Ser Glu Lys Thr Met Tyr Leu Lys Ser Ser Asp Asn Arg Leu Leu
 725 730 735

Met Ser Leu Phe Leu Phe Phe Phe Val Leu Phe Leu Cys Leu Phe Phe
 740 745 750

Tyr Asn Cys Tyr Lys Gly Tyr Leu Pro Arg Gln Cys Leu Lys Phe Arg
 755 760 765

Ser Ala Leu Leu Ile Gly Lys Lys Lys Pro Lys Ser Asp Phe Cys Asp
 770 775 780

Arg Glu Gln Ser Leu Lys Glu Thr Leu Val Glu Pro Gly Ser Phe Ser
 785 790 795 800

Gln Gln Asn Gly Glu His Pro Lys Pro Ala Leu Asp Thr Gly Tyr Glu
 805 810 815

Thr Glu Gln Asp Thr Ile Thr Ser Lys Val Pro Thr Asp Arg Glu Asp
 820 825 830

Ser Gln Arg Ile Asp Asp Leu Ser Ala Arg Asp Lys Pro Phe Asp Val
 835 840 845

Lys Cys Glu Leu Lys Phe Ala Asp Ser Asp Ala Asp Gly Asp
 850 855 860

ES 2 782 834 T3

<211> 861
 <212> PRT
 <213> Murino sp.

<400> 2

```

Met Arg Met Cys Ala Pro Val Arg Gly Leu Phe Leu Ala Leu Val Val
 1           5           10           15

Val Leu Arg Thr Ala Val Ala Phe Ala Pro Val Pro Arg Leu Thr Trp
 20           25           30

Glu His Gly Glu Val Gly Leu Val Gln Phe His Lys Pro Gly Ile Phe
 35           40           45

Asn Tyr Ser Ala Leu Leu Met Ser Glu Asp Lys Asp Thr Leu Tyr Val
 50           55           60

Gly Ala Arg Glu Ala Val Phe Ala Val Asn Ala Leu Asn Ile Ser Glu
 65           70           75           80

Lys Gln His Glu Val Tyr Trp Lys Val Ser Glu Asp Lys Lys Ser Lys
 85           90           95

Cys Ala Glu Lys Gly Lys Ser Lys Gln Thr Glu Cys Leu Asn Tyr Ile
 100          105          110

Arg Val Leu Gln Pro Leu Ser Ser Thr Ser Leu Tyr Val Cys Gly Thr
 115          120          125

Asn Ala Phe Gln Pro Thr Cys Asp His Leu Asn Leu Thr Ser Phe Lys
 130          135          140

Phe Leu Gly Lys Ser Glu Asp Gly Lys Gly Arg Cys Pro Phe Asp Pro
 145          150          155          160

Ala His Ser Tyr Thr Ser Val Met Val Gly Gly Glu Leu Tyr Ser Gly
 165          170

Thr Ser Tyr Asn Phe Leu Gly Ser Glu Pro Ile Ile Ser Arg Asn Ser
 180          185          190

Ser His Ser Pro Leu Arg Thr Glu Tyr Ala Ile Pro Trp Leu Asn Glu
 195          200          205

Pro Ser Phe Val Phe Ala Asp Val Ile Gln Lys Ser Pro Asp Gly Pro
 210          215          220
    
```

ES 2 782 834 T3

Glu Gly Glu Asp Asp Lys Val Tyr Phe Phe Phe Thr Glu Val Ser Val
 225 230 235 240

Glu Tyr Glu Phe Val Phe Lys Leu Met Ile Pro Arg Val Ala Arg Val
 245 250 255

Cys Lys Gly Asp Gln Gly Gly Leu Arg Thr Leu Gln Lys Lys Trp Thr
 260 265 270

Ser Phe Leu Lys Ala Arg Leu Ile Cys Ser Lys Pro Asp Ser Gly Leu
 275 280 285

Val Phe Asn Ile Leu Gln Asp Val Phe Val Leu Arg Ala Pro Gly Leu
 290 295 300

Lys Glu Pro Val Phe Tyr Ala Val Phe Thr Pro Gln Leu Asn Asn Val
 305 310 315 320

Gly Leu Ser Ala Val Cys Ala Tyr Thr Leu Ala Thr Val Glu Ala Val
 325 330 335

Phe Ser Arg Gly Lys Tyr Met Gln Ser Ala Thr Val Glu Gln Ser His
 340 345 350

Thr Lys Trp Val Arg Tyr Asn Gly Pro Val Pro Thr Pro Arg Pro Gly
 355 360 365

Ala Cys Ile Asp Ser Glu Ala Arg Ala Ala Asn Tyr Thr Ser Ser Leu
 370 375 380

Asn Leu Pro Asp Lys Thr Leu Gln Phe Val Lys Asp His Pro Leu Met
 385 390 395 400

Asp Asp Ser Val Thr Pro Ile Asp Asn Arg Pro Lys Leu Ile Lys Lys
 405 410 415

Asp Val Asn Tyr Thr Gln Ile Val Val Asp Arg Thr Gln Ala Leu Asp
 420 425 430

Gly Thr Phe Tyr Asp Val Met Phe Ile Ser Thr Asp Arg Gly Ala Leu
 435 440 445

His Lys Ala Val Ile Leu Thr Lys Glu Val His Val Ile Glu Glu Thr
 450 455 460

Gln Leu Phe Arg Asp Ser Glu Pro Val Leu Thr Leu Leu Leu Ser Ser
 465 470 475 480

ES 2 782 834 T3

Lys Lys Gly Arg Lys Phe Val Tyr Ala Gly Ser Asn Ser Gly Val Val
 485 490 495
 Gln Ala Pro Leu Ala Phe Cys Glu Lys His Gly Ser Cys Glu Asp Cys
 500 505 510
 Val Leu Ala Arg Asp Pro Tyr Cys Ala Trp Ser Pro Ala Ile Lys Ala
 515 520 525
 Cys Val Thr Leu His Gln Glu Glu Ala Ser Ser Arg Gly Trp Ile Gln
 530 535 540
 Asp Met Ser Gly Asp Thr Ser Ser Cys Leu Asp Lys Ser Lys Glu Ser
 545 550 555 560
 Phe Asn Gln His Phe Phe Lys His Gly Gly Thr Ala Glu Leu Lys Cys
 565 570 575
 Phe Gln Lys Ser Asn Leu Ala Arg Val Val Trp Lys Phe Gln Asn Gly
 580 585 590
 Glu Leu Lys Ala Ala Ser Pro Lys Tyr Gly Phe Val Gly Arg Lys His
 595 600 605
 Leu Leu Ile Phe Asn Leu Ser Asp Gly Asp Ser Gly Val Tyr Gln Cys
 610 615 620
 Leu Ser Glu Glu Arg Val Arg Asn Lys Thr Val Ser Gln Leu Leu Ala
 625 630 635 640
 Lys His Val Leu Glu Val Lys Met Val Pro Arg Thr Pro Pro Ser Pro
 645 650 655
 Thr Ser Glu Asp Ala Gln Thr Glu Gly Ser Lys Ile Thr Ser Lys Met
 660 665 670
 Pro Val Ala Ser Thr Gln Gly Ser Ser Pro Pro Thr Pro Ala Leu Trp
 675 680 685
 Ala Thr Ser Pro Arg Ala Ala Thr Leu Pro Pro Lys Ser Ser Ser Gly
 690 695 700
 Thr Ser Cys Glu Pro Lys Met Val Ile Asn Thr Val Pro Gln Leu His
 705 710 715 720
 Ser Glu Lys Thr Val Tyr Leu Lys Ser Ser Asp Asn Arg Leu Leu Met

ES 2 782 834 T3

<211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 5 <223> Polipéptido anti-CD100 VH CDR1
 <400> 6
 Gly Tyr Ser Phe Ser Asp Tyr Tyr Met His
 1 5 10

<210> 7
 <211> 17
 10 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Polipéptido anti-CD100 VH CDR2
 <400> 7
 Gln Ile Asn Pro Thr Thr Gly Gly Ala Ser Tyr Asn Gln Lys Phe Lys
 1 5 10 15

15 **Gly**

<210> 8
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial
 20 <220>
 <223> Polipéptido anti-CD100 VH CDR3
 <400> 8
 Tyr Tyr Tyr Gly Arg His Phe Asp Val
 1 5

<210> 9
 <211> 118
 25 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Polipéptido anti-CD100 VH 2503
 30 <400> 9

ES 2 782 834 T3

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Ser Asp Tyr
20 25 30

Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Gln Ile Asn Pro Thr Thr Gly Gly Ala Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Ile Thr Val Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Tyr Tyr Tyr Gly Arg His Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Thr Val Thr Val Ser Ser
115

- <210> 10
- <211> 118
- <212> PRT
- <213> Artificial

5

- <220>
- <223> Polipéptido anti-CD100 VH 67

<400> 10

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Ser Asp Tyr
20 25 30

Tyr Met His Trp Val Lys Gln Ser Pro Glu Asn Ser Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Gln Ile Asn Pro Thr Thr Gly Gly Ala Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

ES 2 782 834 T3

Met Gln Leu Lys Ser Leu Thr Ser Glu Glu Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Thr Arg Tyr Tyr Tyr Gly Arg His Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Thr Val Thr Val Ser Ser
 115

5 <210> 11
 <211> 45
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Polinucleótido anti-CD100 VL CDR1

<400> 11
 aaggccagcc aaagcgtgga ttatgatggc gatagctata tgaac 45

10 <210> 12
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Artificial

15 <220>
 <223> Polinucleótido anti-CD100 VL CDR2

<400> 12
 gctgcatcca atctggaag c 21

20 <210> 13
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Polinucleótido anti-CD100 VL CDR3

25 <400> 13
 cagcaaagca atgaggatcc ctacacc 27

<210> 14
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial

30 <220>
 <223> Polipéptido anti-CD100 VL CDR1

<400> 14
 Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Asp Gly Asp Ser Tyr Met Asn
 1 5 10 15

35 <210> 15
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Polipéptido anti-CD100 VL CDR2

40 <400> 15

ES 2 782 834 T3

Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser
1 5

5 <210> 16
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Polipéptido anti-CD100 VL CDR3
<400> 16

Gln Gln Ser Asn Glu Asp Pro Tyr Thr
1 5

10 <210> 17
<211> 111
<212> PRT
<213> Artificial

15 <220>
<223> Polipéptido anti-CD100 VL 2503
<400> 17

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Asp
20 25 30

Gly Asp Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Asp
50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
65 70 75 80

Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn
85 90 95

Glu Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

20 <210> 18
<211> 111
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Polipéptido anti-CD100 VL 67

25 <400> 18

ES 2 782 834 T3

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15

Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Asp
 20 25 30

Gly Asp Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
 35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Ile Pro Ala
 50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile His
 65 70 75 80

Pro Val Glu Glu Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn
 85 90 95

Glu Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 19
 <211> 354
 <212> ADN
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> Polinucleótido anti-CD100 VH 2503
 <400> 19

caggtgcagc tgggtgcagag cggcgctgag gtgaagaagc ctggcagcag cgtgaaggtc 60
 tcctgcaagg ctagcggcta cagcttcagc gactactaca tgcactgggt gagacaggcc 120
 cctggccaag gcctggagtg gatgggcccag attaatccta ccactggcgg cgctagctac 180
 aaccagaagt tcaagggcaa ggccaccatt accgtggaca aaagcaccag cacagcctac 240
 atggagctga gcagcctgag aagcgaggac accgccgtgt attactgtgc cagatattac 300
 tacggcagac acttcgatgt ctggggccaa ggcaccacgg tcaccgtctc ttca 354

10

<210> 20
 <211> 354
 <212> ADN
 <213> Artificial

15

<220>
 <223> Polinucleótido anti-CD100 VH 67
 <400> 20

ES 2 782 834 T3

caggtccagc tgcagcagtc tggacctgag ctggtgaagc ctggggcttc agtgaagata 60
 tcctgcaagg cttctgggta ctcattcagt gactactaca tgcactgggt gaagcaaagt 120
 cctgaaaata gtcttgagtg gattggacag attaatccta ccaactggggg tgctagctac 180
 aaccagaagt tcaagggcaa ggccacatta actgtagata aatcctccag cacagcctac 240
 atgcagctca agagcctgac atctgaagag tctgcagtct attactgtac aagatattac 300
 tacggtagac acttcgatgt ctggggccaa gggaccacgg tcaccgtttc ctca 354

5 <210> 21
 <211> 333
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Polinucleótido anti-CD100 VL 2503

<400> 21
 gacatcgtga tgaccocagag cccagacagc ctggctgtga gcctggggcga gagggccacc 60
 atcaactgca aggccagcca aagcgtggat tatgatggcg atagctatat gaactggtac 120
 cagcagaaac caggccagcc tccaaagctg ctgatttacg ctgcatccaa tctggaaagc 180
 ggcgtgcctg acagattcag cggcagcggc agcggcacag atttactct gaccatcagc 240
 agcctgcagg ctgaagatgt ggcagtgtat tactgtcagc aaagcaatga ggatccctac 300
 accttcggcc aagggaccaa gctcagagatc aaa 333

10 <210> 22
 <211> 333
 <212> ADN
 <213> Artificial

15 <220>
 <223> Polinucleótido anti-CD100 VL 67

<400> 22
 gacattgtga tgaccocagtc tccagcttct ttggctgtgt ctctagggca gagggccacc 60
 atctcctgca aggccagcca aagtgttgat tatgatggcg atagttatat gaactggtac 120
 caacagaaac caggacagcc acccaactc ctcattctatg ctgcatccaa tctagaatct 180
 gggatcccag ccaggtttag tggcagtggg tctgggacag acttcaccct caacatccat 240
 cctgtggagg aggaggatgc tgcaacctat tactgtcagc aaagtaatga ggatccgtac 300
 acgttcggag gggggaccaa gctcagagatc aaa 333

20 <210> 23
 <211> 2586
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

<400> 23

ES 2 782 834 T3

atgaggatgt gcacccocat tagggggctg ctcatggccc ttgcagtgat gtttgggaca 60
 gcgatggcat ttgcacccat acccoggatc aocctgggagc acagagaggt gcaocctggtg 120
 cagtttcatg agccagacat ctacaactac tcagccttgc tgctgagcga ggacaaggac 180
 accttgta ca taggtgcccc ggaggcggtc ttcgctgtga acgcaactca catctccogag 240
 aagcagcatg aggtgtattg gaaggtctca gaagacaaaa aagcaaaatg tgcagaaaag 300
 gggaaatcaa aacagacaga gtgcctcaac tacatccggg tgctgcagcc actcagcggc 360
 acttcccttt acgtgtgtgg gaccaacgca ttccagcggc cctgtgacca cctgaactta 420
 acatccttta agtttctggg gaaaaatgaa gatggcaaag gaagatgtcc ctttgaccca 480
 gcacacagct acacatccgt catggttgat ggagaacttt attcggggac gtogtataat 540
 tttttgggaa gtgaacccat catctcccga aattcttccc acagtccctc gaggacagaa 600
 tatgcaatcc cttggctgaa cgagcctagt ttcgtgtttg ctgacgtgat ccgaaaaagc 660
 ccagacagcc ccgacggcga ggatgacagg gtctacttct tcttcacgga ggtgtctgtg 720
 gagtatgagt ttgtgttcag ggtgctgac ccacggatag caagagtgtg caagggggac 780
 cagggcggcc tgaggacott gcagaagaaa tggacctoct tcctgaaagc ccgactcacc 840
 tgctcccggc cagacagcgg cttggctctc aatgtgctgc gggatgtctt cgtgctcagg 900
 tccccgggcc tgaaggtgcc tgtgttctat gcaactctca ccccacagct gaacaacgtg 960
 gggetgtcgg cagtgtgcgc ctacaacctg tccacagccg aggaggtctt ctcccacggg 1020
 aagtacatgc agagcaccac agtggagcag tcccacacca agtgggtgog ctataatggc 1080
 ccggtaccca agccgcggcc tggagcgtgc atcgacagcg aggcacgggc cgccaactac 1140
 accagctcct tgaatttgcc agacaagacg ctgcagttcg ttaaagacca ccccttgatg 1200
 gatgactcgg taaccccaat agacaacagg cccaggttaa tcaagaaaga tgtgaactac 1260
 acccagatcg tggtgaccg gaccaggcc ctggatggga ctgtctatga tgtcatgttt 1320
 gtcagcacag accgggggagc tctgcacaaa gccatcagcc togagcaogc tgttcacatc 1380
 atcgaggaga ccagctcct ccaggacttt gagccagtc agaccctgct gctgtcttca 1440
 aagaagggca acaggtttgt ctatgctggc tctaactcgg gcgtggtcca ggccccgctg 1500
 gccttctgtg ggaagcacgg cacctgcgag gactgtgtgc tggcgcggga ccctactgc 1560
 gcctggagcc cgcccacagc gacctgcgtg gctctgcacc agaccgagag ccccagcagg 1620
 ggtttgatc aggagatgag cggcgatgct tctgtgtgcc cggataaaaag taaaggaagt 1680

ES 2 782 834 T3

taccggcagc attttttcaa gcacgggtggc acagcggaac tgaaatgctc ccaaaaatcc 1740
aacctggccc gggctcttttg gaagttccag aatggcgtgt tgaaggccga gagccccaag 1800
tacggcttta tgggcagaaa aaacttgctc atcttcaact tgtcagaagg agacagtggg 1860
gtgtaccagt gcctgtcaga ggagagggtt aagaacaaaa cggctctcca agtggtcgcc 1920
aagcacgtcc tggaagtgaa ggtggttcca aagcccgtag tggccccac cttgtcagtt 1980
gttcagacag aaggtagtag gattgccacc aaagtgttg tggcatccac ccaagggctc 2040
totccccc aa cccagccgt gcaggccacc tcctccggg ccatcacct tcctccaag 2100
cctgcgcca ccggcacatc ctgogaacca aagatcgtca tcaacacggt ccccagctc 2160
cactcggaga aaaccatgta tottaagtcc agcgacaacc gcctcctcat gtccctctc 2220
ctcttcttct ttgttctctt cctctgctc tttttctaca actgctataa gggatacctg 2280
cccagacagt gcttgaaatt ccgctcggcc ctactaattg ggaagaaga gcccaagtca 2340
gatttctgtg accgtgagca gagcctgaag gagacgtag tagagccagg gagcttctcc 2400
cagcagaatg gggagcacc caagccagcc ctggacaccg gctatgagac cgagcaagac 2460
accatcacca gcaaagtccc cacggatagg gaggactcac agaggatcga cgaccttct 2520
gccagggaca agccctttga cgtcaagtgt gagctgaagt tcgctgactc agacgcagat 2580
ggagac 2586

5 <210> 24
<211> 13
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Epítopo de péptido de proteína proteolipídica PLP(139-151)
<400> 24

His Ser Leu Gly Lys Trp Leu Gly His Pro Asp Lys Phe
1 5 10

10 <210> 25
<211> 118
<212> PRT
<213> Artificial

15 <220>
<223> Polipéptido anti-CD100 VH 76
<400> 25

ES 2 782 834 T3

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr
20 25 30

Trp Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Thr Gly Tyr Ser Asp Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Asp Pro Tyr Gly Trp Thr Met Asp Ser Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

5 <210> 26
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Polipéptido anti-CD100 VH 76 CDR1
<400> 26

Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr Trp Met His
1 5 10

10 <210> 27
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

15 <220>
<223> Polipéptido anti-CD100 VH 76 CDR2
<400> 27

Tyr Ile Asn Pro Ser Thr Gly Tyr Ser Asp Tyr Asn Gln Lys Phe Lys
1 5 10 15

Asp

<210> 28
<211> 9

ES 2 782 834 T3

<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Polipéptido anti-CD100 VH 76 CDR3

5 <400> 28

Asp Pro Tyr Gly Trp Thr Met Asp Ser
1 5

<210> 29
<211> 107
<212> PRT
<213> Artificial

10

<220>
<223> Polipéptido anti-CD100 VL 76

<400> 29

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly
1 5 10 15

Asp Thr Ile Thr Ile Thr Cys His Ala Ser Gln Asn Ile Asn Val Trp
20 25 30

Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Asn Ile Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Lys Ala Ser Asn Leu His Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Gly Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Gln Ser Tyr Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

15 <210> 30
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial

20 <220>
<223> Polipéptido anti-CD100 VL 76 CDR1

<400> 30

His Ala Ser Gln Asn Ile Asn Val Trp Leu Ser
1 5 10

25 <210> 31
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial

ES 2 782 834 T3

<220>
<223> Polipéptido anti-CD100 VL 76 CDR2

<400> 31

Lys Ala Ser Asn Leu His Thr
1 5

5 <210> 32
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

10 <220>
<223> Polipéptido anti-CD100 VL 76 CDR3

<400> 32

Gln Gln Gly Gln Ser Tyr Pro Tyr Thr
1 5

15 <210> 33
<211> 354
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Polinucleótido anti-CD100 VH 76

20 <400> 33

cagg	tccagc	tgcagc	cagtc	tggggctgaa	ctggcaaaac	ctggggcctc	agtgaagatg	60
tctg	caagg	cttctg	gcta	caccttact	aggtactgga	tgcaactgggt	aaaacagagg	120
cctg	gacagg	gtctggaatg	gattggatac	attaatccta	gcactgggta	ttctgattac		180
aatc	agaagt	tcaagg	gacaa	ggccacattg	actgcagaca	aatcctccag	cacagcctac	240
atgc	aactga	gcagcctgac	atctgaggac	tctgcagtct	attactgtgc	aagagacccc		300
tacg	gctgga	ctatggactc	ctggggccaa	gggactctgg	tcaccgcttc	ctca		354

25 <210> 34
<211> 30
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Polinucleótido anti-CD100 VH 76 CDR1

<400> 34
ggctacacct ttactagta ctggatgcac 30

30 <210> 35
<211> 51
<212> ADN
<213> Artificial

35 <220>
<223> Polinucleótido anti-CD100 VH 76 CDR2

<400> 35
tacattaatc ctagcactgg ttattctgat tacaatcaga agttcaagga c 51

ES 2 782 834 T3

<210> 36
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Artificial

5 <220>
 <223> Polinucleótido anti-CD100 VH 76 CDR3

<400> 36
 gaccctacg gctggactat ggactcc 27

10 <210> 37
 <211> 321
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Polinucleótido anti-CD100 VL 76

15 <400> 37

gacatccaga tgaccagtc tccatccagt ctgtctgcat ccottggaga cacaattacc 60
atcacttgcc atgccagtca gaacattaat gtttggttaa gctggtacca gcagaaacca 120
ggaaatattc ctaactatt gatctataag gttccaact tgcacacagg cgtcccatca 180
aggtttagtg gcagtggatc tggaacaggt ttcacattaa coatcagcag octgcagcct 240
gaagacattg ccacttacta ctgtcaacag ggtcaaagtt atcogtacac gttcggaggg 300
gggaccaagc tcgagatcaa a 321

20 <210> 38
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Polinucleótido anti-CD100 VL 76 CDR1

25 <400> 38
 catgccagtc agaacattaa tgtttggtta agc 33

<210> 39
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Artificial

30 <220>
 <223> Polinucleótido anti-CD100 VL 76 CDR2

<400> 39
 aaggctcca actgcacac a 21

35 <210> 40
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Polinucleótido anti-CD100 VL 76 CDR3

40 <400> 40
 caacagggtc aaagttatcc gtacacg 27

<210> 41

ES 2 782 834 T3

<211> 51
<212> ADN
<213> Artificial

5 <220>
<223> Epítopo 1

<400> 41
ctgaaggtgc ctgtgttcta tgcactcttc accccacagc tgaacaacgt g 51

10 <210> 42
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Epítopo 1

15 <400> 42

Leu Lys Val Pro Val Phe Tyr Ala Leu Phe Thr Pro Gln Leu Asn Asn
1 5 10 15

Val

<210> 43
<211> 45
<212> ADN
20 <213> Artificial

<220>
<223> Epítopo 2

<400> 43
aaatggacct ccttctgaa agcccgactc atctgctccc ggcca 45

25 <210> 44
<211> 15
<212> PRT
<213> Artificial

30 <220>
<223> Epítopo 2

<400> 44

Lys Trp Thr Ser Phe Leu Lys Ala Arg Leu Ile Ala Ser Arg Pro
1 5 10 15

35 <210> 45
<211> 42
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Epítopo 3

40 <400> 45
gagtttggtg tcagggtgct gatcccacgg atagcaagag tg 42

<210> 46
<211> 14
<212> PRT
45 <213> Artificial

<220>

ES 2 782 834 T3

<223> Epítopo 3

<400> 46

Glu Phe Val Phe Arg Val Leu Ile Pro Arg Ile Ala Arg Val
 1 5 10

5 <210> 47
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 10 <223> Dominio VL 2282

<400> 47

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Pro Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Phe Asn Ser
 20 25 30
 Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln
 35 40 45
 Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
 50 55 60
 Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
 65 70 75 80
 Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Asn
 85 90 95
 Asp His Thr Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile
 100 105 110
 Lys

15 <210> 48
 <211> 122
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Dominio VH 2282

20 <400> 48

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Thr Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
 20 25 30
 Tyr Met Asp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Arg Val Asn Pro Tyr His Gly Tyr Ala Thr Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60
 Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Glu Glu Asn Ser Tyr Asp Gly Tyr Tyr Gly Met Asp Tyr Trp
 100 105 110
 Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un anticuerpo aislado o fragmento de unión a un antígeno del mismo que se une específicamente a semaforina-4D (SEMA4D) para su uso en la inhibición, el retraso o la reducción del crecimiento de un tumor sólido en un sujeto con cáncer, en combinación con al menos otra terapia inmunomoduladora, en el que el anticuerpo anti-SEMA4D o el fragmento del mismo comprende
- (a) una VH que comprende las VHCDR 1-3 que comprenden las SEQ ID NO: 6, 7 y 8, respectivamente, y una VL que comprende las VLCDR 1-3 que comprende las SEQ ID NO: 14, 15 y 16, respectivamente; o
- (b) una VH y VL que comprende, respectivamente, la SEQ ID NO: 9 y la SEQ ID NO: 17 o la SEQ ID NO: 10 y la SEQ ID NO: 18;
- 10 en el que la al menos otra terapia inmunomoduladora comprende
- i) un inhibidor de bloqueo del punto de control inmunitario que puede bloquear una interacción de receptor-ligando que inicia un punto de control inmunitario, en el que el inhibidor de bloqueo del punto de control inmunitario comprende un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une al receptor o ligando; o
- ii) un modulador de Treg que comprende ciclofosfamida;
- 15 y en el que la combinación con la al menos otra terapia inmunomoduladora da como resultado una eficacia terapéutica mejorada en relación con el anticuerpo o fragmento del anticuerpo o la terapia inmunomoduladora sola.
2. El anticuerpo o fragmento de unión a un antígeno para el uso de la reivindicación 1, en el que el inhibidor del bloqueo del punto de control inmunitario comprende un anticuerpo anti-proteína citotóxica 4 asociada a linfocitos T (CTLA4), un anticuerpo anti-muerte celular programada 1 (PD-1), un anticuerpo anti-ligando 1 de muerte celular programada (PD-L1), un anticuerpo anti-gen 3 de activación del linfocito (LAG3), un anticuerpo anti-B7-H3, un fragmento de unión a antígeno del mismo, o una combinación de los mismos.
- 20 3. El anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en el que el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno y la al menos otra terapia inmunomoduladora se administran por separado o de manera concurrente.
- 25 4. El anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el sujeto tiene un nivel elevado de linfocitos B, de linfocitos T o de linfocitos B y linfocitos T cuando se compara con otros sujetos de cáncer con tumores sólidos.
5. El anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno para el uso de la reivindicación 4, en el que
- (a) el nivel de linfocitos B y/o de linfocitos T por microlitro de sangre en el sujeto es de aproximadamente 1,5 a aproximadamente 5 veces el número medio de linfocitos B y/o de linfocitos T en circulación en otros pacientes de cáncer con tumores sólidos; y/o
- 30 (b) el sujeto tiene niveles de linfocitos B y/o de linfocitos T que están dentro o por encima del intervalo de linfocitos B y/o de linfocitos T de individuos sanos.
- 35 6. El anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el anticuerpo anti-SEMA4D o el fragmento del mismo inhibe la interacción de SEMA4D con su receptor, en el que el receptor es Plexina-B1, Plexina B2 o CD72.
7. El anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el anticuerpo anti-SEMA4D o el fragmento del mismo inhibe la transducción de la señal de Plexina-B1 mediada por SEMA4D.
- 40 8. El anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que el tumor sólido es carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma, cáncer de células escamosas, cáncer de pulmón microcítico, cáncer de pulmón no microcítico, adenocarcinoma de pulmón, carcinoma escamoso de pulmón, cáncer de peritoneo, cáncer hepatocelular, cáncer gastrointestinal, cáncer gástrico, cáncer de páncreas, cáncer neuroendocrino, glioblastoma, cáncer de cuello uterino, cáncer de ovario, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, cáncer de cerebro, hepatoma, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer colorrectal, carcinoma endometrial o uterino, cáncer de esófago, carcinoma de glándulas salivales, cáncer de riñón, cáncer de hígado, cáncer de próstata, cáncer de vulva, cáncer de tiroides, cáncer de cabeza y cuello, o una combinación de los mismos.
- 45 9. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno para el uso de la reivindicación 8, en el que el tumor sólido expresa Her2 y Plexina B1 o Plexina B2.
- 50

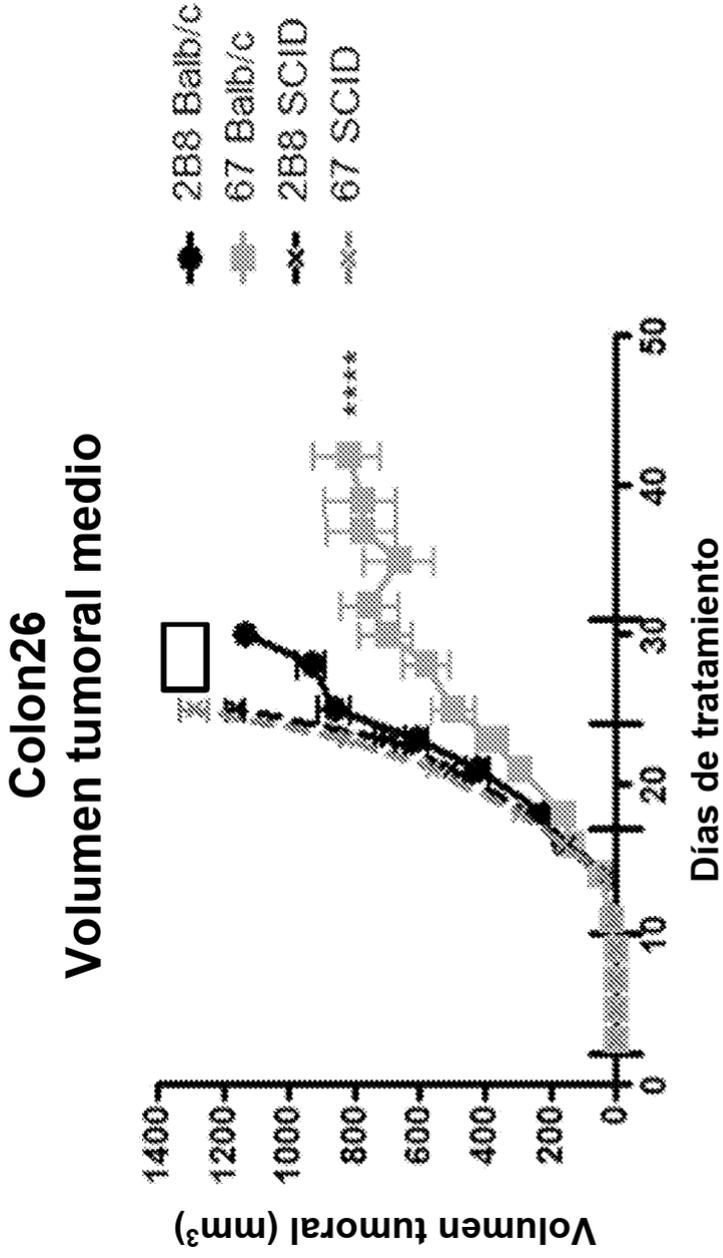


FIG. 1A

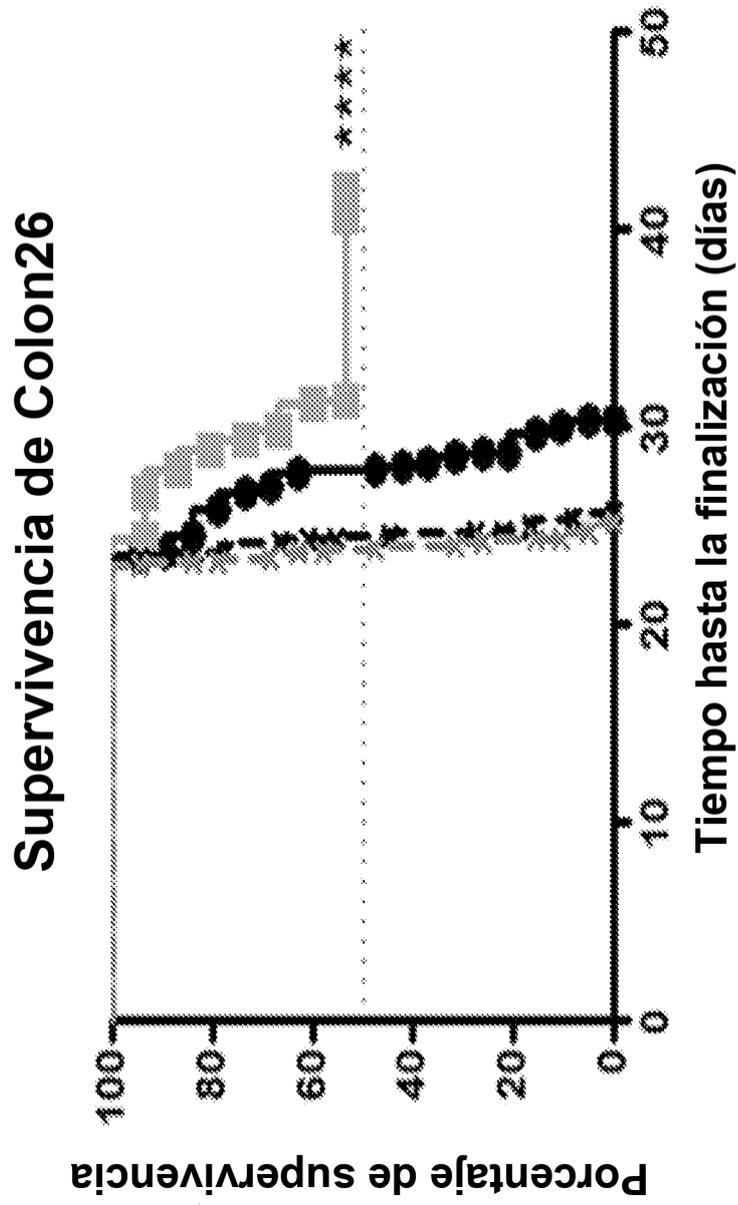


FIG. 1B

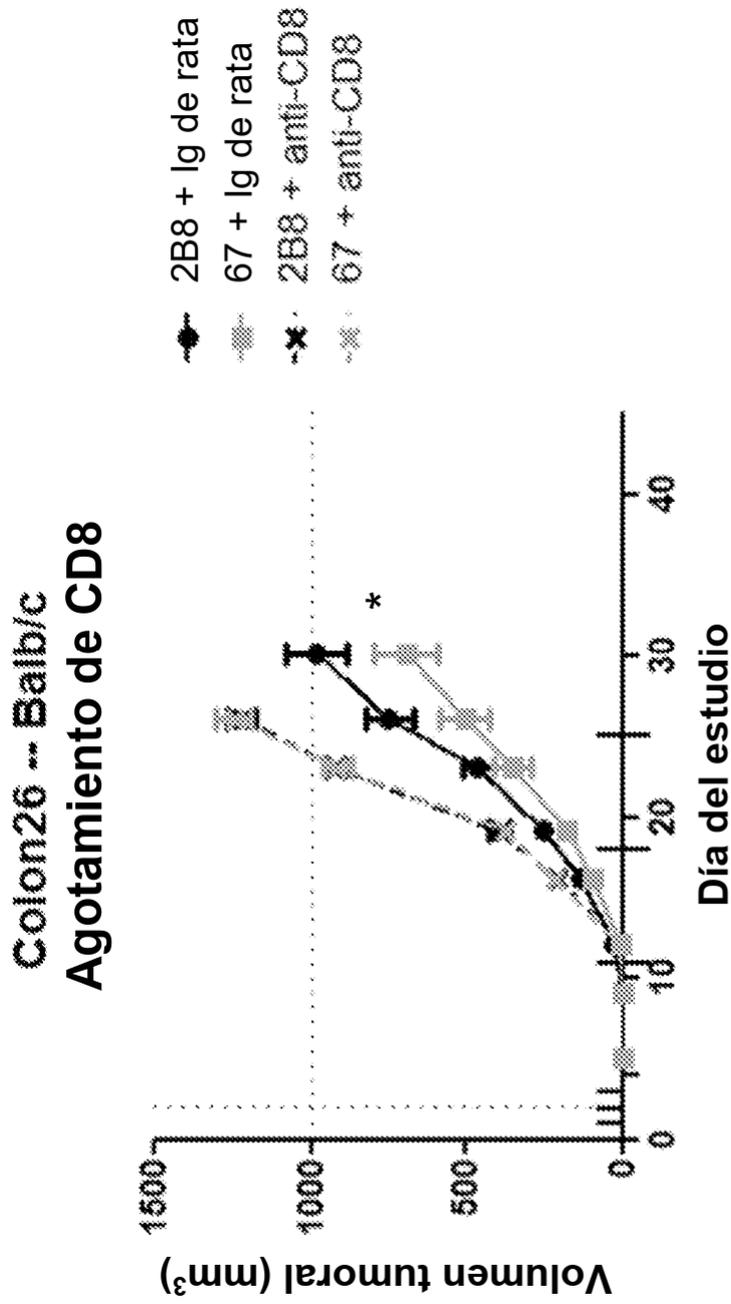


FIG. 2

Densidad de linfocitos T CD8+

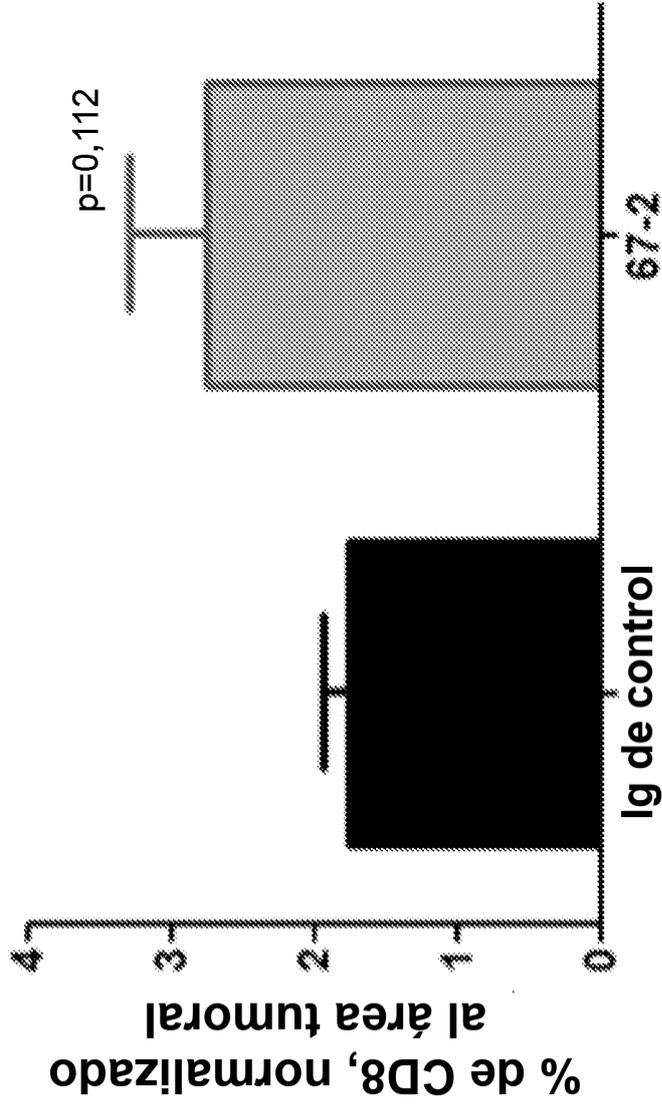


FIG. 3A

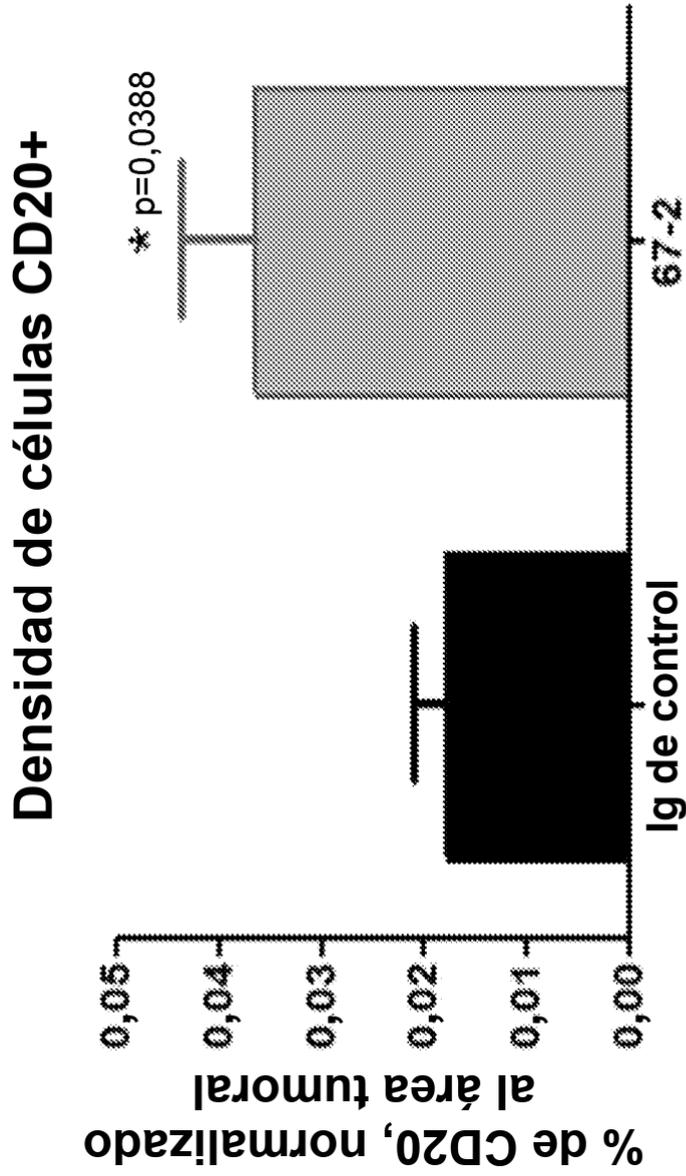
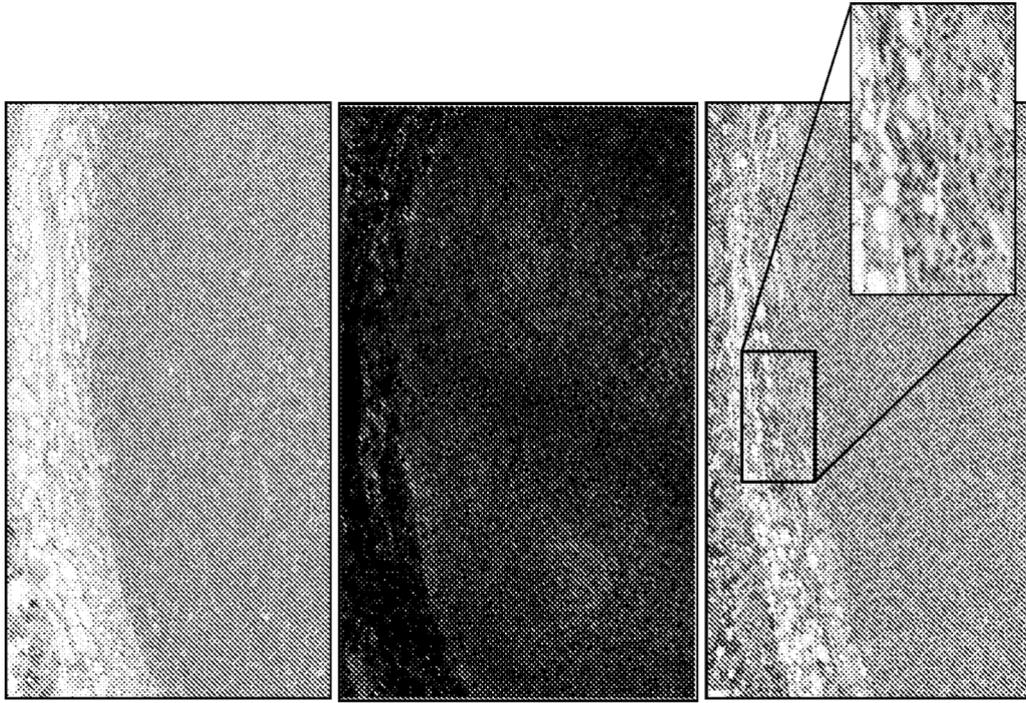


FIG. 3B

MAb 67 anti-SEMA4D



Ig de control

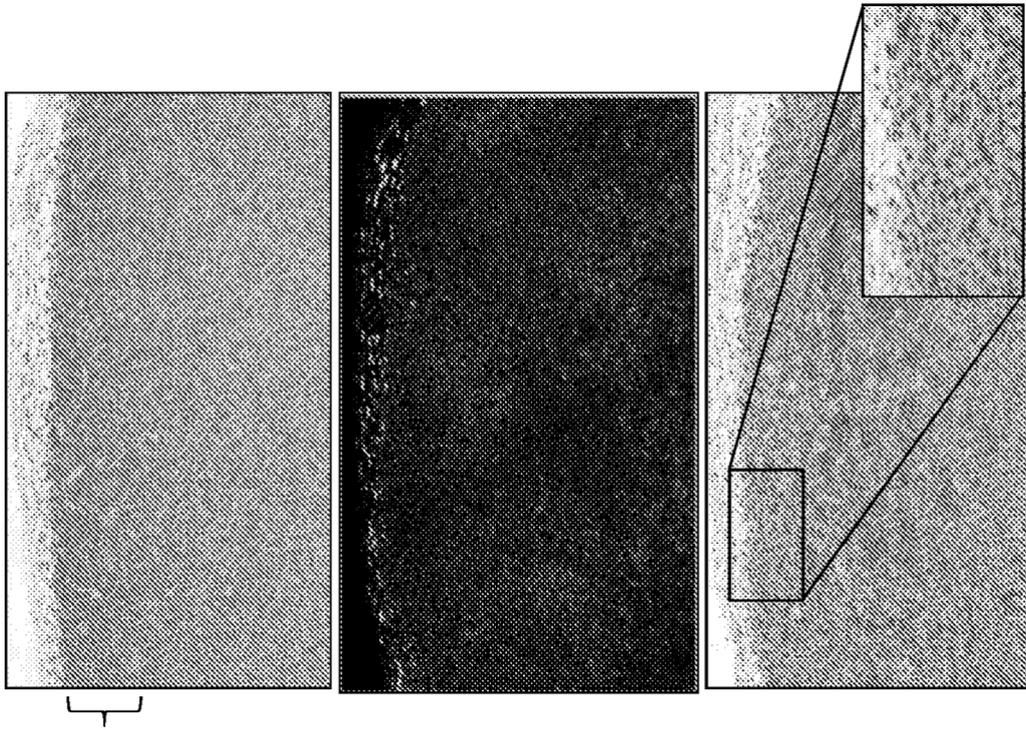


FIG. 4A

M1 anti-tumorigénico

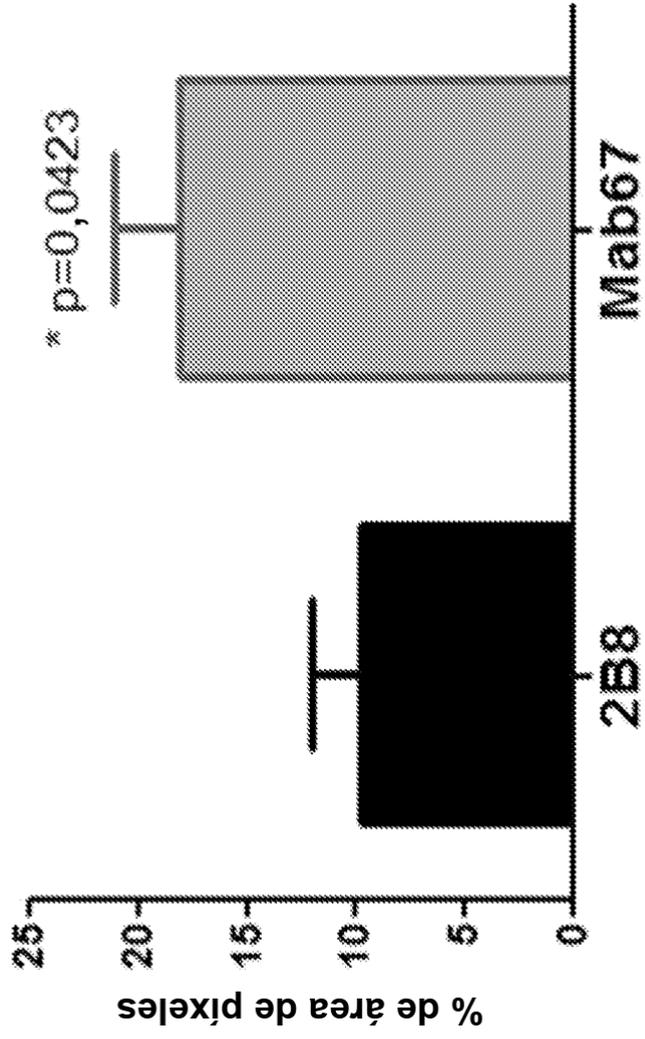


FIG. 4B

M2 pro-tumorigénico

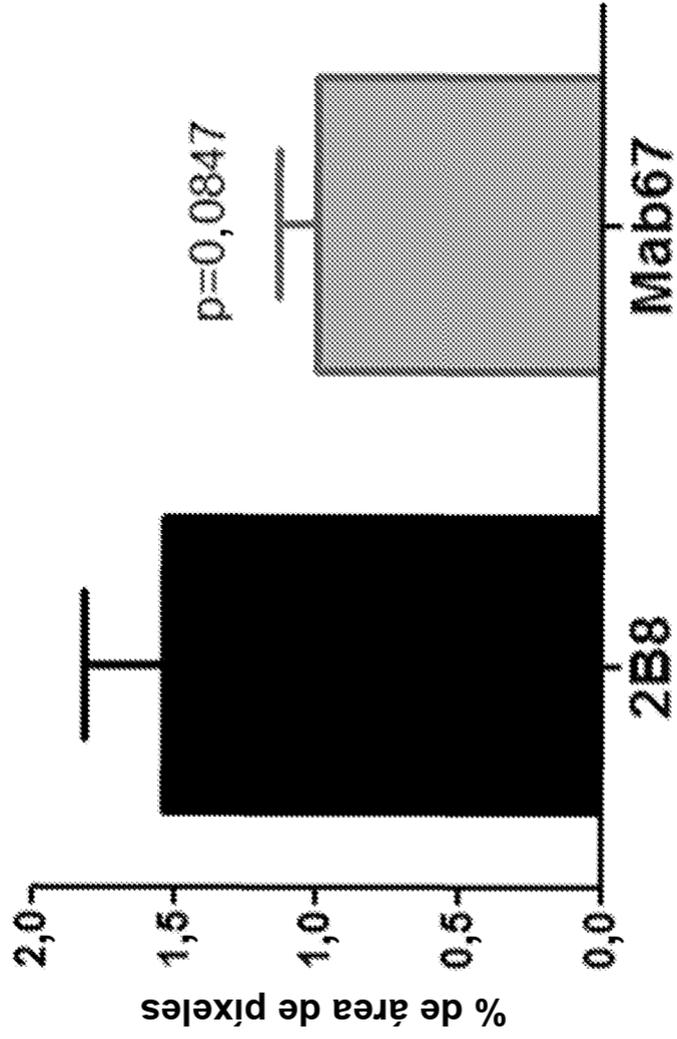


FIG. 4C

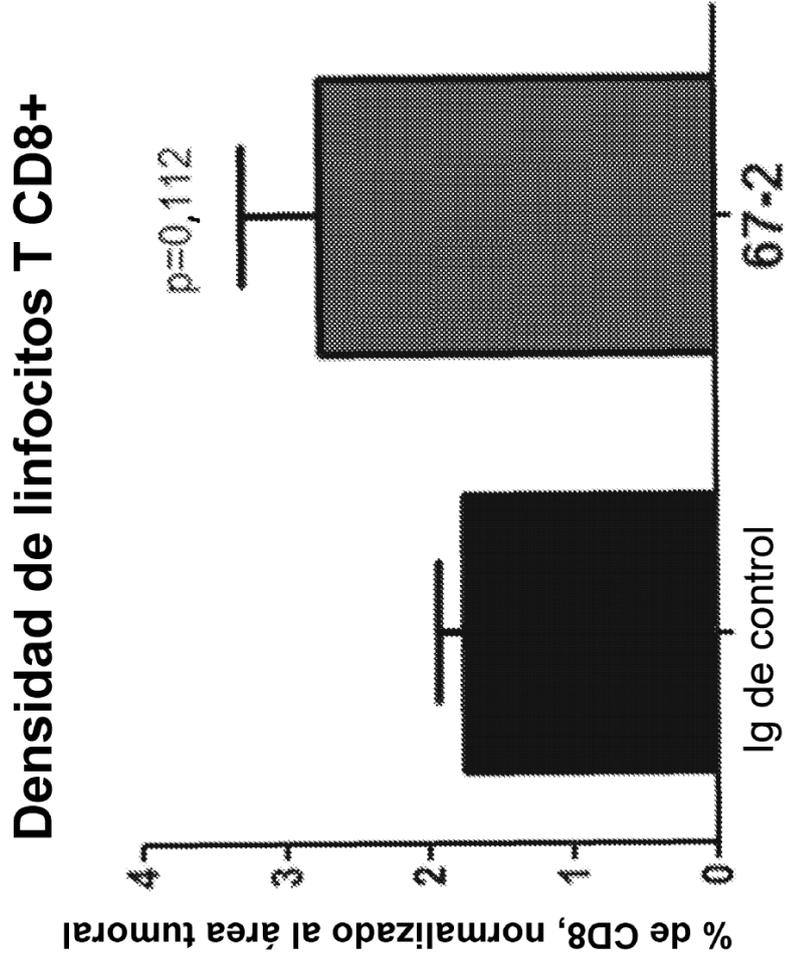


FIG. 4D

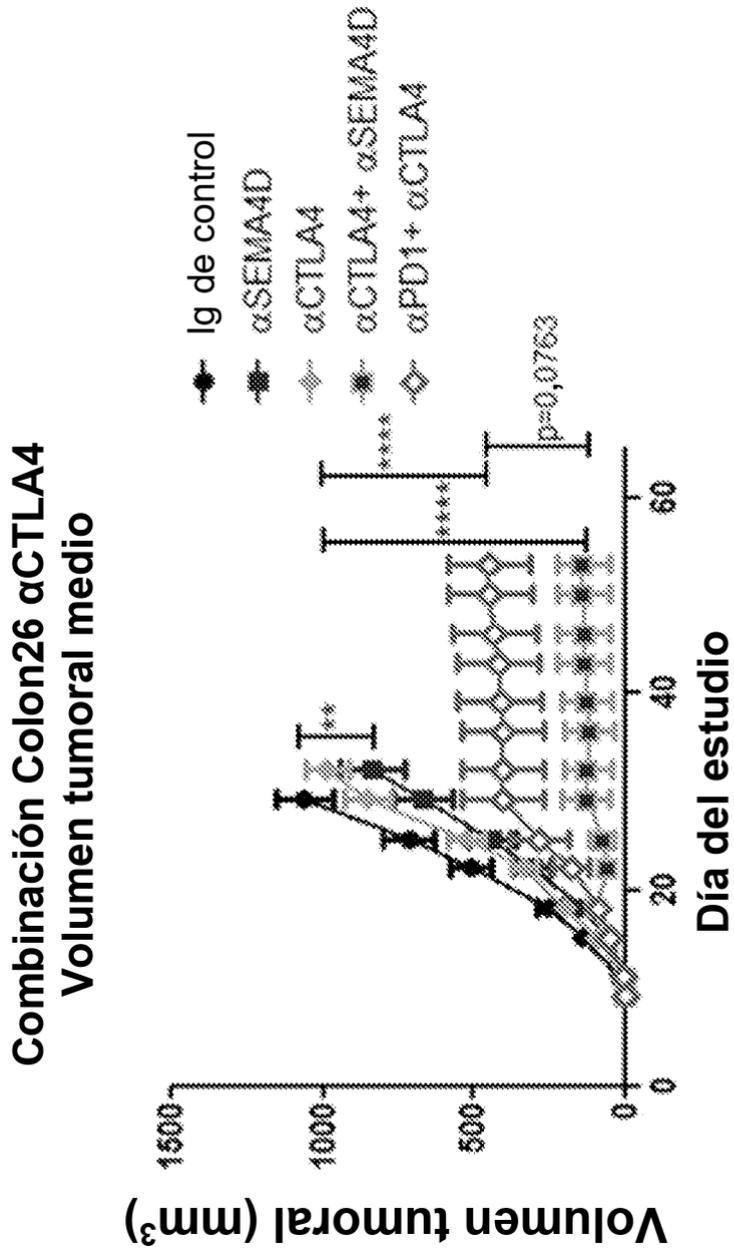


FIG. 5A

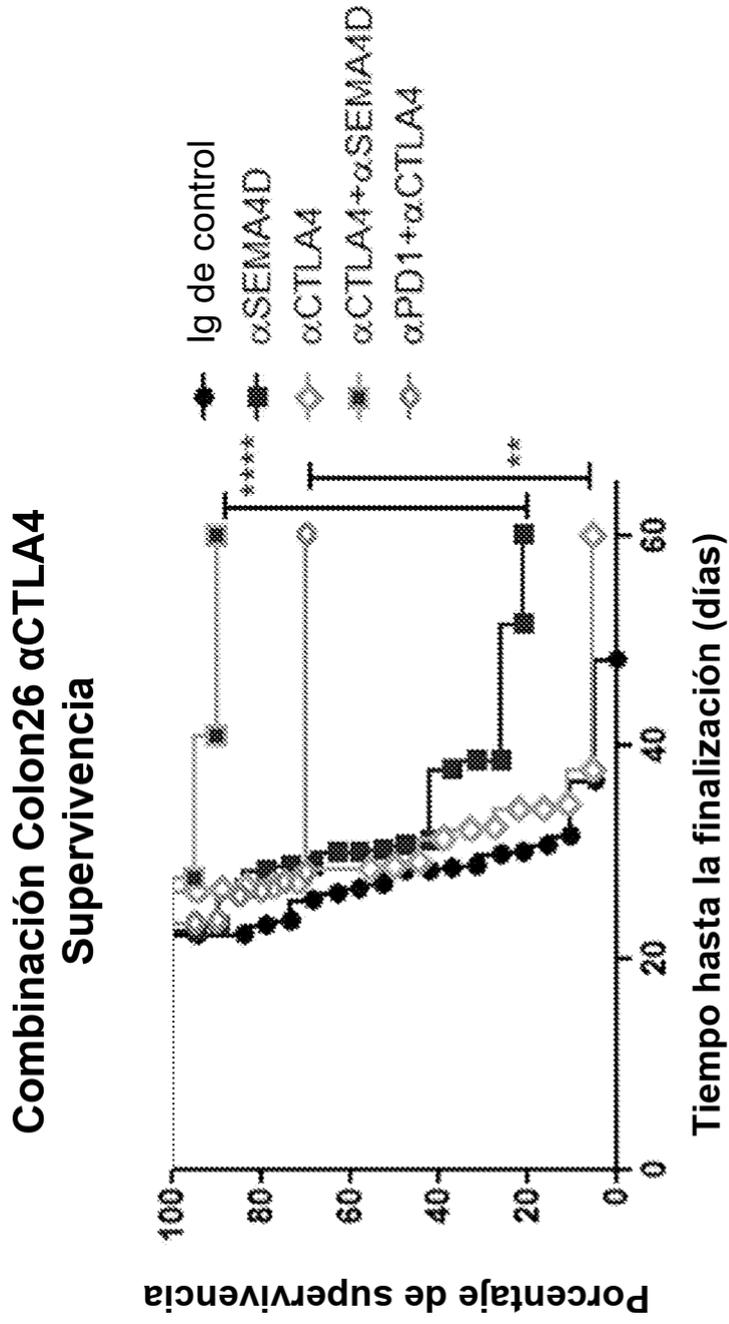


FIG. 5B

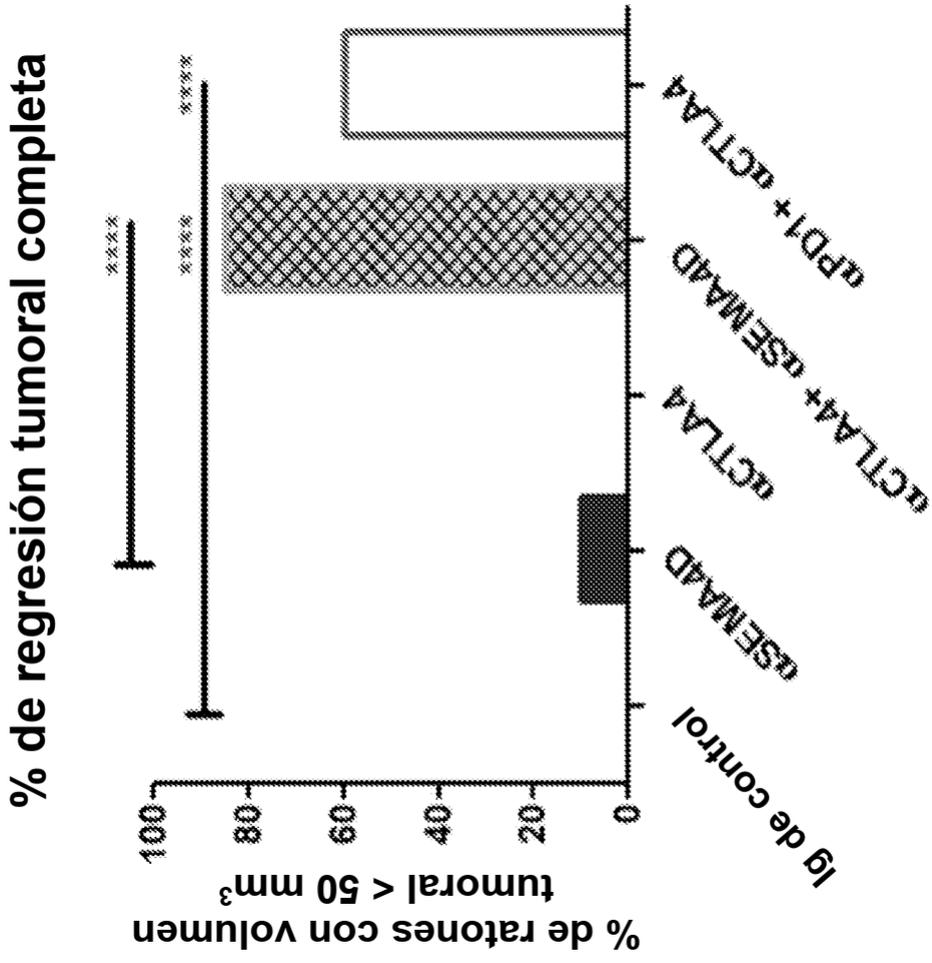


FIG. 5C

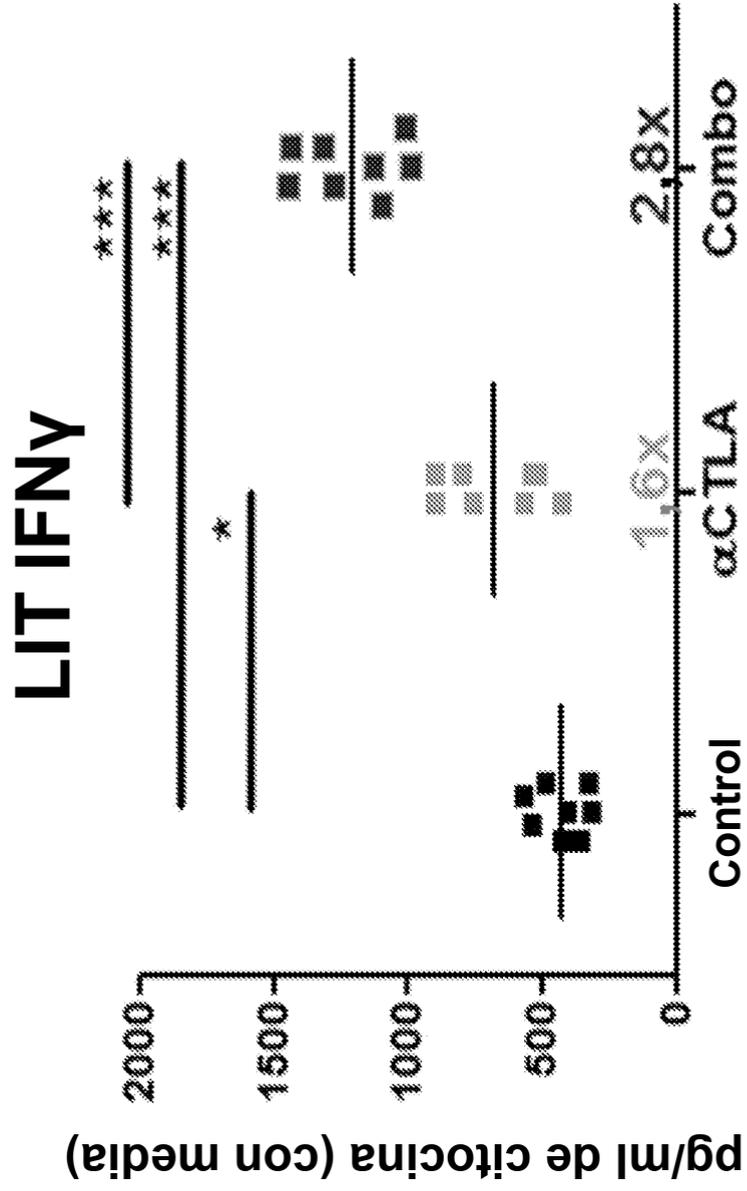


FIG. 5D

Respuesta inmunodominante de CTL específica de péptidos

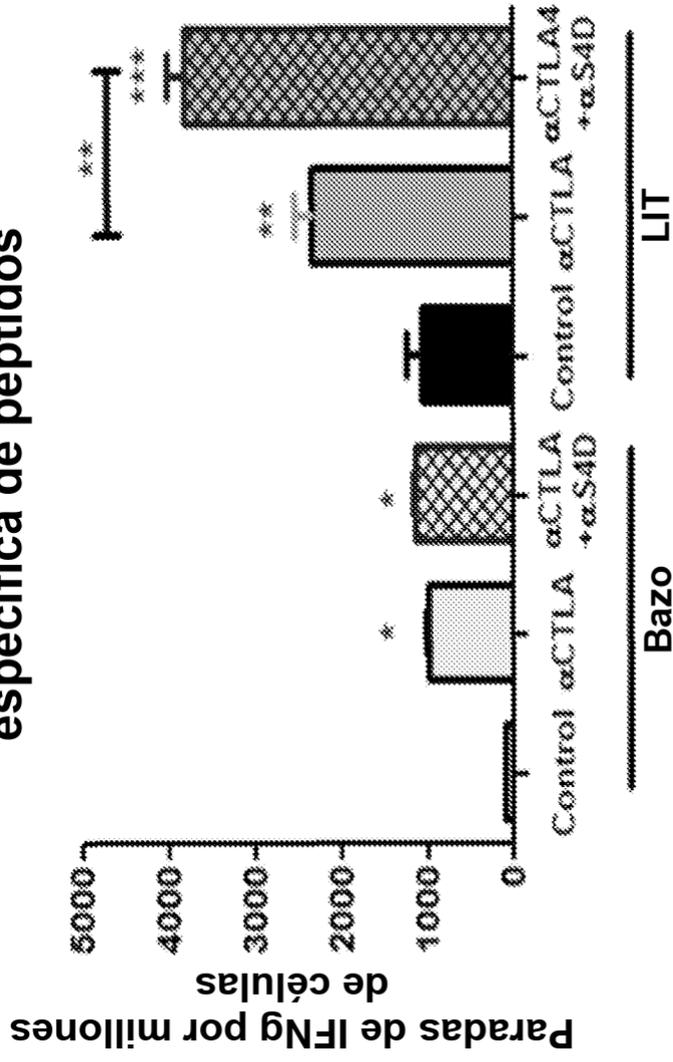


FIG. 5E

Frecuencia de LIT del MHC-I secretores de IFN γ reactivos a péptidos tumorales

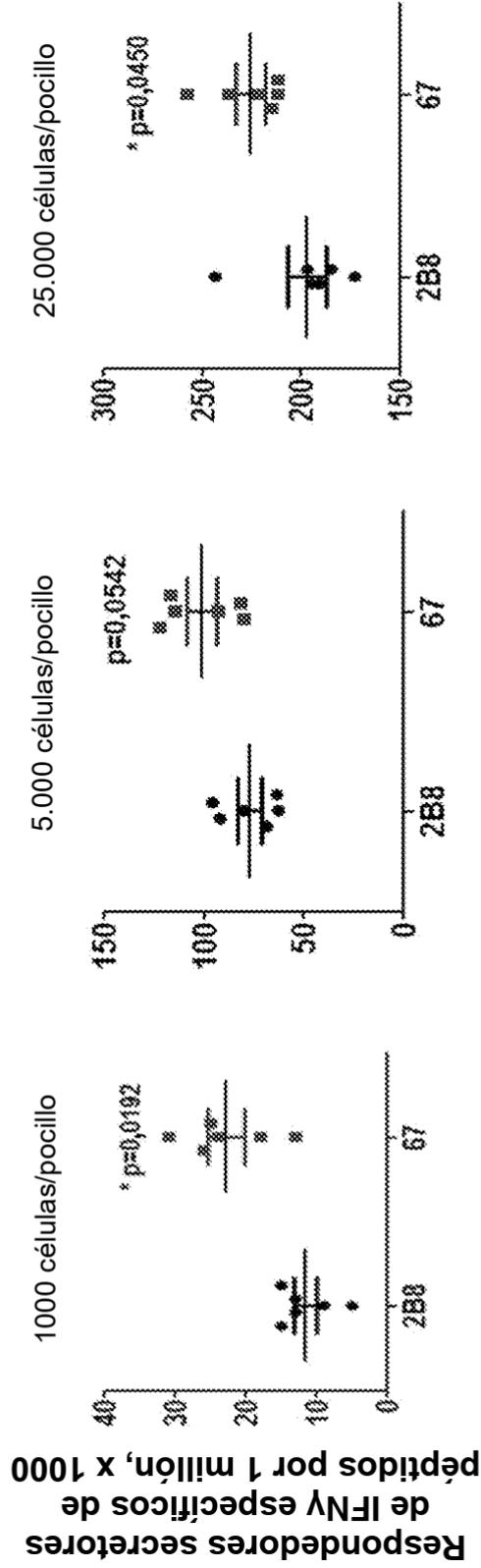


FIG. 6A

Frecuencia de LIT del MHC-I secretores de IFN γ reactivos a péptidos tumorales

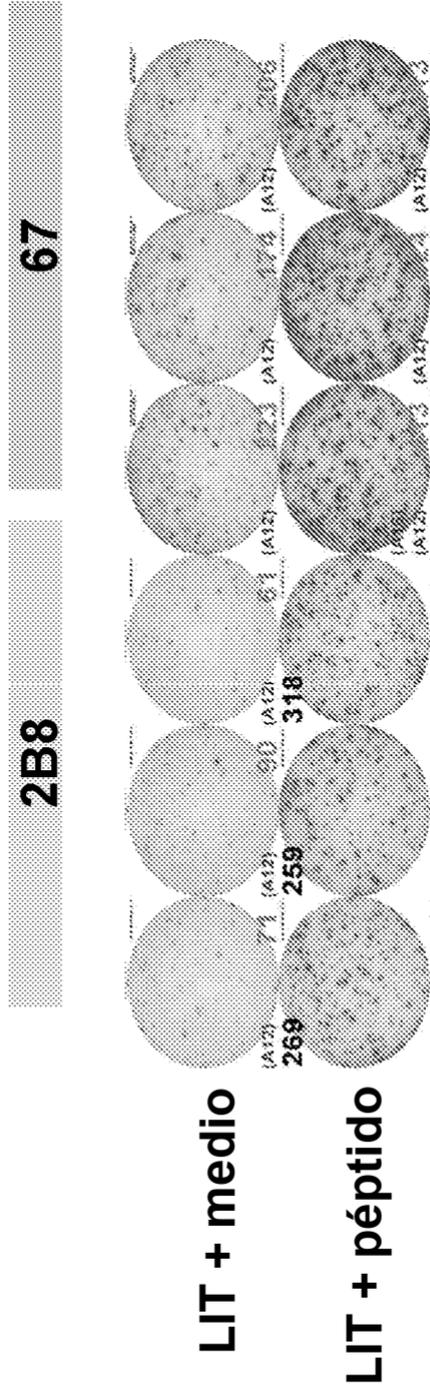


FIG. 6B

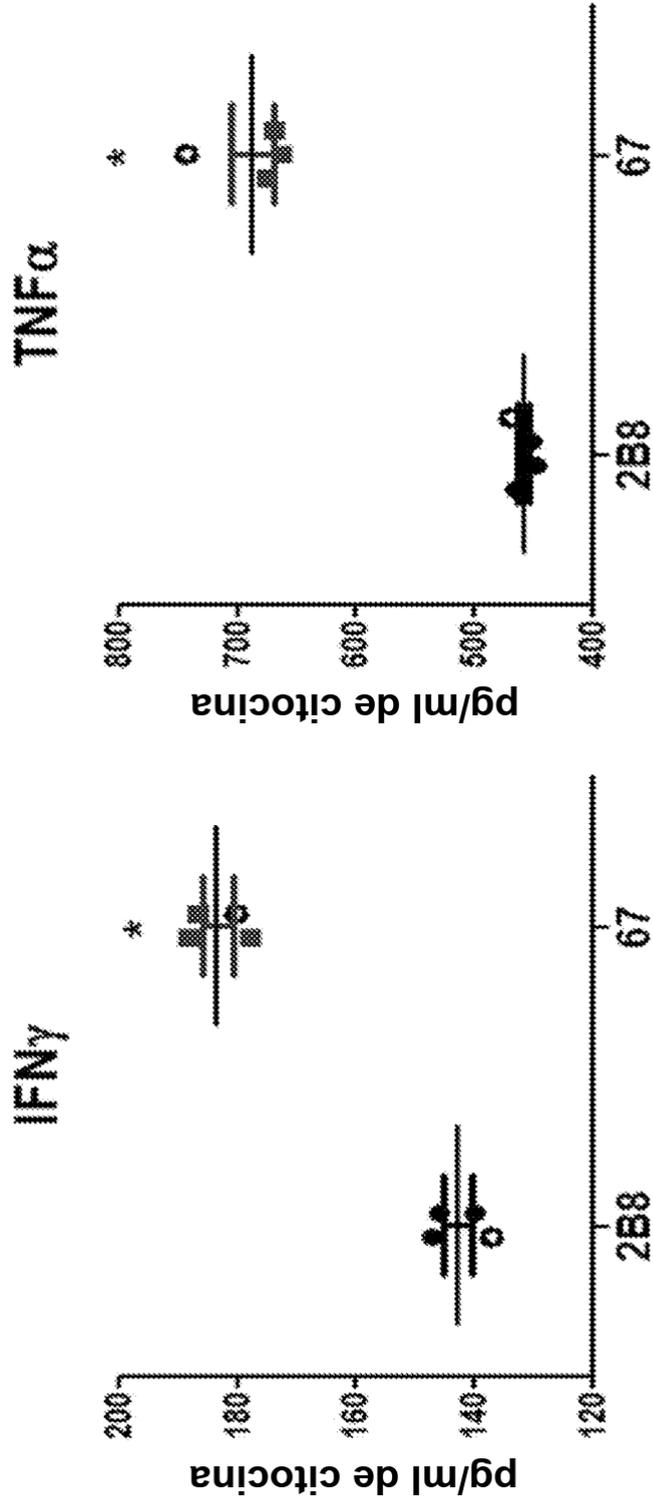


FIG. 6C

Secreción de citosina por LIT CD45+

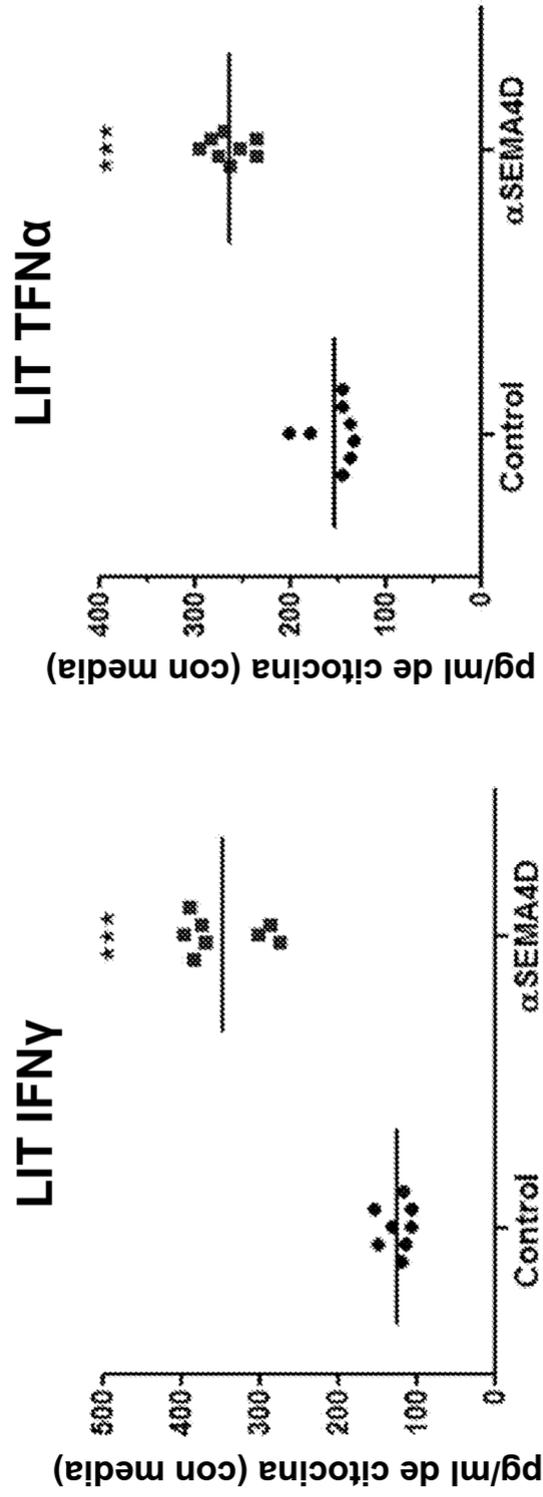


FIG. 6D

Frecuencia de CTL específicos de tumor

Respuesta inmunodominante de CTL específica de péptidos

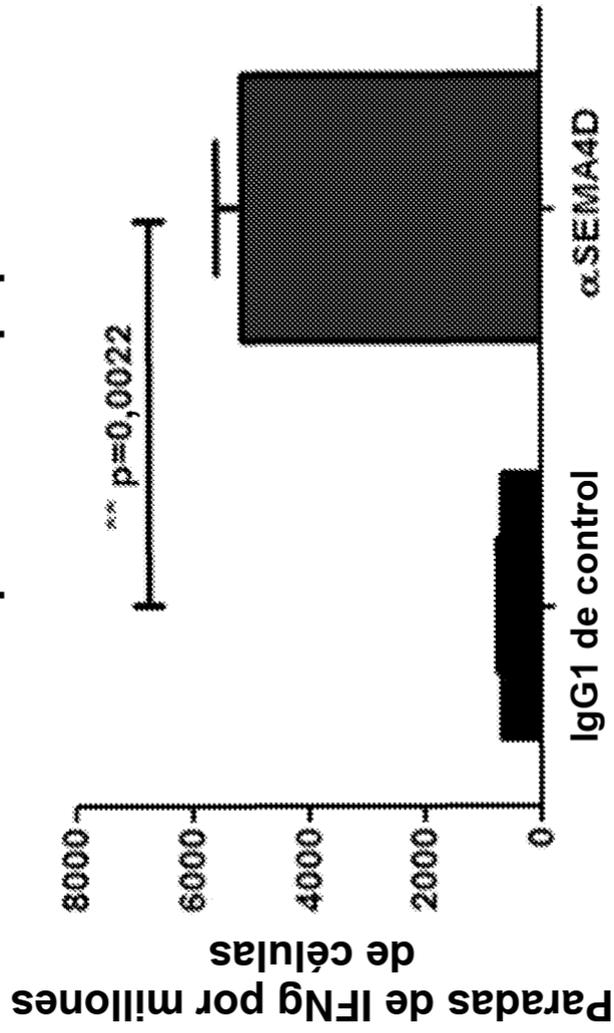


FIG. 6E

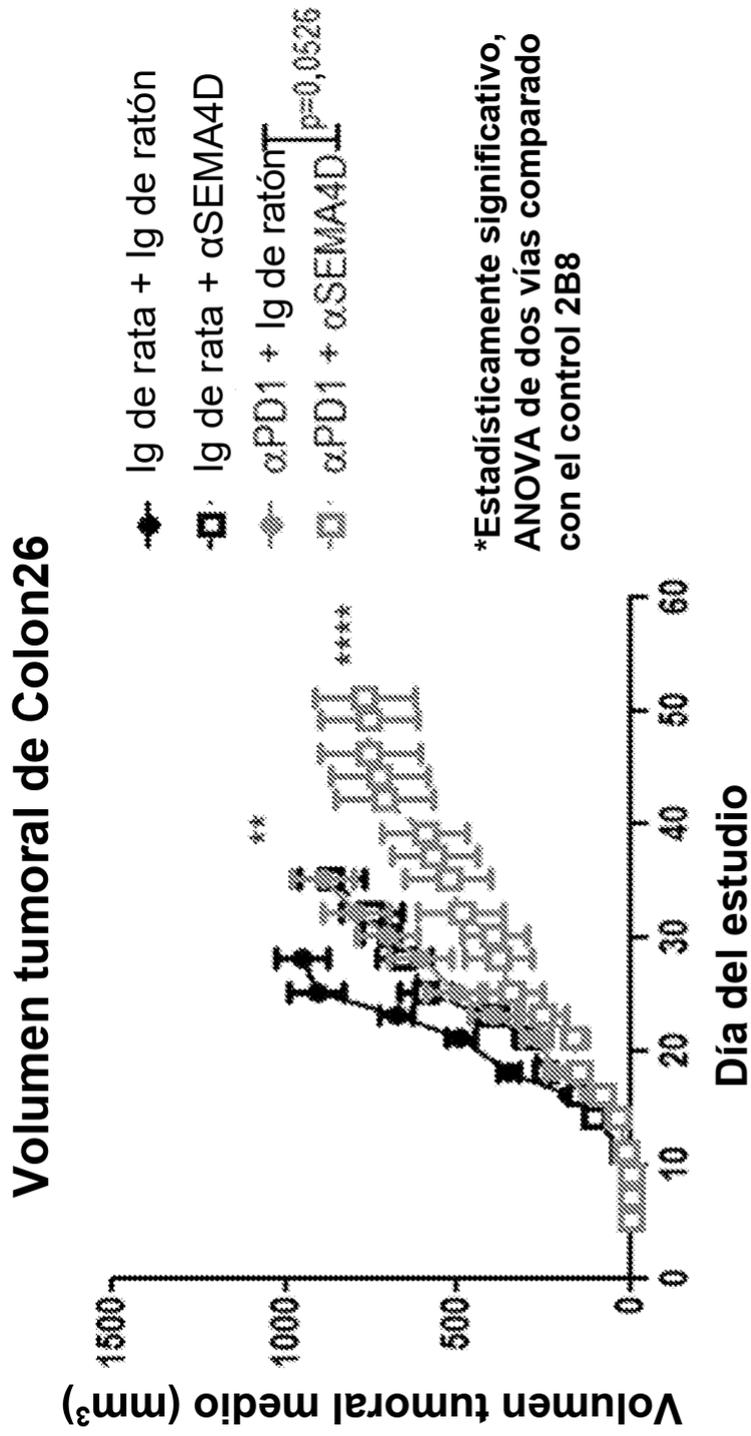


FIG. 7A

Supervivencia de Colon26

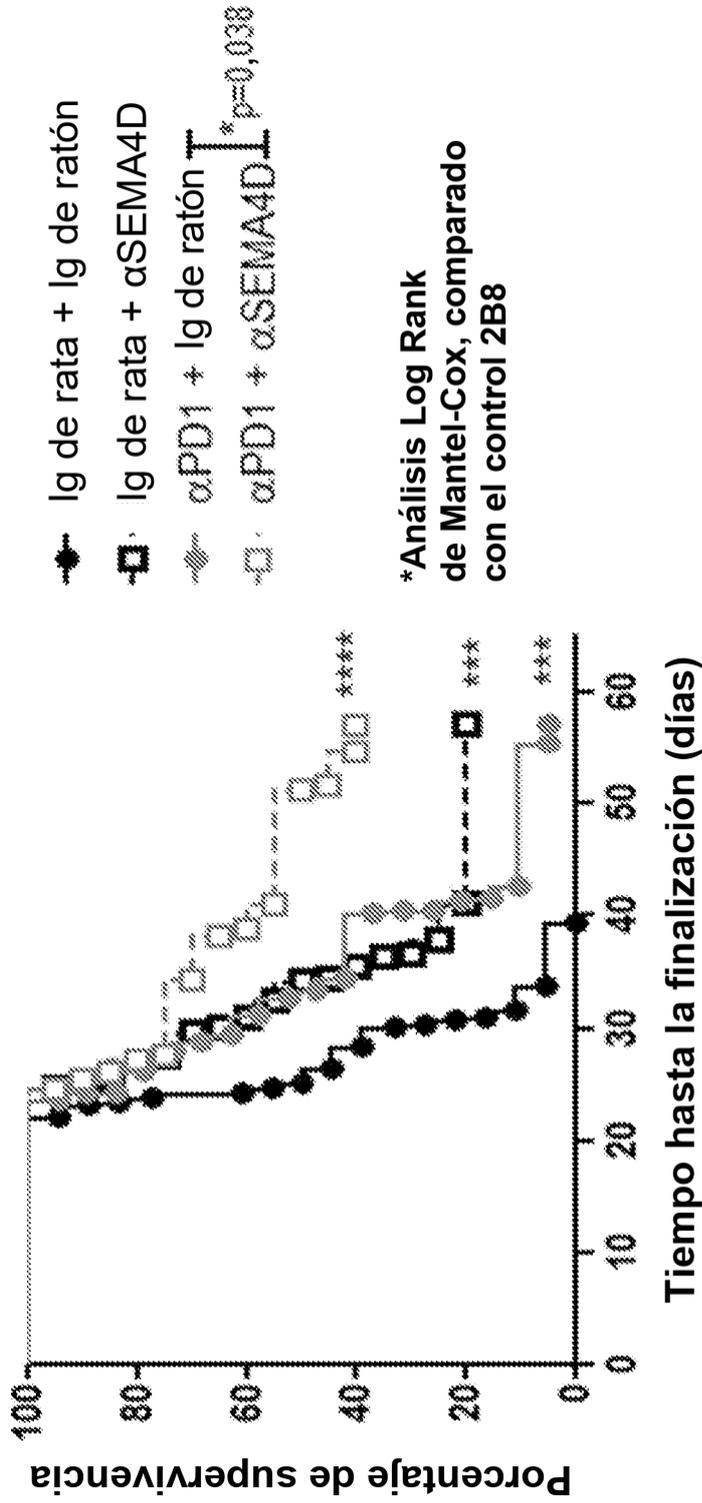


FIG. 7B

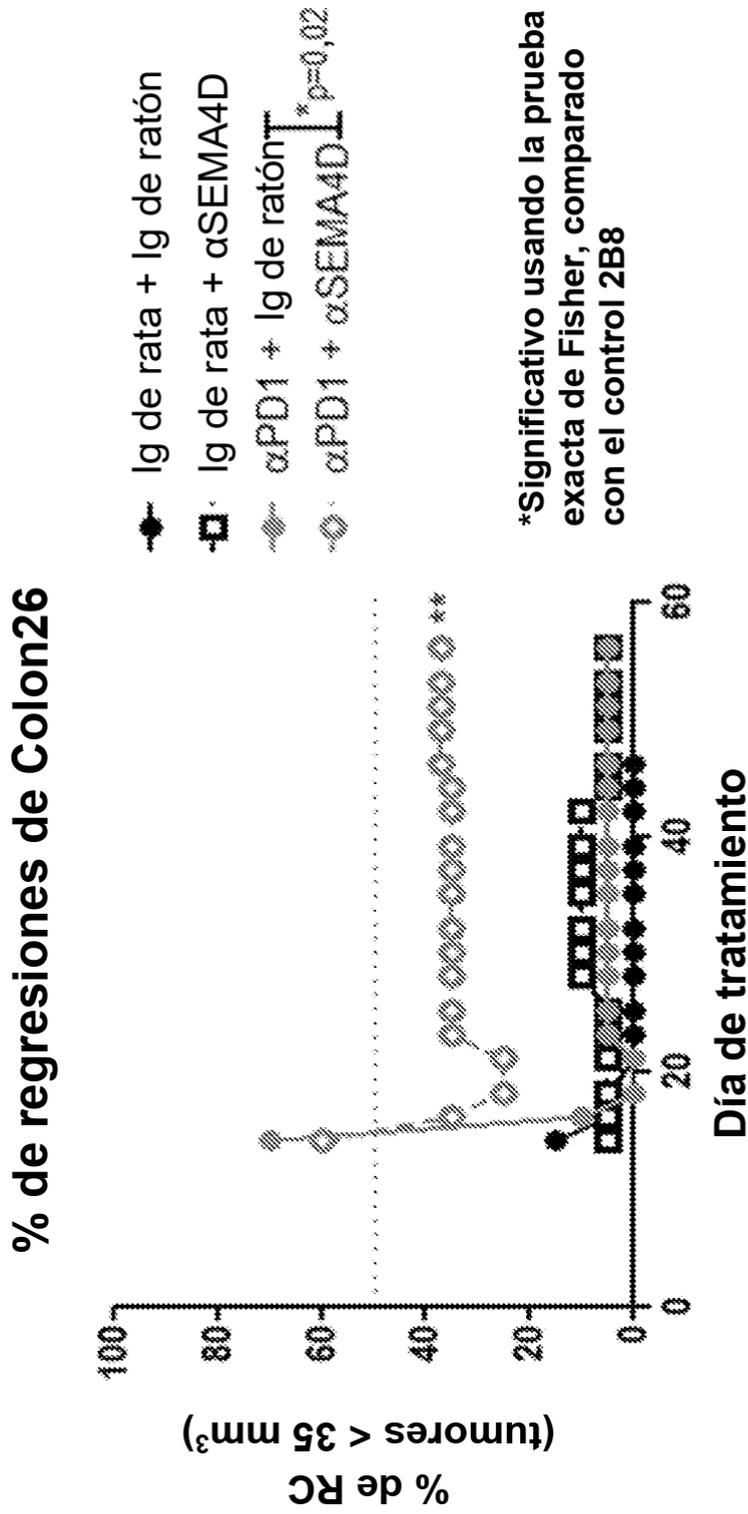


FIG. 7C

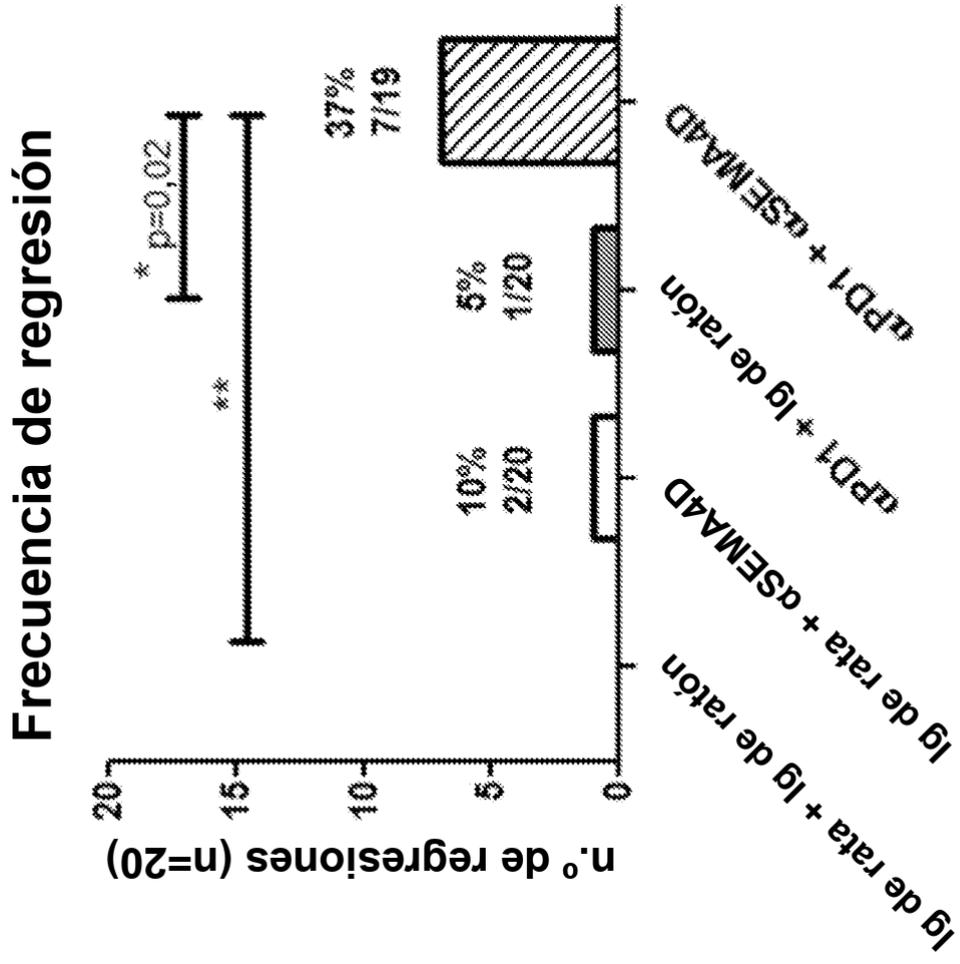


FIG. 7D

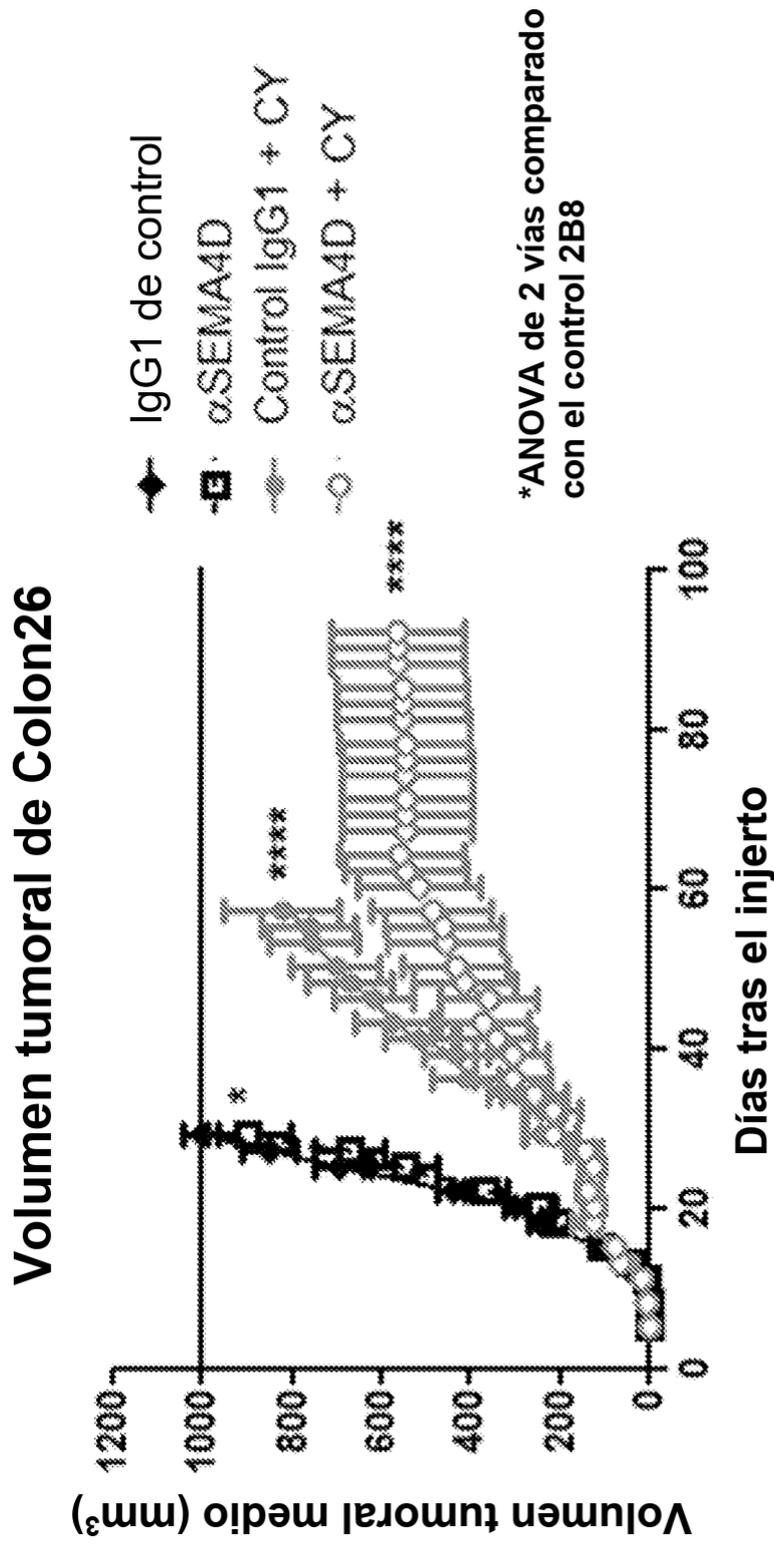


FIG. 8A

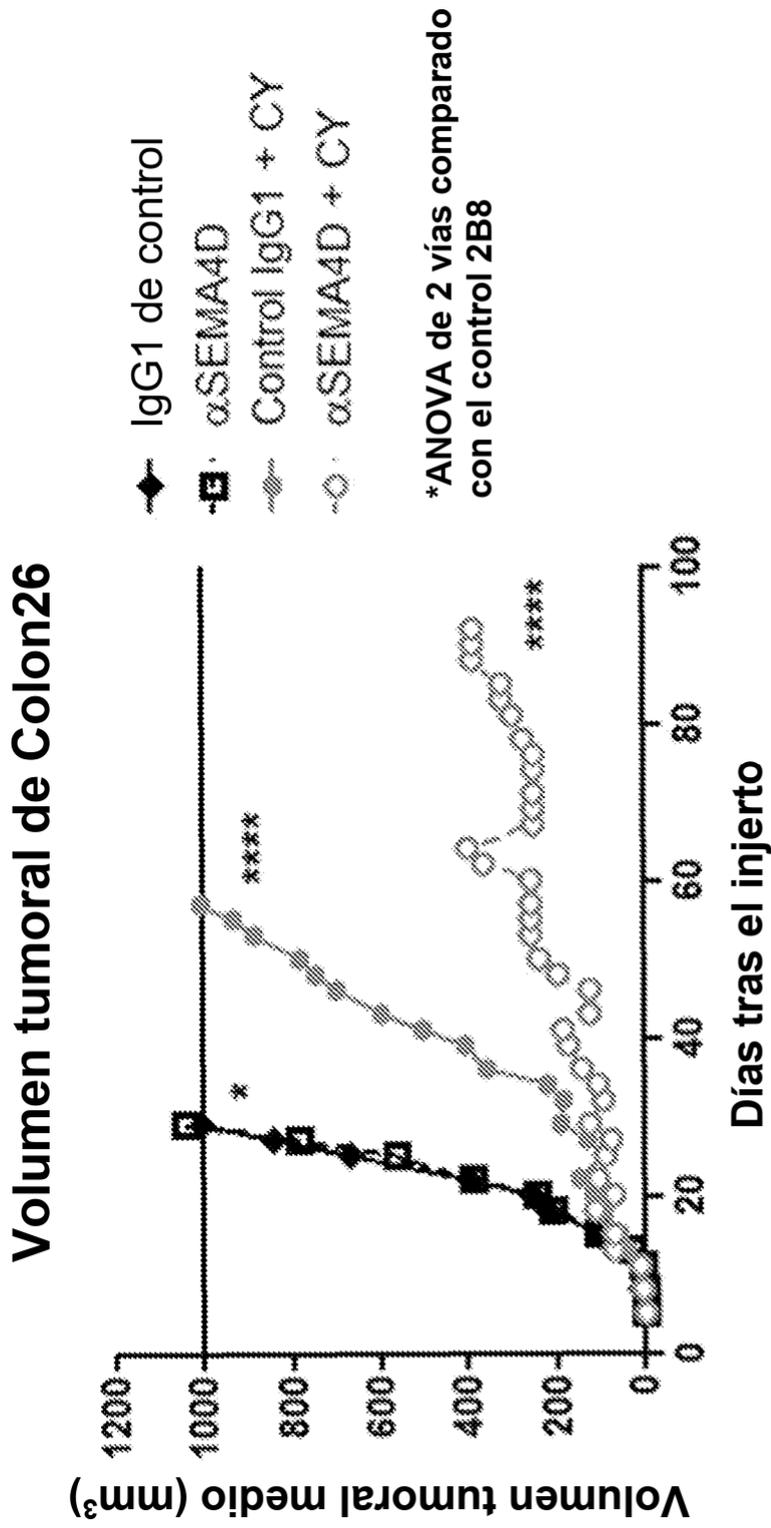


FIG. 8B

Supervivencia de Colon26

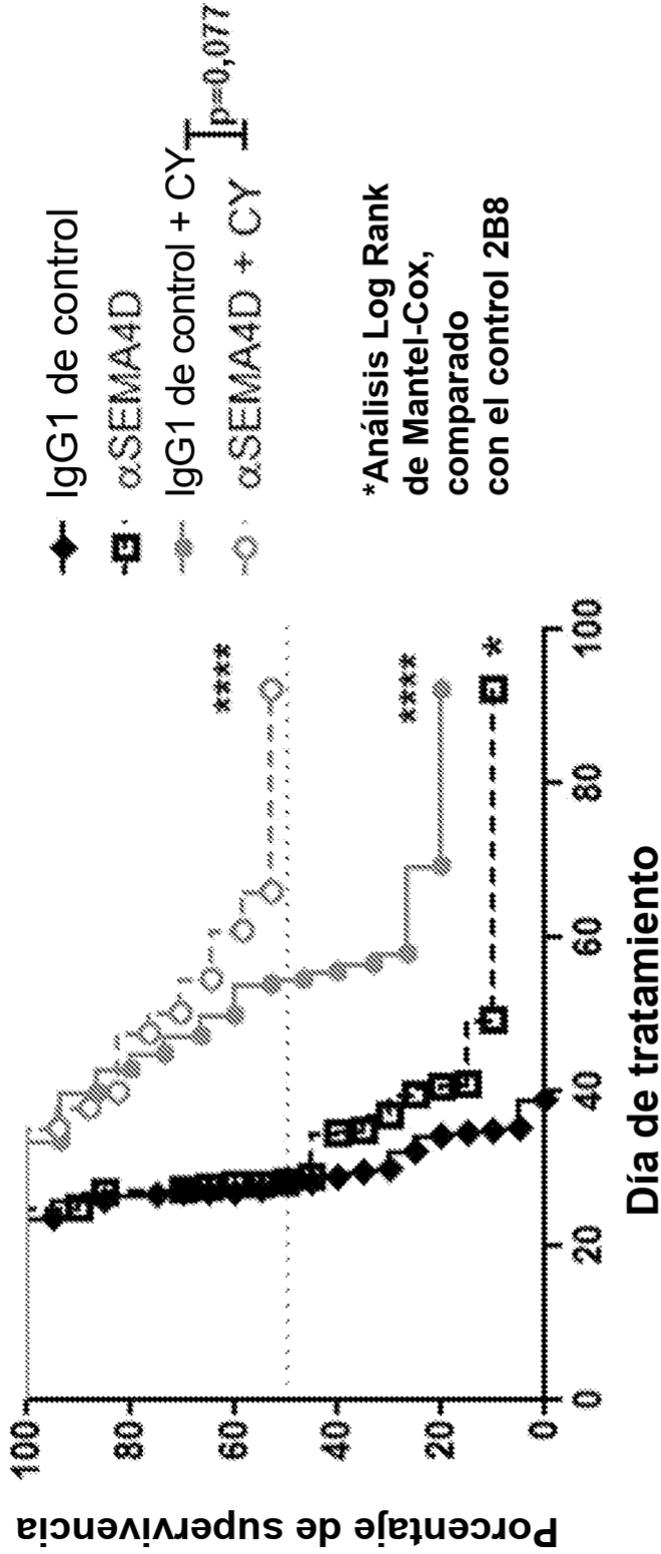


FIG. 8C

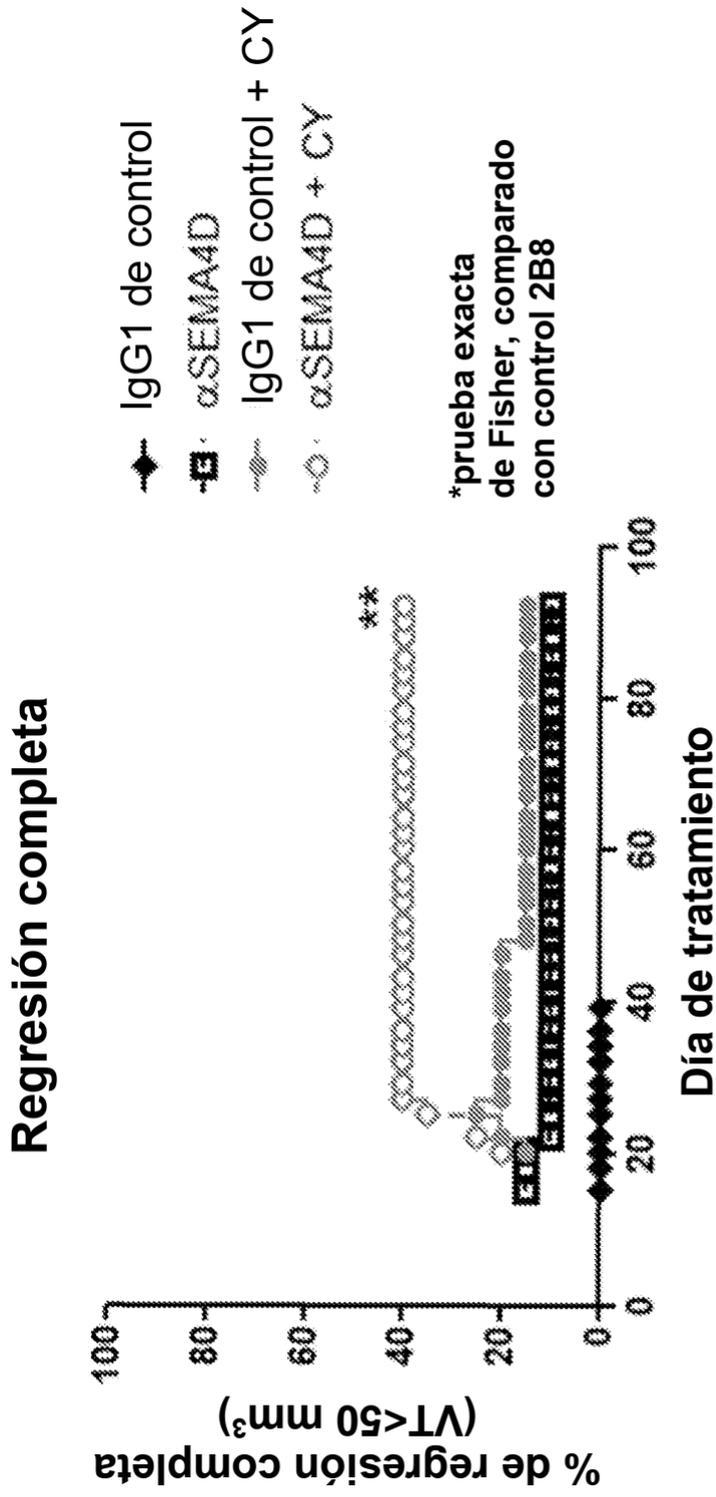


FIG. 8D

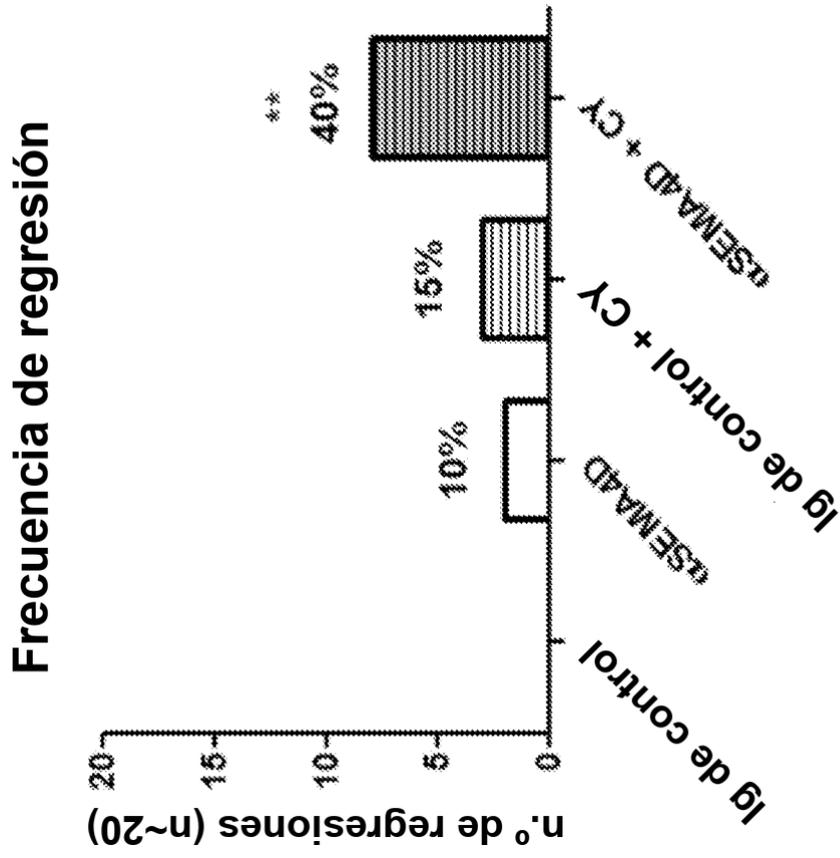


FIG. 8E

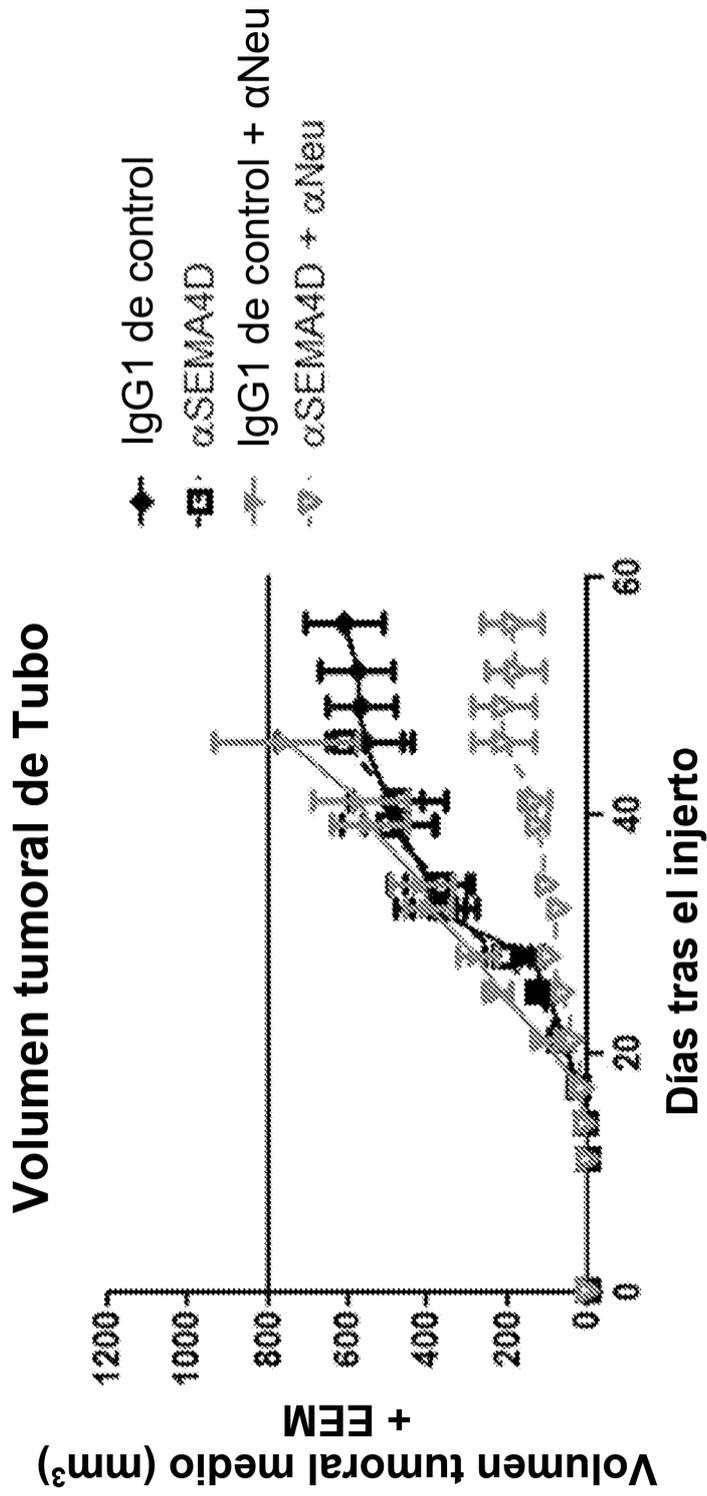


FIG. 9A

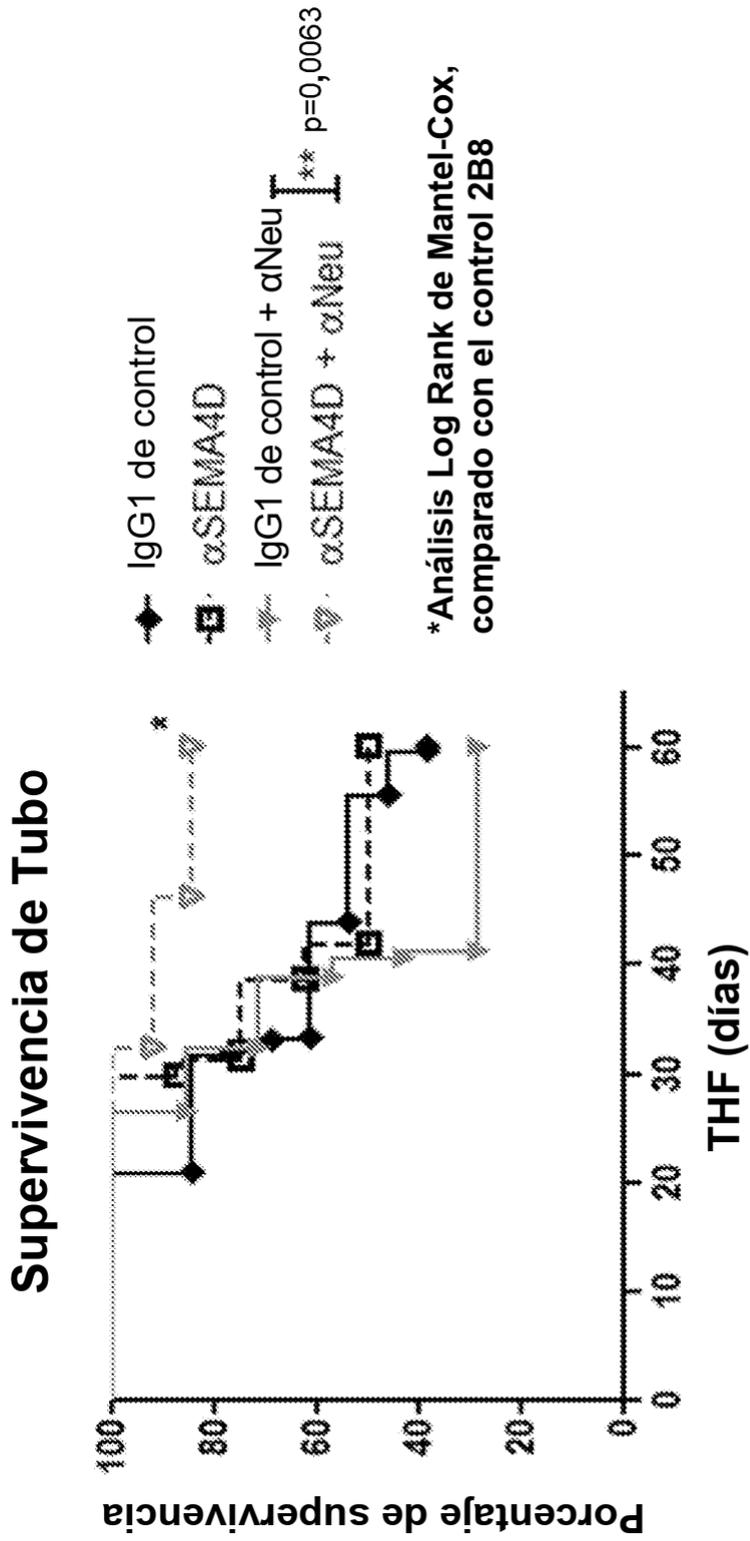


FIG. 9B

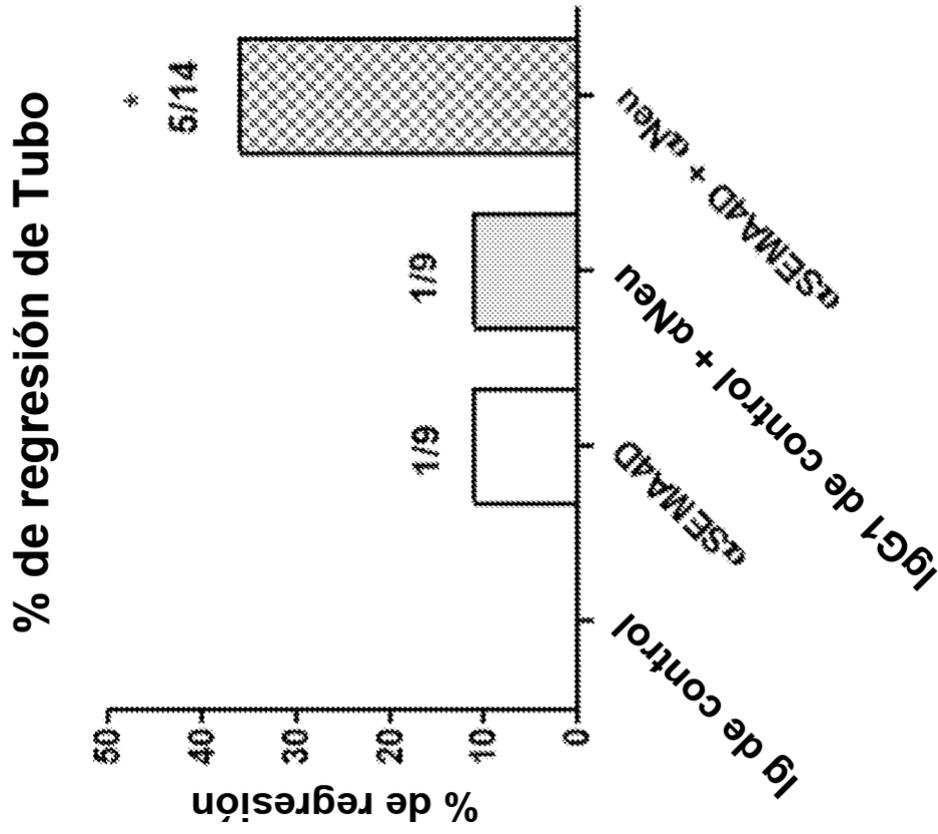


FIG. 9C

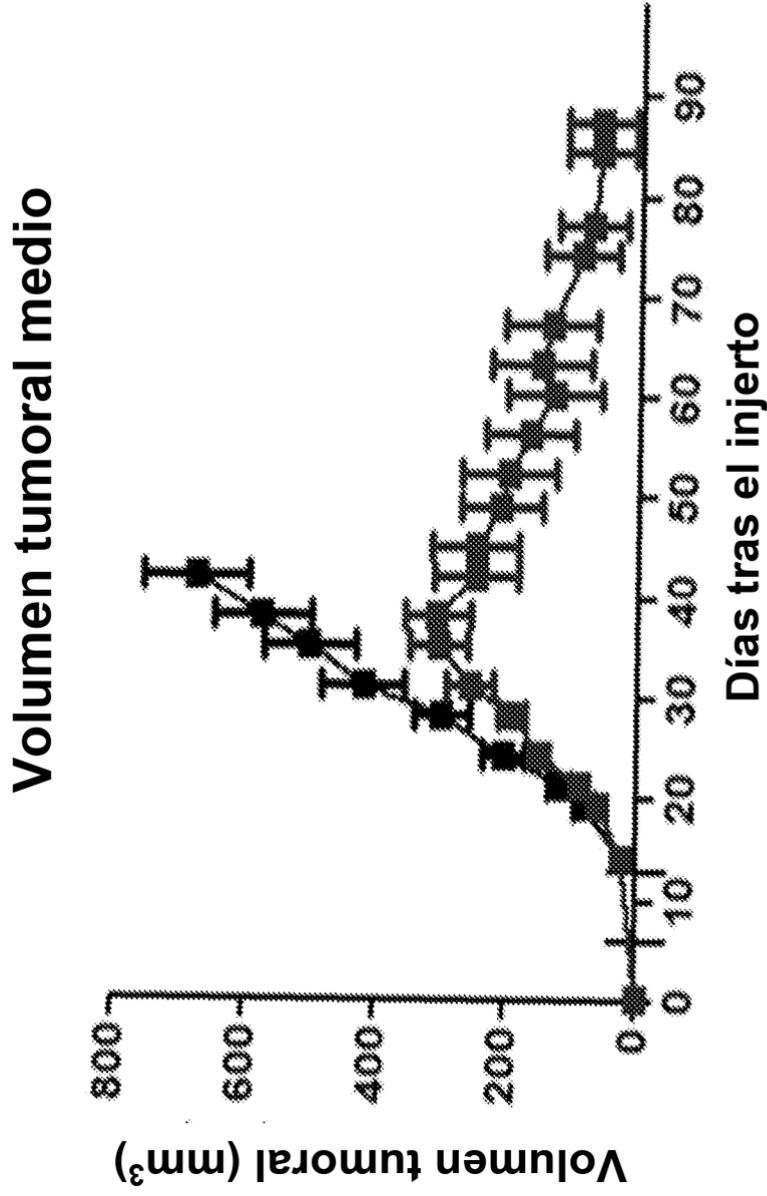


FIG. 10A

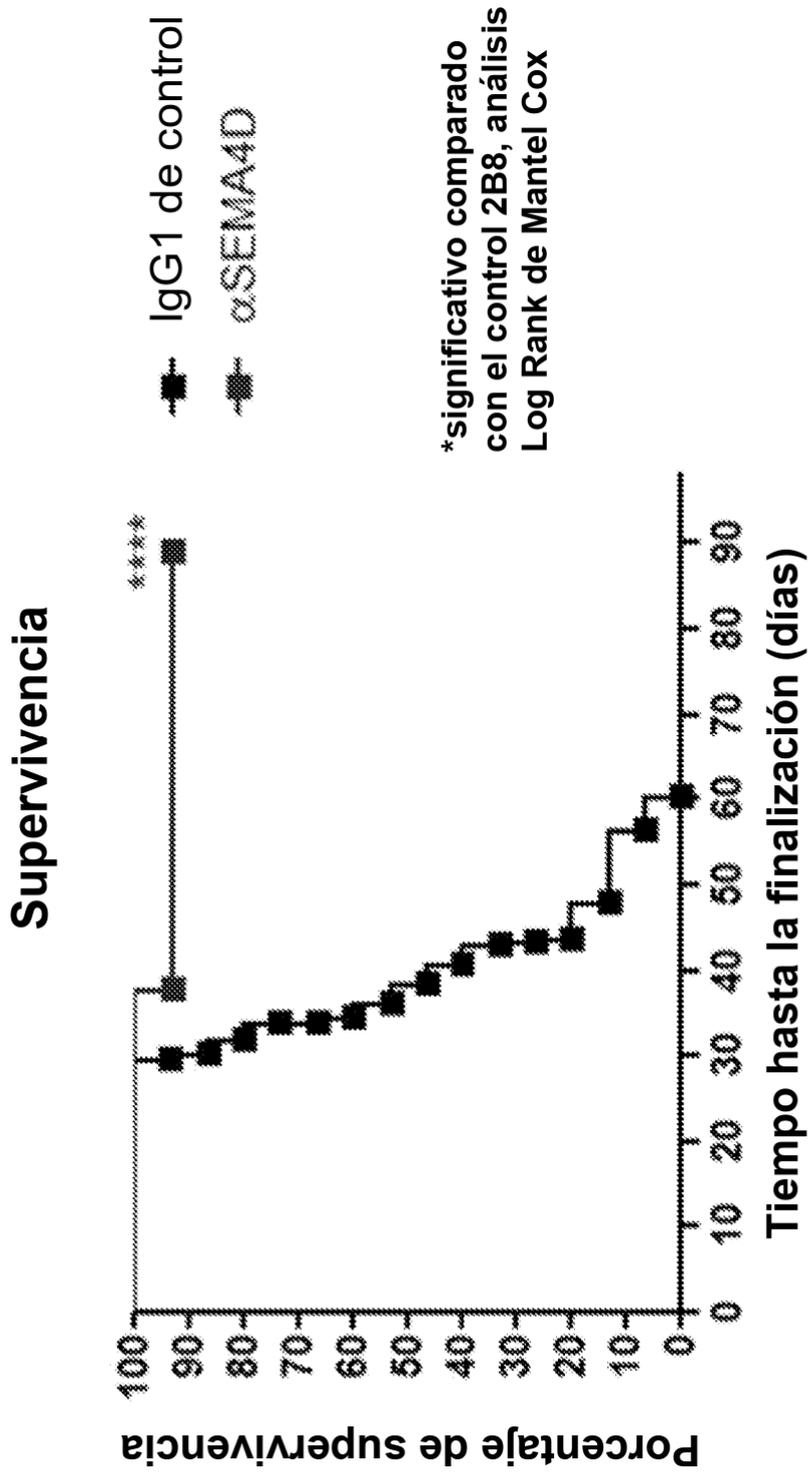


FIG. 10B

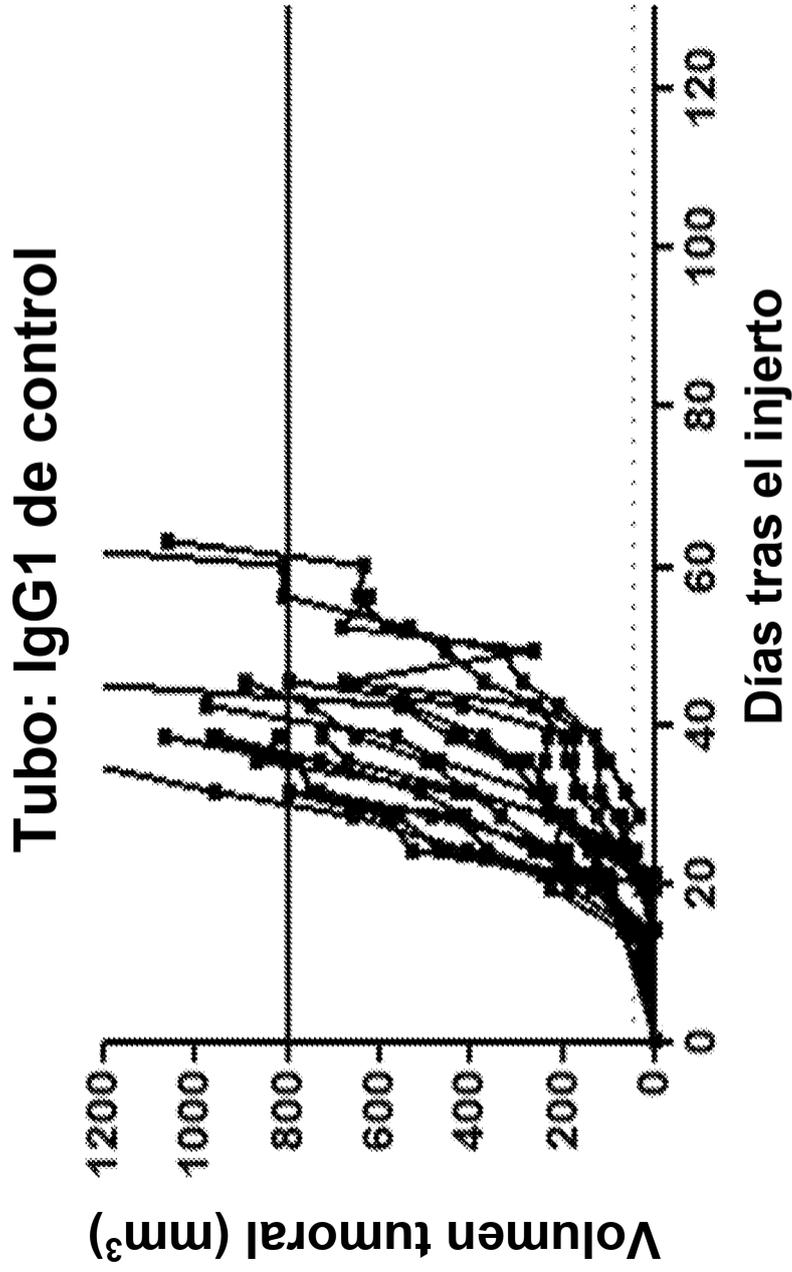


FIG. 10C

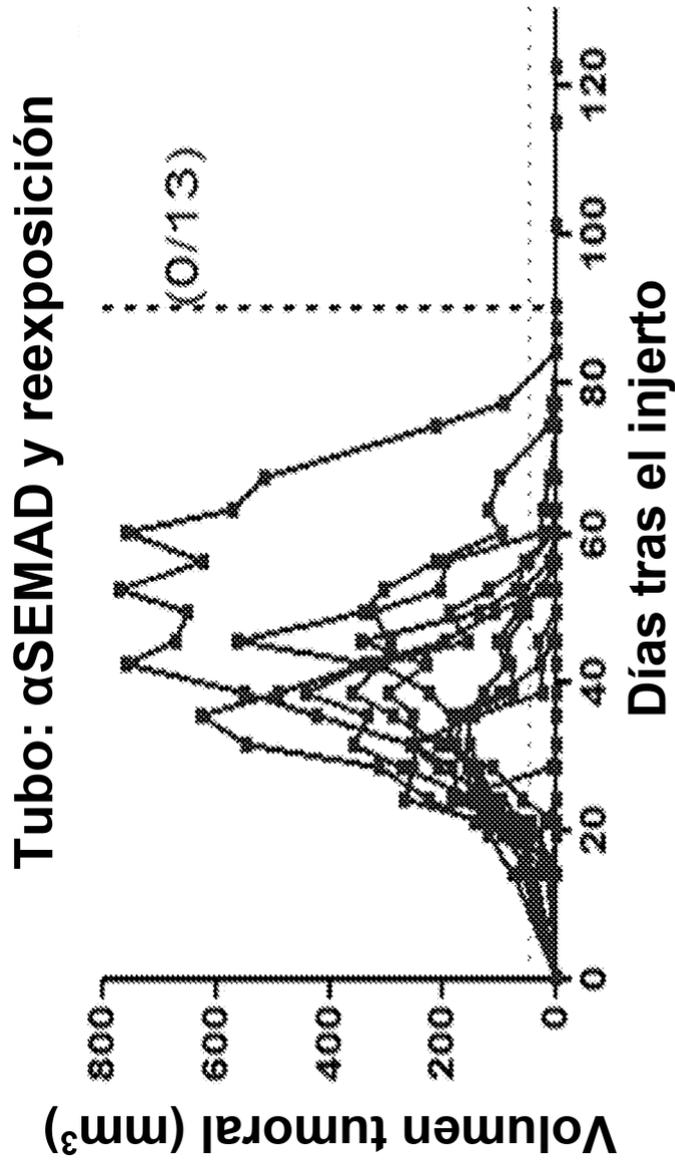


FIG. 10D

Tubo: reexposición de Balb/c sin exposición previa

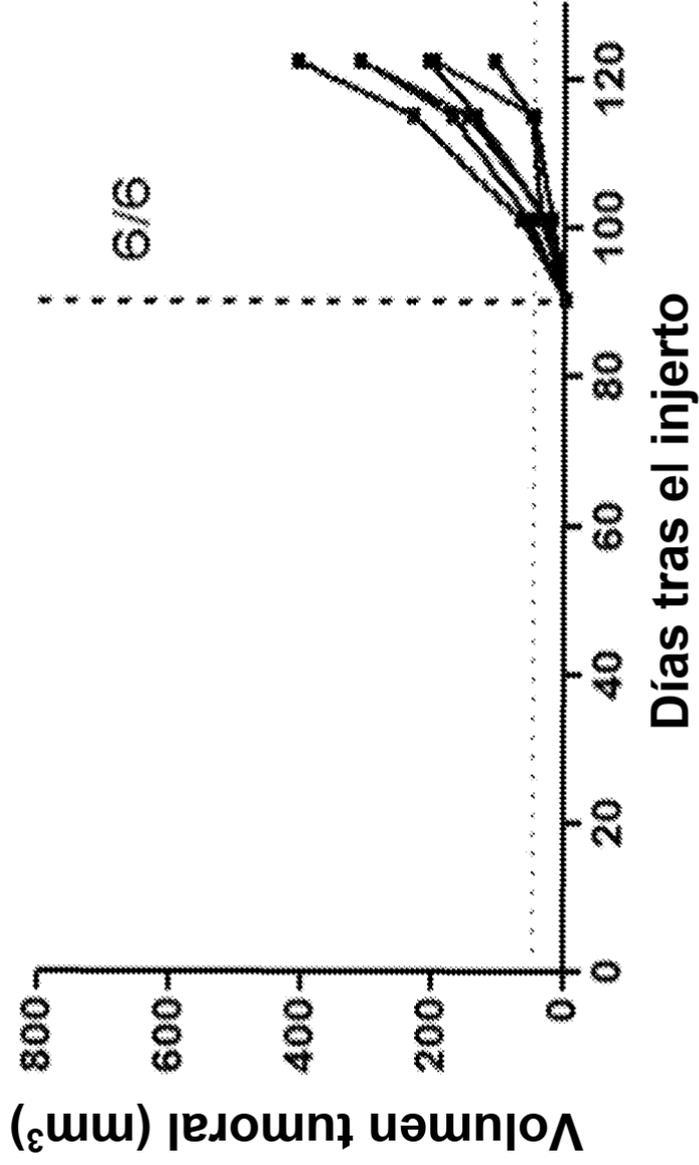


FIG. 10E

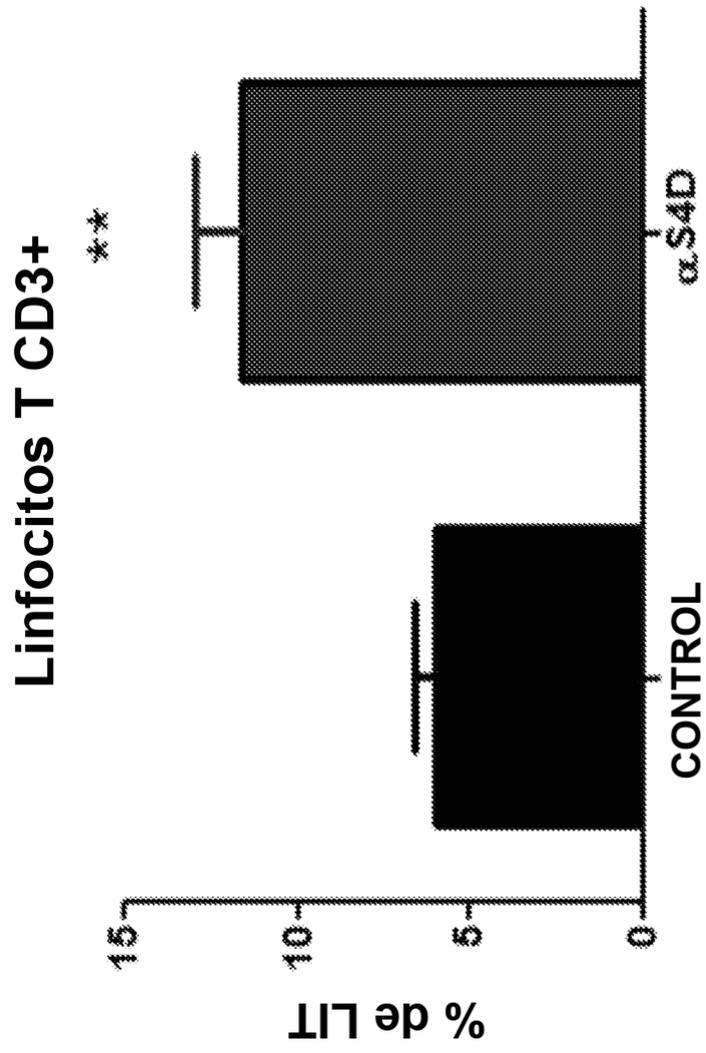


FIG. 11A

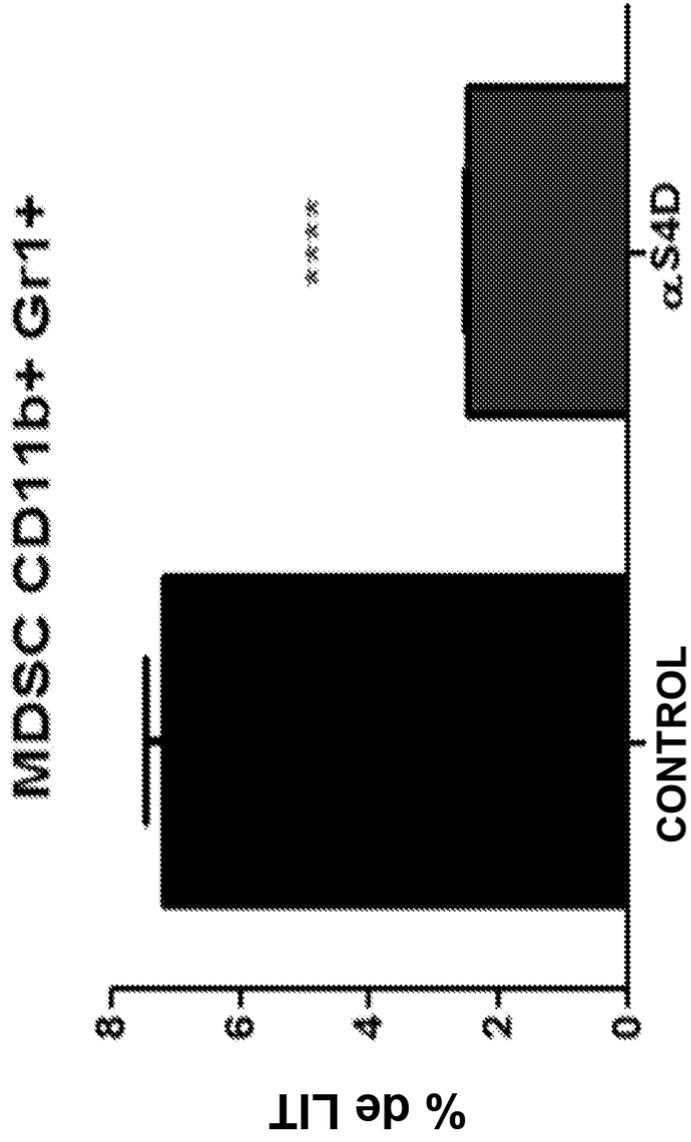


FIG. 11B

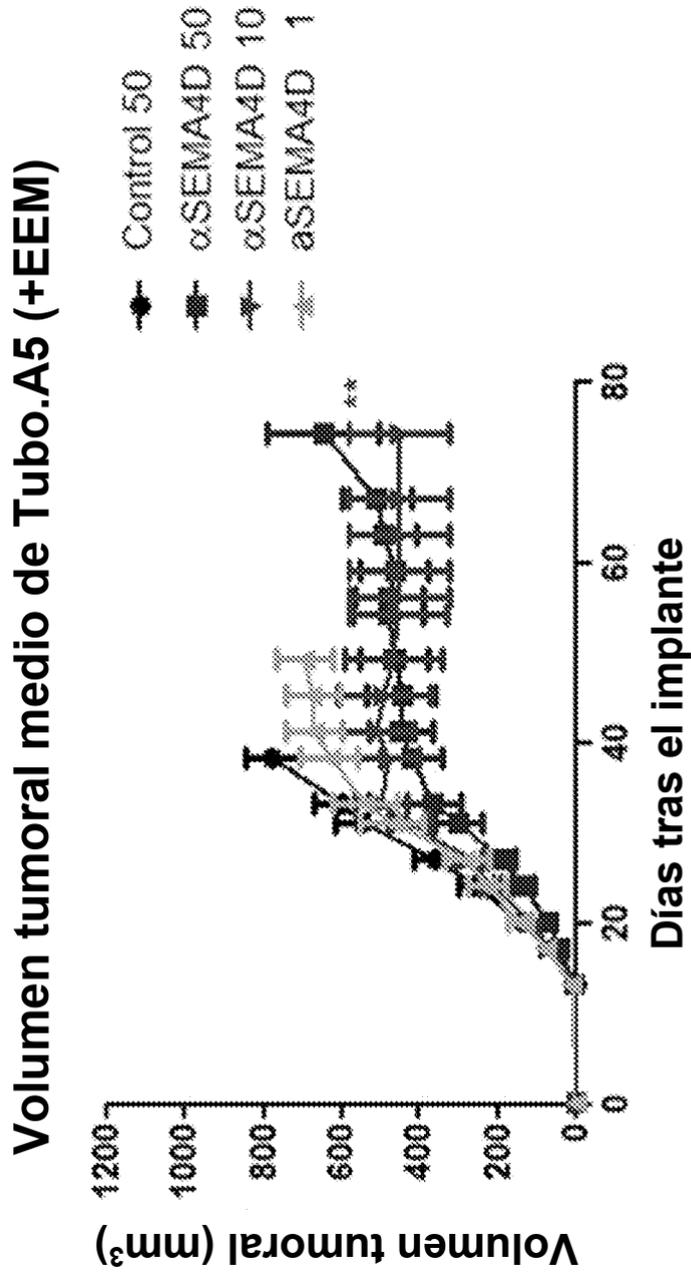


FIG. 12A

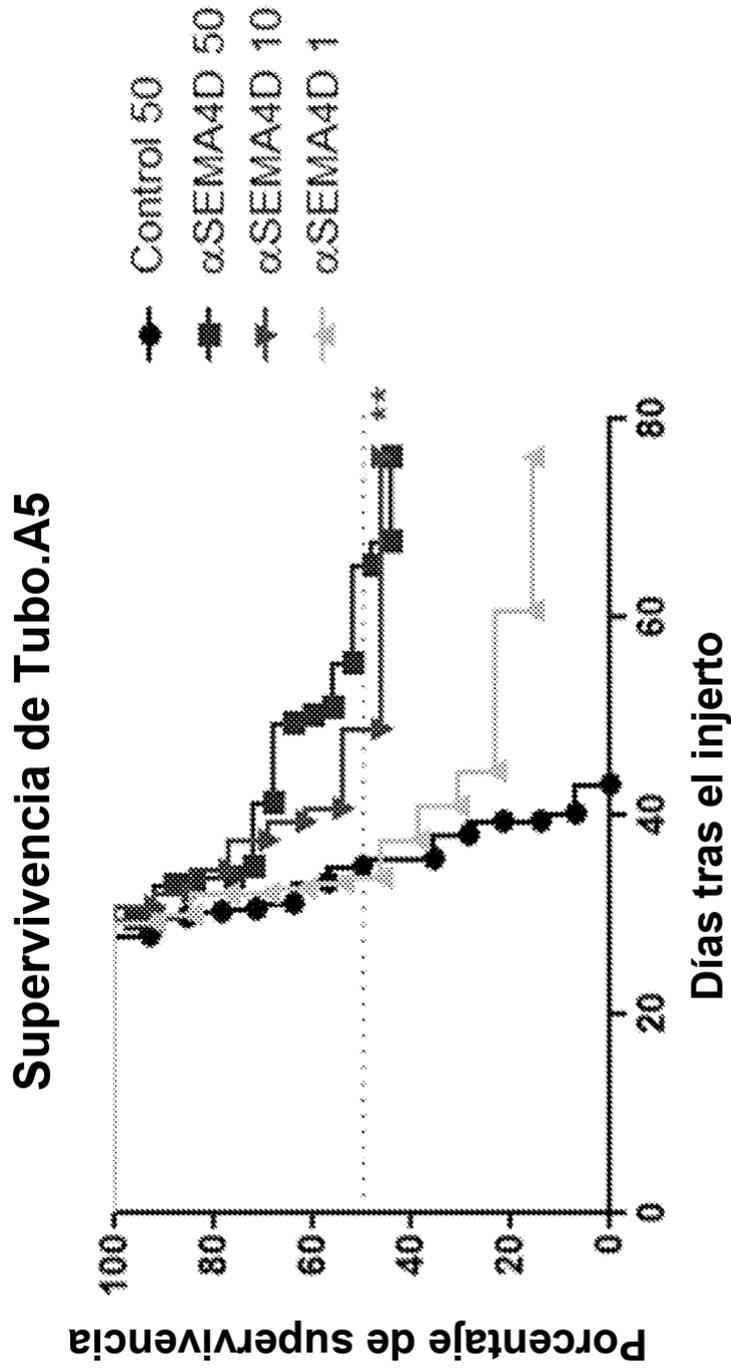


FIG. 12B

Colon26 volumen tumoral medio (+EEM)

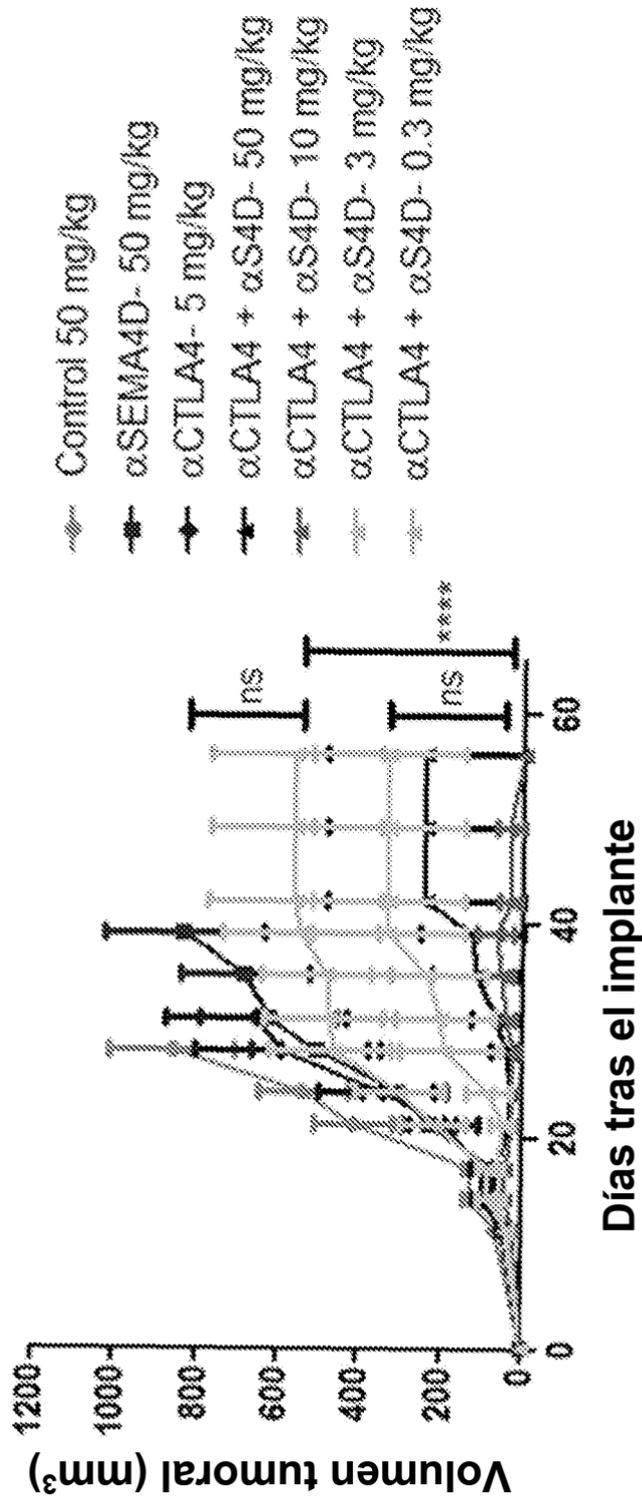


FIG. 12C

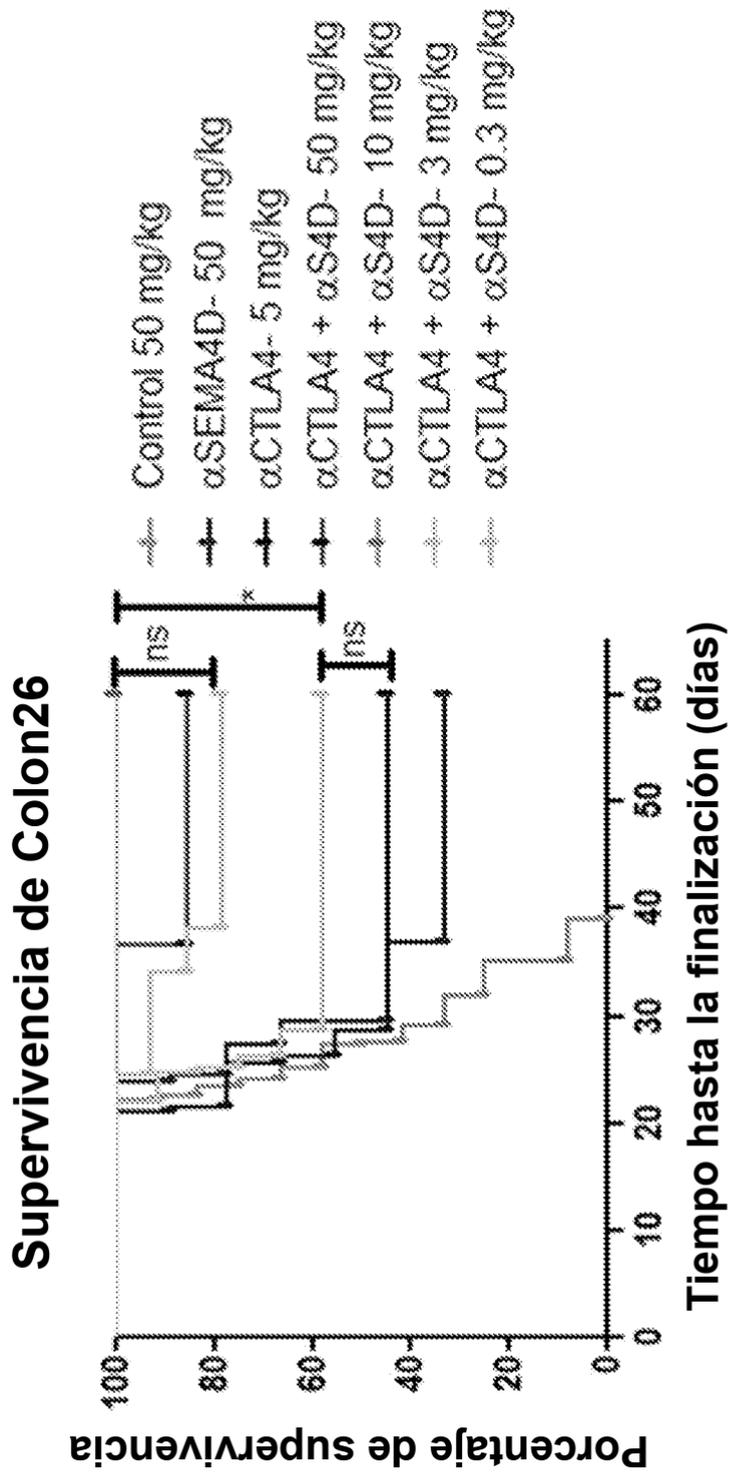


FIG. 12D

Modelo	Tratamiento	% de regresión tumoral completa % n.º de ratones n.º de estudios Estad. sig*			Crecimiento tras la reexposición tumoral
		1%	(3/266)	18	
Colon26	Control	1%	(3/266)	18	ND
	αSEMA4D	7%	(21/289)	18	0/2
	αPD1	8%	(3/40)	2	ND
	αPD1 + αSEMA4D	28%	(11/40)	2	ND
	αCTLA4	20%	(14/69)	4	1/8
	αCTLA4 + αSEMA4D	74%	(43/58)	3	0/21
	αCTLA4 + aPD1	60%	(12/20)	1	ND
	Ciclofosfamida	10%	(3/30)	2	0/3
	Ciclofosfamida + αSEMA4D	40%	(8/20)	1	0/8
	Control	0	(0/27)	2	ND
	αSEMA4D	85%	(23/27)	2	0/13
	αCTLA4	23%	(3/13)	1	ND
αPD1	0	(0/10)	1	ND	
αCTLA4 + aPD1	14%	(2/14)	1	ND	

*Estadísticamente significativo, prueba exacta de Fisher. Resultados del informe de Prism como no significativos (ns) a $P > 0,05$, significativo a $0,01 < P \leq 0,05$ (simbolizado como *), muy significativo (**) a $0,001 < P \leq 0,01$, y extremadamente significativo (***) a $P \leq 0,001$.

FIG. 13