



## (12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 105492016 B

(45) 授权公告日 2024.12.06

(21) 申请号 201480047166.7

(72) 发明人 E·E·埃文斯 E·S·史密斯

(22) 申请日 2014.06.20

M·左德勒

(65) 同一申请的已公布的文献号

(74) 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公司 31100

申请公布号 CN 105492016 A

专利代理人 余颖 陶家蓉

(43) 申请公布日 2016.04.13

(51) Int.CI.

(30) 优先权数据

A61K 38/00 (2006.01)

61/839,170 2013.06.25 US

A61P 35/00 (2006.01)

61/874,241 2013.09.05 US

C07K 1/00 (2006.01)

61/884,771 2013.09.30 US

C12N 5/07 (2006.01)

61/907,845 2013.11.22 US

C12N 5/16 (2006.01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

(56) 对比文件

2016.02.25

CN 102458468 A, 2012.05.16

(86) PCT国际申请的申请数据

WO 2008100995 A1, 2008.08.21

PCT/US2014/043466 2014.06.20

CA 2762446 A1, 2013.06.06

(87) PCT国际申请的公布数据

审查员 王小玉

W02014/209802 EN 2014.12.31

(73) 专利权人 瓦西尼斯公司

权利要求书2页 说明书42页

地址 美国纽约州

序列表19页 附图43页

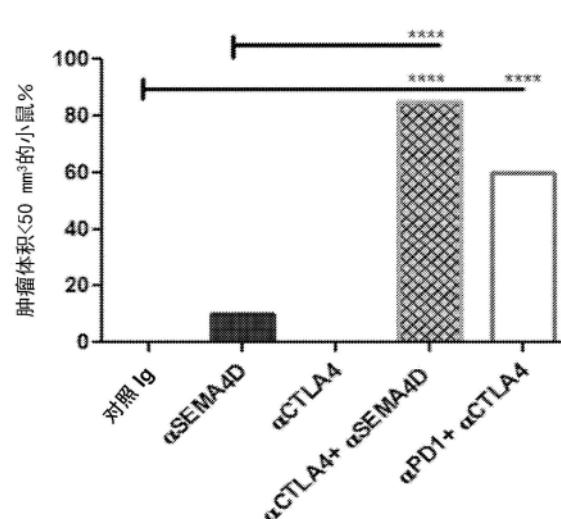
## (54) 发明名称

脑信号蛋白-4D抑制分子与免疫调节治疗联用以抑制肿瘤生长和转移的应用

## 完全肿瘤消退%

## (57) 摘要

本发明提供了抑制、延迟或减少对象中从蛋白-B1-表达癌细胞的肿瘤生长和转移的方法，该方法包括给予该对象有效量的特异性结合脑信号蛋白-4D (SEMA4D) 的分离的结合分子与有效量的至少一种其他免疫调节治疗。



1. 特异性结合脑信号蛋白-4D(SEMA4D)的分离的抗体或其抗原结合片段以及至少一种其他免疫调节治疗剂在制备用于在结肠癌患者中抑制、延迟或降低肿瘤生长的药物中的用途,其中抗-SEMA4D抗体或其片段包含可变重链(VH)和可变轻链(VL),其中所述可变重链包含分别由SEQ ID NO: 6、7和8组成的VHCDR1-3,并且所述可变轻链包含分别由SEQ ID NO: 14、15和16组成的VLCDR1-3,所述至少一种其他免疫调节治疗剂选自抗-细胞毒性T-淋巴细胞-相关蛋白4(CTLA4)抗体或其抗原结合片段、抗-程序性细胞死亡1(PD-1)抗体或其抗原结合片段、和环磷酰胺;和

其中所述药物相对于单独抗-SEMA4D抗体或其片段或单独至少一种其他免疫调节治疗剂提供增强的治疗功效。

2. 如权利要求1所述的用途,其中所述抗-SEMA4D抗体或其片段和所述至少一种免疫调节治疗剂配制为分开放药。

3. 如权利要求1所述的用途,其中所述抗-SEMA4D抗体或其片段和所述至少一种免疫调节治疗剂配制为同时给药。

4. 如权利要求1所述的用途,其中VH和VL分别包含SEQ ID NO: 9和SEQ ID NO: 17或SEQ ID NO: 10和SEQ ID NO: 18。

5. 特异性结合脑信号蛋白-4D(SEMA4D)的分离的抗体或其抗原结合片段以及抗-HER2/Neu抗体在制备用于在乳腺癌患者中抑制、延迟或降低肿瘤生长的药物中的用途,其中抗-SEMA4D抗体或其片段包含可变重链(VH)和可变轻链(VL),其中所述可变重链包含分别由SEQ ID NO: 6、7和8组成的VHCDR1-3,并且所述可变轻链包含分别由SEQ ID NO: 14、15和16组成的VLCDR1-3;和

其中所述药物相对于单独抗-SEMA4D抗体或其片段或单独抗-HER2/Neu抗体提供增强的治疗功效。

6. 如权利要求5所述的用途,其中所述抗-SEMA4D抗体或其片段和所述抗-HER2/Neu抗体配制为分开放药。

7. 如权利要求5所述的用途,其中所述抗-SEMA4D抗体或其片段和所述抗-HER2/Neu抗体配制为同时给药。

8. 如权利要求1-7中任一项所述的用途,其中与其他实体瘤患者相比,所述结肠癌患者或乳腺癌患者具有升高水平的循环中B细胞、T细胞、或者B细胞和T细胞。

9. 如权利要求8所述的用途,其中所述结肠癌患者或乳腺癌患者的每微升血液中B细胞和/或T细胞水平是其他实体瘤患者循环中B细胞和/或T细胞平均数量的1.5至5倍。

10. 如权利要求8所述的用途,其中所述结肠癌患者或乳腺癌患者具有落在健康个体的B细胞和/或T细胞范围内或范围以上的B细胞和/或T细胞水平。

11. 如权利要求1-7中任一项所述的用途,其中所述抗-SEMA4D抗体或其片段抑制SEMA4D与其受体的相互作用。

12. 如权利要求11所述的用途,其中所述受体是从蛋白-B1。

13. 如权利要求12所述的用途,其中所述抗-SEMA4D抗体或其片段抑制SEMA4D-介导的从蛋白-B1信号转导。

14. 如权利要求5所述的用途,其中VH和VL分别包含SEQ ID NO: 9和SEQ ID NO: 17或SEQ ID NO: 10和SEQ ID NO: 18。

15. 如权利要求5所述的用途,其中所述乳腺癌表达Her2和丛蛋白B1或丛蛋白B2。

## 脑信号蛋白-4D抑制分子与免疫调节治疗联用以抑制肿瘤生长和转移的应用

[0001] 对提交的序列表的引用

[0002] 用本申请提交的电子提交文本文件序列表(名称:58008\_133124\_SEQ\_LST.txt;大小:37,171字节;和创建日期:2014年6月20日)的内容通过引用全文纳入本文。

[0003] 背景

[0004] 脑信号蛋白4D(SEMA4D),也称作CD100,是一种属于脑信号蛋白基因家族的跨膜蛋白(例如,SEQ ID NO:1(人);SEQ ID NO:2(鼠))。SEMA4D在细胞表面上表达为同二聚体,但在细胞激活之后,SEMA4D可通过蛋白水解切割从细胞表面上释放以生成该蛋白质的溶解形式sSEMA4D,这也是有生物活性的。参见Suzuki等,Nature Rev. Immunol. 3:159-167 (2003);Kikutani等,Nature Immunol. 9:17-23 (2008)。

[0005] SEMA4D在包括脾脏、胸腺和淋巴结的淋巴器官中以及如脑、心脏和肾脏的非淋巴器官中以高水平表达。在淋巴器官中,SEMA4D在静息T细胞上大量表达,但是仅在静息B细胞和抗原呈递细胞(APC)如树突细胞(DC)上弱表达。然而,在用各种免疫刺激激活之后,其表达在这些细胞中上调。细胞激活也增加了可溶性SEMA4D从免疫细胞的释放。SEMA4D已与某些癌症的发展密切关联(Ch'ng等,Cancer 110:164-72 (2007);Campos等,Oncology Letters,5:1527-35 (2013);Kato等,Cancer Sci. 102:2029-37 (2011))并且几篇报道表明这种影响的一个机制是SEMA4D在促进肿瘤血管生成中的作用(Conrotto等,Blood 105:4321-4329 (2005). Basile等,J Biol. Chem. 282:34888-34895 (2007);Sierra等,J. Exp. Med. 205:1673 (2008);Zhou等,Angiogenesis 15:391-407 (2012))。肿瘤生长和转移包括肿瘤细胞、肿瘤间质和免疫浸润,以及内皮细胞和导管之间的相互作用。SEMA4D在多种肿瘤类型中过表达并且也通过募集到肿瘤微环境的炎性细胞产生,SEMA4D在构成肿瘤间质的不同细胞类型的不同作用的问题仍有待解决。

### 发明内容

[0006] 本发明解决了对用作抑制、降低、压制、防止、减缓或延迟肿瘤细胞的发展,使肿瘤细胞收缩或直接攻击肿瘤细胞的单一制剂或与其他免疫调节治疗联合发挥作用以增强它们的治疗益处的安全和有效癌症治疗的需要。具体地,SEMA4D显示在促进或抑制肿瘤生长的免疫细胞和巨噬细胞的浸润、成熟和组织中起到作用,这可有助于开发用于降低患有癌症的对象中肿瘤生长和转移的有效方法。

[0007] 该申请的某些方面涉及一种在患有癌症的对象中抑制、延缓或降低肿瘤生长或转移或肿瘤生长和转移的方法,该方法包括向该对象给予有效量的分离的结合分子和有效量的至少一种其他免疫调节治疗,该结合分子特异性结合脑信号蛋白-4D(SEMA4D)。

[0008] 在一些实施方式中,结合分子抑制SEMA4D与其受体(例如,从蛋白-B1)的相互作用。在一些实施方式中,结合分子抑制SEMA4D-介导的从蛋白-B1信号转导。在一些实施方式中,转移的抑制、延缓或减少独立于原发肿瘤生长抑制、延缓或减少而发生。在一些实施方式中,癌症选自癌、淋巴瘤、胚细胞瘤、肉瘤、白血病、鳞状细胞癌、小细胞肺癌、非小细胞肺

癌、肺腺癌、肺鳞状细胞癌、腹膜癌、肝细胞癌、胃肠癌、胃癌、胰腺癌、神经内分泌癌、胶质母细胞瘤、宫颈癌、卵巢癌、肝癌、膀胱癌、脑癌、肝细胞瘤、乳腺癌、结肠癌、结直肠癌、子宫内膜癌或子宫癌、食道癌、唾液腺癌、肾癌、肝癌、前列腺癌、外阴癌、甲状腺癌、头颈癌及其组合。在一些实施方式中,当与其他癌症对象相比时,对象具有升高水平的B细胞、T细胞或者B细胞和T细胞。

**[0009]** 在一些实施方式中,分离的结合分子与选自VX15/2503和67的参照单克隆抗体特异性结合相同的SEMA4D表位。在一些实施方式中,分离的结合分子包括抗体或其抗原结合片段。在一些实施方式中,抗体或其抗原结合片段包括单克隆抗体VX15/2503或67的6个互补决定区(CDR)。

**[0010]** 在一些实施方式中,免疫调节治疗选自癌症疫苗、免疫刺激剂、过继性T细胞或抗体治疗、免疫检查点阻滞及其组合。在一些实施方式中,免疫调节剂选自下组:白介素、细胞因子、趋化因子、免疫检查点阻滞的拮抗剂及其组合。在一些实施方式中,免疫调节治疗可以是癌症治疗。在一些实施方式中,癌症治疗选自手术或手术过程、放疗、化疗或其组合。在一些实施方式中,分离的结合分子和免疫调节剂或免疫调节治疗分开或同时给予。

**[0011]** 在一些实施方式中,提供了抑制、延迟或减少患有癌症的对象中肿瘤生长的方法,该方法包括给予该对象有效量的特异性结合脑信号蛋白-4D(SEMA4D)的分离的结合分子和有效量的至少一种其他免疫调节治疗。在一些实施方式中,结合分子抑制SEMA4D与其受体的相互作用。在一些实施方式中,受体是丛蛋白-B1。在一些实施方式中,结合分子抑制SEMA4D-介导的丛蛋白-B1信号转导。在一些实施方式中,癌症选自癌、淋巴瘤、胚细胞瘤、肉瘤、白血病、鳞状细胞癌、小细胞肺癌、非小细胞肺癌、肺腺癌、肺鳞状细胞癌、腹膜癌、肝细胞癌、胃肠癌、胃癌、胰腺癌、神经内分泌癌、胶质母细胞瘤、宫颈癌、卵巢癌、肝癌、膀胱癌、脑癌、肝细胞瘤、乳腺癌、结肠癌、结直肠癌、子宫内膜癌或子宫癌、食道癌、唾液腺癌、肾癌、肝癌、前列腺癌、外阴癌、甲状腺癌、头颈癌及其组合。在一些实施方式中,分离的结合分子与参照单克隆抗体VX15/2503或67特异性结合相同的SEMA4D表位。在一些实施方式中,分离的结合分子竞争性抑制参照单克隆抗体VX15/2503或67特异性结合SEMA4D。在一些实施方式中,分离的结合分子包括抗体或其抗原结合片段。在一些实施方式中,抗体或其抗原结合片段具有含VHCDR 1-3的可变重链(VH)和含VLCDR 1-3的可变轻链(VL),VHCDR 1-3分别包含SEQ ID NO:6、7和8,VLCDR 1-3分别包含SEQ ID NO:14、15和16。在一些实施方式中,VH和VL分别包含SEQ ID NO:9和SEQ ID NO:17或SEQ ID NO:10和SEQ ID NO:18。在一些实施方式中,免疫调节治疗选自给予癌症疫苗、给予免疫刺激剂、过继性T细胞或抗体治疗、给予免疫检查点阻滞抑制剂、给予调节性T细胞(Treg)调节剂及其组合。在一些实施方式中,免疫调节治疗包括免疫检查点阻滞抑制剂。在一些实施方式中,其中免疫检查点阻滞抑制剂是抗-CTLA4抗体、抗-PD-1抗体或其组合。在一些实施方式中,免疫调节治疗包括给予癌症疫苗。在一些实施方式中,Treg调节剂是环磷酰胺。在一些实施方式中,分离的结合分子和免疫调节治疗分开或同时给予。在一些实施方式中,给予分离的结合分子和免疫调节治疗的组合导致相对于单独给予分离的结合分子或免疫调节治疗而言增强的治疗功效。在一些实施方式中,当与其他癌症对象相比时,对象具有升高水平的B细胞、T细胞或者B细胞和T细胞。在一些实施方式中,对象的每微升血液中B细胞和/或T细胞水平是其他癌症患者循环中B细胞和/或T细胞平均数量的约1.5、2、2.5、3、3.5、4、4.5或5倍。在一些实施方式中,例如,

比之其他癌症患者,对象的每微升血液的B细胞和/或T细胞水平范围分别是约147至约588和约1173至约3910。在一些实施方式中,对象的B细胞和/或T细胞水平落入或高于健康非癌症患者的B细胞和/或T细胞范围。在一些实施方式中,例如,比之健康非癌症患者,对象的每微升血液的B细胞和/或T细胞水平范围分别是约225至约275或更多和约1350至约1650或更多。

[0012] 在一些实施方式中,提供了用免疫疗法治疗患有癌症的对象的方法,该方法包括:(a)确定患有癌症的对象中B细胞和/或T细胞的数量;和(b)如果该对象的B细胞和/或T细胞的数量超过预定阈值水平,则向该对象给予有效量的特异性结合脑信号蛋白-4D(SEMA4D)的分离的结合分子和有效量的至少一种其他免疫调节治疗。在一些实施方式中,对象的每微升血液中B细胞和/或T细胞的预定阈值水平是其他癌症患者循环中B细胞和/或T细胞平均数量的约1.5、2、2.5、3、3.5、4、4.5或5倍。在一些实施方式中,例如,比之其他癌症患者,对象的每微升血液的B细胞和/或T细胞的预定阈值水平范围分别是约147至约588和约1173至约3910。在一些实施方式中,对象中每微升血液的B细胞和/或T细胞的预定阈值水平落入或高于健康非癌症患者的B细胞和/或T细胞的范围。在一些实施方式中,例如,比之健康非癌症患者,对象的每微升血液的B细胞和/或T细胞的预定阈值水平范围分别是约225至约275或更多和约1350至约1650或更多。

[0013] 在一些实施方式中,提供了用免疫疗法治疗患有癌症的对象的方法,该方法包括:向患有癌症的对象给予有效量的特异性结合脑信号蛋白-4D(SEMA4D)的分离的结合分子和有效量的至少一种其他免疫调节治疗的组合,其中给予组合产生相对于单独给予分离的结合分子或其他免疫调节治疗增强的治疗功效。在一些实施方式中,免疫调节治疗选自给予癌症疫苗、给予免疫刺激剂、过继性T细胞或抗体治疗、给予免疫检查点阻滞抑制剂、给予调节性T细胞(Treg)调节剂及其组合。在一些实施方式中,免疫调节治疗包括免疫检查点阻滞抑制剂。在一些实施方式中,免疫检查点阻滞抑制剂是抗-CTLA4抗体、抗-PD-1抗体或其组合。在一些实施方式中,免疫调节治疗包括给予癌症疫苗。在一些实施方式中,Treg调节剂是环磷酰胺。在一些实施方式中,分离的结合分子和免疫调节治疗分开或同时给予。在一些实施方式中,当与其他癌症对象相比时,对象具有升高水平的B细胞、T细胞或者B细胞和T细胞。在一些实施方式中,对象的每微升血液中B细胞和/或T细胞水平是其他癌症患者循环中B细胞和/或T细胞平均数量的约1.5、2、2.5、3、3.5、4、4.5或5倍。在一些实施方式中,例如,比之其他癌症患者,对象的每微升血液的B细胞和/或T细胞水平范围分别是约147至约588和约1173至约3910。在一些实施方式中,对象的B细胞和/或T细胞的水平落入或高于健康非癌症患者的B细胞和/或T细胞的范围。在一些实施方式中,例如,比之健康非癌症患者,对象的每微升血液的B细胞和/或T细胞的水平范围分别是约225至约275或更多和约1350至约1650或更多。在一些实施方式中,癌症选自癌、淋巴瘤、胚细胞瘤、肉瘤、白血病、鳞状细胞癌、小细胞肺癌、非小细胞肺癌、肺腺癌、肺鳞状细胞癌、腹膜癌、肝细胞癌、胃肠癌、胃癌、胰腺癌、神经内分泌癌、胶质母细胞瘤、宫颈癌、卵巢癌、肝癌、膀胱癌、脑癌、肝细胞瘤、乳腺癌、结肠癌、结直肠癌、子宫内膜癌或子宫癌、食道癌、唾液腺癌、肾癌、肝癌、前列腺癌、外阴癌、甲状腺癌、头颈癌及其组合。在任意前述方法的一些实施方式中,分离的结合分子特异性结合与选自VX15/2503或67的参照单克隆抗体结合的相同SEMA4D表位。在任意前述方法的一些实施方式中,分离的结合分子竞争性抑制选自VX15/2503或67的参照单克隆抗体特

异性结合SEMA4D。在一些实施方式中,分离的结合分子包括抗体或其抗原结合片段。在一些实施方式中,抗体或其抗原结合片段包括单克隆抗体VX15/2503或67的6个互补决定区(CDR)。在一些实施方式中,抗体或其抗原结合片段是单克隆抗体VX15/2503或67。

[0014] 还提供了抑制、延缓或减少表达Her2和从蛋白B1、从蛋白B2或其组合的肿瘤细胞的生长的方法,包括将肿瘤细胞与有效量的特异性结合脑信号蛋白-4D(SEMA4D)的分离的结合分子接触,其中抑制、延迟或减少肿瘤细胞的生长。在一些实施方式中,接触包括向患有癌症的对象给予SEMA4D结合分子,其中对象的癌细胞表达Her2和从蛋白B1、从蛋白B2或其组合。在一些实施方式中,癌症是乳腺癌、卵巢癌、肺癌或前列腺癌。

[0015] 还提供了治疗患有癌症的对象的方法,该方法包括:(a)测试对象的癌细胞表达Her2和从蛋白B1、从蛋白B2或其组合;和(b)如果对象的癌细胞表达Her2和从蛋白B1、从蛋白B2或其组合,则给予对象有效量的特异性结合脑信号蛋白-4D(SEMA4D)的分离的分子。如权利要求48或权利要求49所述的方法,该方法还包括给予有效量的抗-HER2/neu结合分子。如权利要求48或权利要求49所述的方法,其中分离的结合分子与参照单克隆抗体VX15/2503或67特异性结合相同的SEMA4D表位。如权利要求48或权利要求49所述的方法,其中分离的结合分子抑制参照单克隆抗体VX15/2503或67特异性结合SEMA4D。如权利要求48或权利要求49所述的方法,所述分离的结合分子包括抗体或其抗原结合片段。如权利要求53所述的方法,抗体或其抗原结合片段具有含VHCDR 1-3的可变重链(VH)和含VLCDR 1-3的可变轻链(VL),VHCDR 1-3分别包含SEQ ID NO:6、7和8,VLCDR 1-3分别包含SEQ ID NO:14、15和16。如权利要求54所述的方法,其中VH和VL分别包含SEQ ID NO:9和SEQ ID NO:17或SEQ ID NO:10和SEQ ID NO:18。

[0016] 附图简述

[0017] 图1A-1B:在植入同系结肠26(Colon26)肿瘤细胞的小鼠中测量肿瘤体积。图1A显示在每周2次用1mg(50mg/kg)的抗-SEMA4D抗体(Ab)67或2B8同种型对照免疫球蛋白(2B8对照Ig)处理的Balb/c和SCID小鼠中测量结肠26肿瘤体积。图1B显示如下述实施例1定义的抗-SEMA4D Ab 67或2B8对照Ig处理的Balb/c和SCID小鼠的存活时间。

[0018] 图2:显示了植入肿瘤细胞并首先用抗-CD8消耗抗体(克隆2.43,BioXCell)或对照大鼠Ig(150mg/kg)处理然后如图1A所示用2B8对照Ig或抗-SEMA4D Ab 67处理的Balb/c小鼠的结肠26肿瘤体积的测量。

[0019] 图3A-3B:移植的小鼠的结肠26肿瘤的免疫细胞密度测量。图3A显示了在用对照Ig或抗-SEMA4D Ab 67处理之后用抗-CD8抗体染色的肿瘤面积%所确定的CD8+T细胞密度。图3B显示了在用对照Ig或抗-SEMA4D Ab 67处理之后用抗-CD20抗体染色的肿瘤面积%所确定的CD20+B细胞密度。

[0020] 图4A-4D:在结肠26移植小鼠的肿瘤前缘处巨噬细胞和CD8+T细胞分布的测量。图4A显示来自早27天移植并如图1所述用对照Ig或抗-SEMA4D Ab 67处理的小鼠的代表性结肠26肿瘤的图。图4B显示了由抗-F4/80抗体染色的像素面积%所确定的肿瘤前缘处M1型巨噬细胞密度的测量,前缘限定为距离肿瘤边缘300像素宽的区域(250微米)。图4C显示了由抗-CD206抗体染色的像素面积%所确定的肿瘤前缘处M2型巨噬细胞密度的测量。图4D显示了由细胞毒性T细胞抗-CD8抗体染色的像素面积%所确定的肿瘤前缘处CD8+T细胞密度的测量。

[0021] 图5A-5D:在植入同系结肠26肿瘤细胞的小鼠中的肿瘤体积测量。图5A显示用IgG1/2B8或抗-SEMA4D/MAb 67-2 (50mg/kg, 腹膜内, 每周一次), 用或不用抗-CTLA4/MAb UC10-4F10-11 (肿瘤接种后第8天, 100 $\mu$ g且第11天和第14天50 $\mu$ g) 以及用抗-PD1/RMP1-14 (第3天100 $\mu$ g, 每周两次) 与抗-CTLA4/MAb UC10-4F10-11结合处理的Balb/c小鼠中结肠26肿瘤体积测量。图5B显示用对照小鼠IgG1/2B8或抗-SEMA4D/MAb 67-2, 用或不用抗-CTLA4/MAb UC10-4F10-11, 以及用抗-PD1/RMP1-14 (第3天100 $\mu$ g, 每周两次) 结合-CTLA4/MAb UC10-4F10-11处理的Balb/c小鼠的存活时间。图5C显示用对照小鼠IgG1/2B8或抗-SEMA4D/MAb 67-2, 用或不用抗-CTLA4/MAb UC10-4F10-11, 以及用抗-PD1/RMP1-14 (第3天100 $\mu$ g, 每周两次) 结合-CTLA4/MAb UC10-4F10-11处理的Balb/c小鼠的肿瘤消退频率。图5D显示了与对照小鼠IgG1/2B8或单一治疗 (抗-SEMA4D/MAb 67-2或抗-CTLA4/MAb UC10-4F10-11) 相比, 用抗-SEMA4D/MAb 67-2和抗-CTLA4/MAb UC10-4F10-11的组合处理的小鼠的肿瘤浸润淋巴细胞中促炎细胞因子IFN  $\gamma$  的测量。图5E显示了与对照小鼠IgG1/2B8或单一治疗 (抗-SEMA4D/MAb 67-2或抗-CTLA4/MAb UC10-4F10-11) 相比, 用抗-SEMA4D/MAb 67-2和抗-CTLA4/MAb UC10-4F10-11的组合处理的小鼠的脾中回收的肿瘤浸润淋巴细胞之间肽特异性IFN  $\gamma$  分泌响应频率。

[0022] 图6A-6E:抗-SEMA4D抗体影响肿瘤特异性细胞毒性CD8+T细胞的肿瘤浸润的测量。图6A显示在存在或缺失肽的情况下MAb 67-2处理的小鼠的IFN  $\gamma$  分泌细胞的测量。图6B显示代表性ELISPOT图像。图6C显示肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)中抗肿瘤细胞因子,如IFN  $\gamma$  和TNF $\alpha$ 的测量。图6D显示用抗-SEMA4D/MAb 67抗体处理的小鼠的TIL中促炎细胞因子IFN  $\gamma$  和TNF $\alpha$ 的测量。图6E显示在用抗-SEMA4D/MAb 67抗体处理的小鼠的肿瘤浸润淋巴细胞中肽特异性IFN  $\gamma$  分泌响应的频率。

[0023] 图7A-7D:在植入同系结肠26肿瘤细胞的小鼠中的肿瘤体积测量。图7A显示用对照小鼠IgG1/2B8或抗-SEMA4D/MAb 67-2 (50mg/kg, 腹膜内, 每周一次) 和对照大鼠Ig或大鼠抗-PD1/MAbRMP1-14 (100 $\mu$ g, 每周2次, 从接种肿瘤后3天开始持续2周) 处理的Balb/c小鼠的结肠26肿瘤体积测量。图7B显示用对照小鼠IgG1/2B8或抗-SEMA4D/MAb 67-2和对照大鼠Ig或大鼠抗-PD1/MAbRMP1-14一起处理的Balb/c小鼠的存活时间。图7C和7D显示用对照小鼠IgG1/2B8或抗-SEMA4D/MAb 67-2和对照大鼠Ig或大鼠抗-PD1/MAbRMP1-14一起处理的Balb/c小鼠的肿瘤消退频率。

[0024] 图8A-8E:在植入同系结肠26肿瘤细胞的小鼠中的肿瘤体积测量。图8A显示用对照小鼠IgG1/2B8或抗-SEMA4D/MAb 67-2 (50mg/kg, 腹膜内, 每周一次), 用或不用环磷酰胺(CY) (50mg/kg, 腹膜内) 处理的Balb/c小鼠中结肠26肿瘤体积的平均测量。图8B显示用对照小鼠IgG1/2B8或抗-SEMA4D/MAb 67-2 (50mg/kg, 腹膜内, 每周一次), 用或不用环磷酰胺(CY) (50mg/kg, 腹膜内) 处理的Balb/c小鼠中结肠26肿瘤体积的中值测量。图8C显示用对照小鼠IgG1/2B8或抗-SEMA4D/MAb 67-2, 用或不用环磷酰胺处理的Balb/c小鼠的存活时间。图8D和8E显示用对照小鼠IgG1/2B8或抗-SEMA4D/MAb 67-2, 用或不用环磷酰胺(CY) 处理的Balb/c小鼠的肿瘤消退频率。

[0025] 图9A-9C:在植入Tubo.A5肿瘤细胞的小鼠中的肿瘤体积测量。图9A显示用对照小鼠IgG1/2B8或抗-SEMA4D/MAb 67-2 (50mg/kg, 腹膜内, 每周一次), 用或不用抗-Neu/MAb7.16.4 ( $\alpha$ Neu) (200 $\mu$ g腹膜内每周2次, 从肿瘤体积(TV)为约200mm<sup>3</sup>开始, 在第21天和第

28天)处理的Balb/c小鼠的肿瘤体积测量。图9B显示用对照小鼠IgG1/2B8或抗-SEMA4D/MAb 67-2,用或不用抗-Neu/MAb7.16.4(αNeu)处理的Balb/c小鼠的存活时间。图9C显示用对照小鼠IgG1/2B8或抗-SEMA4D/MAb 67-2,用或不用抗-Neu/MAb7.16.4(αNeu)处理的Balb/c小鼠的肿瘤消退频率。

[0026] 图10A-10E:在植入Tubo.A5肿瘤细胞的Balb/c小鼠中的肿瘤体积测量。图10A显示用对照小鼠IgG1/2B8或抗-SEMA4D/MAb 67-2(50mg/kg,腹膜内,每周一次)处理的Balb/c小鼠中的肿瘤体积测量。图10B显示用对照小鼠IgG1/2B8或抗-SEMA4D/MAb 67-2处理的Balb/c小鼠的存活时间。图10C-10E显示Tubo.A5肿瘤模型中肿瘤消退频率。具体地,图10C显示用移植Tubo.A5肿瘤的对照小鼠。图10D显示在用抗-SEMA4D/MAb 67-2处理之后已经排除Tubo.A5肿瘤移植物并且在原始移植后第90天用Tubo.A5肿瘤重新攻击的小鼠。图10E显示用与图10D相同的肿瘤移植物攻击的原初小鼠以证明肿瘤体内活力。

[0027] 图11A-11B:Tubo.A5肿瘤模型中T细胞浸润和MDSC的测量。图11A显示用对照小鼠IgG1/2B8或抗-SEMA4D/MAb 67-2(50mg/kg,腹膜内,每周一次)处理的Balb/c小鼠的肿瘤中CD3+T细胞测量。图11B显示用对照小鼠IgG1/2B8或抗-SEMA4D/MAb 67-2(50mg/kg,腹膜内,每周一次)处理的Balb/c小鼠的肿瘤中CD11b+Gr1+MDSC测量。

[0028] 图12A-12D:在植入结肠26或Tubo.A5肿瘤细胞的小鼠中的肿瘤体积测量。图12A显示用对照小鼠IgG1/2B8.1E7(50mg/kg,腹膜内,每周6次)或变化水平的抗-SEMA4D/MAb 67-2(1、10或50mg/kg,腹膜内,每周6次)处理的Balb/c小鼠中Tubo.A5肿瘤体积测量。图12B显示用对照小鼠IgG1/2B8.1E7(50mg/kg,腹膜内,每周6次)或变化水平的抗-SEMA4D/MAb 67-2(1、10或50mg/kg,腹膜内,每周6次)处理的Balb/c小鼠的存活时间。图12C显示用对照小鼠IgG1/2B8.1E7(50mg/kg,腹膜内,每周5次)、抗-SEMA4D/MAb 67-2(50mg/kg,腹膜内,每周5次)、抗-CTLA4/MAb UC10-4F10-11(5mg/kg,腹膜内,每周5次)、或抗-CTLA4/MAb UC10-4F10-11(5mg/kg,腹膜内,每周5次)和变化水平的抗-SEMA4D/MAb 67-2(0.3、3、10或50mg/kg,腹膜内,每周5次)的组合处理的Balb/c小鼠的结肠26肿瘤细胞测量。图12D显示用对照小鼠IgG1/2B8.1E7(50mg/kg,腹膜内,每周5次)、抗-SEMA4D/MAb 67-2(50mg/kg,腹膜内,每周5次)、抗-CTLA4/MAb UC10-4F10-11(5mg/kg,腹膜内,每周5次)、或抗-CTLA4/MAb UC10-4F10-11(5mg/kg,腹膜内,每周5次)和变化水平的抗-SEMA4D/MAb 67-2(0.3、3、10或50mg/kg,腹膜内,每周5次)的组合处理的Balb/c小鼠的存活时间。

[0029] 图13:上述附图中进行的实验的总结,显示在结肠26和Tubo.A5肿瘤模型中进行肿瘤重新攻击之后的肿瘤消退和生长。

[0030] 发明详述

[0031] I. 定义

[0032] 应注意,术语“一个”或“一种”物质指一种或多种该物质;例如,“一种多核苷酸”应理解为代表一种或多种多核苷酸。因此,术语“一个”(或“一种”)、“一种或多种”和“至少一种”在本文中可以互换使用。

[0033] 此外,本文使用“和/或”时应视作具体公开了两种特征或组分的每一种,有或没有另一种。因此,本文短语“A和/或B”中使用的术语“和/或”往往包括“A和B”、“A或B”、“A”(单独)、和“B”(单独)。同样,短语如“A、B、和/或C”中使用的术语“和/或”往往包括各种以下实施方式:A、B、和C;A、B、或C;A或C;A或B;B或C;A和C;A和B;B和C;A(单独);B(单独);和C(单

独)。

[0034] 除非另有定义,本文使用的所有科技术语与本发明所属领域普通技术人员所理解的通常含义相同。例如,Concise Dictionary of Biomedicine and Molecular Biology (《生物医药和分子生物学简明词典》),Juo,Pei-Show,第2版,2002,CRC出版社(CRC Press);The Dictionary of Cell and Molecular Biology (《细胞和分子生物学词典》),第3版,1999,学术出版社(Academic Press);和Oxford Dictionary Of Biochemistry And Molecular Biology (《牛津生物化学和分子生物学辞典》),修订,2000,牛津大学出版社(Oxford University Press),向技术人员提供了本发明使用的很多术语的常用词典。

[0035] 单位、前缀和符号以它们的国际单位制(SI)接受的形式表示。数值范围包括限定该范围的数值。除非另外说明,氨基酸以氨基到羧基的取向从左到右书写。本文提供的标题不是本发明的各种方面或实施方式的限制,可以参考说明书整体理解本发明的各种方面或实施方式。因此,下面紧接着定义的术语完全参考说明书全文定义。

[0036] 在任何用语言“包括”描述的实施方式中,也提供了“由……组成”和/或“基本由……组成”的其他类似实施方式。

[0037] 本文中氨基酸由IUPAC-IUB生物化学命名委员会推荐的公知三字母符号或单字母符号表示。同样,核苷酸按其普遍接受的单字母代码指称。

[0038] 本文所用术语“癌症”和“癌”是指或描述哺乳动物中的生理病症,其中细胞群的特征在于不受调控的细胞生长。癌症的示例包括,但不限于癌、淋巴瘤、胚细胞瘤、肉瘤和白血病。这类癌症的更具体示例包括鳞状细胞癌、小细胞肺癌、非小细胞肺癌、肺腺癌、肺鳞状细胞癌、腹膜癌、肝细胞癌、胃肠癌、胃癌、胰腺癌、胶质细胞瘤、宫颈癌、卵巢癌、肝癌、膀胱癌、脑癌、肝细胞瘤、乳腺癌、结肠癌、结直肠癌、子宫内膜癌或子宫癌、食道癌、唾液腺癌、肾癌、肝癌、前列腺癌、外阴癌、甲状腺癌、肝癌、和各种类型的头颈癌。

[0039] 在某些实施方式中,适于通过本文提供的方法治疗的转移性癌症包括但不限于转移性肉瘤、乳腺癌、卵巢癌、头颈癌和胰腺癌。在某些实施方式中,适于通过本文提供的方法治疗的转移性癌症或肿瘤细胞表达SEMA4D的从蛋白-B1和/或从蛋白-B2受体。

[0040] “血管生成”是指由血管重塑的主要决定簇刺激的内皮细胞动态修饰其细胞间和细胞与基质间接触并定向移动以重新组织成成熟血管树期间的复杂多步骤形态发生事件(Bussolino等,Trends Biochem Sci.22:251-256(1997);Risau,Nature 386:671-674(1997);Jain,Nat.Med.9:685-693(2003))。新血管的形成是胚胎发育期间的关键步骤,但是其也发生在成人中的生理和病理病症中,如视网膜病、类风湿性关节炎、缺血,并且尤其是在肿瘤生长和转移中(Carmeliet,Nat.Med.9:653-660(2003))。

[0041] 本文所用术语“临床实验室”是指检验或处理来自活对象,例如人的材料的设施。处理的非限制性示例包括生物学、生物化学、血清学、化学、免疫血液学、血液学、生理学、细胞学、病理学、遗传学,或其他对来自人体的材料的检验,用于提供例如诊断、预防、或治疗活对象例如人的任何疾病或损伤,或评价或对象例如人的健康的目的。这些检验可包括收集或获取样品、制备、确定、测量或描述活对象例如人体内或获自活对象例如人体的样品中各种物质存在与否的过程。

[0042] 术语“增殖性疾病”和“增殖性病症”是指与异常细胞增殖相关的疾病,如癌症。

[0043] 本文所用的“肿瘤”和“瘤”是指由良性(非癌性)或恶性(癌性)的过度细胞生长或

增殖产生的任意组织块,包括癌前损伤。在某些实施方式中,本文所述的肿瘤表达从蛋白-B1和/或从蛋白-B2,并且可表达SEMA4D和激活的Met。

[0044] 本文所用术语“医疗福利提供者”包括整体或部分提供、赠予、供应、支付,或者与给予患者一种或多种医疗福利、福利计划、健康保险和/或医疗费用账户计划的渠道的个体部门、组织或集团。

[0045] 术语“免疫调节治疗”或“免疫疗法”是指通过诱导和/或强化对象中的免疫应答在该对象中影响疾病或病症的治疗。免疫调节治疗包括癌症疫苗、免疫刺激剂、过继T细胞或抗体治疗和免疫检查点阻滞(Lizée等,2013.Harnessing the Power of the Immune System to Target Cancer(控制免疫系统的能量靶向癌症).Annu.Rev.Med.卷64第71-90期)。

[0046] 术语“免疫调节剂”是指免疫疗法的活性试剂。免疫调节剂包括重组、合成和天然制备物的不同阵列。免疫调节剂的示例包括但不限于白介素如IL-2、IL-7、IL-12;细胞因子如粒细胞集落刺激因子(G-CSF)、干扰素;各种趋化因子如CXCL13、CCL26、CXCL7;免疫检查点阻滞的拮抗剂,如抗-CTLA-4、抗-PD1或抗-PD-L1(PD-1的配体)、抗-LAG3、抗-B7-H3、合成胞嘧啶磷酸酯-鸟嘌呤(CpG)寡脱氧核苷酸、葡聚糖;和调节T细胞(Treg)的调节剂如环磷酰胺。

[0047] 本文所用术语“转移”、“转移癌”“转移性”或其他语法同义词是指从最初未知(例如,原发肿瘤)或身体的其他区域扩散或转移并在新位置处发展类似的癌损伤的癌细胞。“转移性”或“正转移”的细胞是丧失与相邻细胞的粘合接触并且通过血流或淋巴从疾病的原发部位迁移以侵入相邻的身体结构。该术语也指转移的过程,其包括但不限于癌细胞从原发肿瘤的癌细胞上脱落,癌细胞进入血管到循环中,它们存活并迁移到不同部位,从循环中粘附并外渗到新的部位,并且在不同的部位微定植,并且在不同的部位肿瘤生长和发展。

[0048] 术语“治疗有效量”是指对“治疗”对象或哺乳动物中的疾病或病症而言有效的抗体、多肽、多核苷酸、小有机分子或其他药物的量。在癌症的情况下,治疗有效量的药物可减少癌细胞的数量;阻滞或停止癌细胞分裂、降低或阻滞肿瘤尺寸增加;抑制,例如,压制、阻滞、防止、停止、延迟或逆转癌细胞浸润至周边器官,包括,例如,癌症扩散到软组织和骨;抑制,例如,压制、阻滞、防止、收缩、停止、延迟或逆转肿瘤转移;抑制,例如,压制、阻滞、防止、停止、延迟或逆转肿瘤生长;一定程度上缓解与癌症相关的一种或多种症状,降低发病率和死亡率;改善生活质量;或这些效果的组合。至于药物防止生长和/或杀死现有癌细胞,其可以称为细胞生长抑制和/或细胞毒性。

[0049] 术语,如“治疗”或“缓解”同时指1)治愈、减缓、减少诊断的病理病症或疾病的症状、逆转和/或终止诊断的病理病症或疾病的进展和2)预防和/或减缓靶向的病理病症或疾病的发展的预防性措施。因此,需要治疗的那些人包括已经患有疾病的那些人;易于患有疾病的那些人;和需要预防疾病的那些人。如果患者显示出以下状况的一种或多种,则按照本发明的方法成功“治疗”了该对象:癌细胞数量减少或癌细胞完全消失;肿瘤尺寸减小;或阻滞或逆转肿瘤生长,抑制,例如,压制、防止、阻滞、收缩、延迟或逆转转移,所述转移例如癌细胞浸润到周边器官中,包括例如,癌细胞扩散到软组织和骨中;肿瘤转移的抑制,例如,压制、阻滞、防止、收缩、逆转、延迟、或消失;肿瘤生长的抑制,例如,压制、阻滞、防止、收缩、逆转、延迟、或消失;缓解与特定肿瘤相关的一种或多种症状;降低发病率和死亡率;改善生活

质量;或效果的一些组合。有益或所需的临床结果包括但不限于可检测或不可检测的缓解症状、减轻疾病程度、疾病状态稳定(即不恶化)、延迟或减缓疾病进展、改善或减轻疾病状态和缓解(部分或完全)。“治疗”也可以指与不接受治疗的期望存活相比延长生存期。需要治疗的人包括已经患有病症或疾病的人,以及倾向于患有病症或疾病的人或需预防病症或疾病的人。

[0050] “对象”或“个体”或“动物”或“患者”或“哺乳动物”指需要诊断、预防或治疗的任何对象,特别是哺乳动物对象。哺乳动物对象包括人、家养动物、家畜和动物园动物、竞技动物或宠物,如犬、猫、豚鼠、兔、大鼠、小鼠、马、牛、奶牛、熊等。

[0051] 本文所用术语,如“将受益于以单一试剂或与至少一种其他免疫调节治疗组合给予的抗-SEMA4D抗体的对象”和“需要治疗的动物”包括对象,如哺乳动物对象,其将受益于以单一试剂或与至少一种其他免疫调节治疗组合给予的抗-SEMA4D抗体。

[0052] 广义来说,本发明的“结合分子”或“抗原结合分子”指特异性结合抗原决定簇的分子。在一个实施方式中,结合分子特异性结合SEMA4D,例如,约150kDa的跨膜SEMA4D多肽或约120kDa的可溶性SEMA4D多肽(通常称为sSEMA4D)。在另一个实施方式中,本发明的结合分子是抗体或其抗原结合片段。在另一个实施方式中,本发明的结合分子包括抗体分子的至少一个重链或轻链互补决定区(CDR)。在另一个实施方式中,本发明的结合分子包括来自一种或多种抗体分子的至少2个CDR。在另一个实施方式中,本发明的结合分子包括来自一种或多种抗体分子的至少3个CDR。在另一个实施方式中,本发明的结合分子包括来自一种或多种抗体分子的至少4个CDR。在另一个实施方式中,本发明的结合分子包括来自一种或多种抗体分子的至少5个CDR。在另一个实施方式中,本发明的结合分子包括来自一种或多种抗体分子的至少6个CDR。在另一个实施方式中,结合分子可以是SEMA4D的从蛋白-B1受体的拮抗剂。拮抗剂表示干扰受体的信号转导功能的结合分子。拮抗剂可竞争性封闭天然配体的结合,但无法触发正常生理响应。结合分子可以是本文所述的抗体或其抗原结合片段,或者可以是用作竞争性抑制剂或干扰天然配体的信号转导的其他生物制剂或小分子药物。本发明涉及用于抑制对象,例如癌症患者中肿瘤生长和转移的方法,包括以单一试剂或与至少一种其他免疫调节治疗组合给予该对象抗-SEMA4D结合分子,例如,抗体、或其抗原结合片段、变体或衍生物。除非特别提到完整大小的抗体如天然产生的抗体,术语“抗-SEMA4D抗体”包括完整大小的抗体以及这种抗体的抗原结合片段、变体、类似物或衍生物,例如天然产生的抗体或免疫球蛋白分子,或以类似于抗体分子的方式结合抗原的经工程改造抗体分子或片段。SEMA4D结合分子中还包括结合并抑制SEMA4D或其从蛋白-B1受体的活性的其他生物制剂或小分子。

[0053] 本文所用的“人”或“完整人”抗体包括具有人免疫球蛋白氨基酸序列的抗体并包括分离自人免疫球蛋白文库或一种或多种人免疫球蛋白转基因动物的抗体,如下文所述,例如,Kucherlapati等的美国专利号5,939,598。“人”或“完整人”抗体也包括至少含重链可变区或至少重链和轻链可变区的抗体,其中所述可变区具有人免疫球蛋白可变区的氨基酸序列。

[0054] “人”或“完整人”抗体还包括如上所述包含本文所述抗体分子(如VH区和/或VL区)的变体(包括衍生物)或基本由其组成或由其组成的“人”或“完整人”抗体,所述抗体或其片段免疫学特异性结合于SEMA4D多肽或其片段或变体。可利用本领域技术人员已知的标准技

术在编码人抗-SEMA4D抗体的核苷酸序列中引入突变,包括但不限于,引起氨基酸取代的定点诱变和PCR介导的诱变。在某些方面中,相对于参照VH区、VHCDR1、VHCDR2、VHCDR3、VL区、VLCDR1、VLCDR2或VLCDR3,该变体(包括衍生物)编码少于50个氨基酸取代、少于40个氨基酸取代、少于30个氨基酸取代、少于25个氨基酸取代、少于20个氨基酸取代、少于15个氨基酸取代、少于10个氨基酸取代、少于5个氨基酸取代、少于4个氨基酸取代、少于3个氨基酸取代或少于2个氨基酸取代。

[0055] 在某些实施方式中,氨基酸取代是保守性氨基酸取代,如下所详述。或者,也可沿所有或一部分编码序列随机引入突变,例如通过饱和诱变引入,可筛选所得突变体的生物学活性以鉴定保持活性(例如,结合SEMA4D多肽,如结合人SEMA4D、鼠SEMA4D或同时结合人和鼠SEMA4D的能力)的突变体。“人”或“完整人”抗体的这类变体(或其衍生物)也可称为“优化”或“就抗原结合优化”的人或完整人抗体,包括对抗原亲和性提高的抗体。

[0056] 术语“抗体”和“免疫球蛋白”在本文中可互换使用。抗体或免疫球蛋白至少包括重链可变区,通常至少包括重链和轻链的可变区。较好地理解了脊椎动物系统中的基本免疫球蛋白结构。参见例如,Harlow等(1988)Antibodies:A Laboratory Manual(《抗体:实验室手册》)(第2版;冷泉港实验室出版社(Cold Spring Harbor Laboratory Press))。

[0057] 本文所用术语“免疫球蛋白”包括可在生物化学上区分的各种类型多肽。本领域技术人员应理解,重链分为伽马、缪、阿尔法、德尔塔或伊普西龙( $\gamma, \mu, \alpha, \delta, \epsilon$ ),其中还有一些亚类(如 $\gamma 1 - \gamma 4$ )。该链的特性决定抗体“类别”分别为IgG、IgM、IgA、IgD或IgE。免疫球蛋白亚类(同种型)如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1等已被良好表征,且已知赋予功能特化。根据本文公开内容,本领域技术人员不难区分这些类别和同种型的修饰形式,因此,它们涵盖在本发明范围内。所有免疫球蛋白类别明显属于本发明范围,以下讨论通常针对免疫球蛋白分子的IgG类。在IgG中,标准的免疫球蛋白分子包括分子量约为23,000道尔顿的两条相同轻链多肽和分子量为53,000-70,000的两条相同重链多肽。这四条链通常在“Y”构型中由二硫键连接起来,其中轻链从Y的口部开始托起重链,并延续通过可变区。

[0058] 轻链分类为 $\kappa$ 或 $\lambda$ 。各重链类可与 $\kappa$ 或 $\lambda$ 轻链结合。通常,轻链和重链互相共价结合,并且当由杂交瘤、B细胞或遗传工程改造的宿主细胞生成免疫球蛋白时,两条重链的“尾”部分通过共价二硫键或非共价连接结合在一起。在重链中,氨基酸从Y构型的分叉末端处的N-端到各条链的底部处的C-端。

[0059] 轻链和重链都划分成结构和功能同源性的区域。从功能角度使用术语“恒定”和“可变”。在这方面,应理解轻链(VL或VK)和重链(VH)部分的可变区决定抗原识别和特异性。相反,轻链(CL)和重链(CH1、CH2或CH3)的恒定区产生重要的生物学特性,例如分泌、跨胎盘移动、Fc受体结合、补体结合等。按照习惯,恒定区结构域的编号随着远离抗原结合位点或抗体的氨基端而增加。N-端区是可变区并且C-端区是恒定区;CH3和CL结构域实际上分别包括重链和轻链的羧基端。

[0060] 如上所述,可变区允许抗体选择性识别并特异性结合抗原上的表位。也就是说,抗体的VL和VH结构域、或这些可变区内的互补决定区(CDR)亚组组合形成确定三维抗原结合位点的可变区。这种四联抗体结构形成在Y的每条臂末端存在的抗原结合位点。更具体地,所述抗原结合位点由各VH和VL链上的三个CDR确定。在一些情况下,例如在衍生自羊驼种类或根据羊驼免疫球蛋白工程改造的某些免疫球蛋白分子中,完整的免疫球蛋白分子可仅由

重链构成而不含轻链。参见例如,Hamers-Casterman等,Nature 363:446-448(1993)。

[0061] 在天然产生的抗体中,每个抗原结合结构域上出现的六个“互补决定区”或“CDR”是短的非毗连氨基酸序列,随着抗体在水性环境中确定其三维构型时,它们特别定位以形成抗原结合结构域。抗原结合结构域中的其余氨基酸称为“构架”区,显示较小的分子间差异。构架区主要采用 $\beta$ -片层构象,CDR形成连接 $\beta$ -片层结构和某些情况下形成部分 $\beta$ -片层结构的环。因此,构架区用于通过链间非共价相互作用形成为CDR提供正确方向位置的支架。定位的CDR形成的抗原结合结构域确定了与免疫反应性抗原上的表位互补的表面。这种互补表面促进了抗体与其互补表位的非共价结合。对于任何给定的重链或轻链可变区,本领域普通技术人员能容易地鉴定分别包含CDR和构架区的氨基酸,因为它们已被精确定义(见下文)。

[0062] 除非明确表述为相反的含义,否则在本领域内所使用和/或接受的某一术语有两种或多种定义的情况下,本文所用的术语定义应包括所有这些含义。具体示例是使用术语“互补决定区”(“CDR”)描述在重链和轻链多肽的可变区内发现的非毗连抗原结合位点。这一特定区域的描述可参见Kabat等(1983)美国健康和公共服务部(U.S.Dept.of Health and Human Services),“Sequences of Proteins of Immunological Interest(具有免疫学重要性的蛋白质序列)”以及Chothia和Lesk,J.Mol.Biol.196:901-917(1987)(上述文献通过引用全文纳入本文),互相对比时所述定义包括重叠的氨基酸残基或氨基酸残基亚组。尽管如此,应用任一定义指抗体或其变体的CDR均应落入本文所定义和使用的术语范围。合适氨基酸残基包括上文引用的各参考文献中定义的CDR,所述氨基酸残基列于下表1以作比较。包括特定CDR的准确残基编号根据CDR的序列和大小而变化。在抗体的可变区氨基酸序列给定的情况下,本领域技术人员可常规确定哪些残基包含具体CDR。

[0063] 表1.CDR定义<sup>1</sup>

	Kabat	Chothia
VH	31-35	26-32

[0065]	CDR1		
	VH	50-65	52-58
	CDR2		
	VH	95-102	95-102
	CDR3		
	VL	24-34	26-32
	CDR1		
	VL	50-56	50-52
	CDR2		
	VL	89-97	91-96
	CDR3		

[0066] <sup>1</sup>表1中所有CDR定义的编号均按照Kabat等所述的编号规则(见下文)。

[0067] Kabat等还定义了适用于任何抗体的可变区序列的编号系统。本领域普通技术人员能明确地将所述“Kabat编号”系统应用于任何可变区序列,而不依赖序列本身外的任何实验数据。本文所用的“Kabat编号”指Kabat等(1983)美国卫生与公众服务部,“Sequences of Proteins of Immunological Interest(免疫学上感兴趣的蛋白质序列)”中所述的编号系统。除非另有说明,提到本发明的抗-SEMA4D抗体或其抗原结合片段、变体或衍生物中具体氨基酸残基位置的编号时,均按照Kabat编号系统。

[0068] 本发明的抗体或抗原结合片段、变体、或其衍生物包括但不限于:多克隆、单克隆、多特异性、双特异性、人、人源化、灵长类化或嵌合抗体,单链抗体,表位结合片段如Fab、Fab'和F(ab')2、Fd、Fv、单链Fv(scFv)、二硫键连接的Fv(sdFv)、包含VL或VH结构域的片段、Fab表达文库产生的片段和抗独特型(抗-Id)抗体(包括例如,本文所述抗-SEMA4D抗体的抗-Id抗体)。ScFv分子为本领域已知,描述于例如美国专利号5,892,019。本发明的免疫球蛋白或抗体分子可以是任何类型(如IgG、IgE、IgM、IgD、IgA和IgY)、类(如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1和IgA2等)或小类的免疫球蛋白分子。

[0069] 本文所用的术语“重链部分”包括衍生自免疫球蛋白重链的氨基酸序列。在某些实施方式中,多肽包含包括以下至少一种的重链部分:VH结构域、CH1结构域、铰链(例如,上、中、和/或下铰链区)结构域、CH2结构域、CH3结构域或其变体或片段。例如,本发明所用的结合多肽可包括含有CH1结构域的多肽链;含有CH1结构域、至少一部分铰链区和CH2结构域的多肽链;含有CH1结构域和CH3结构域的多肽链;含有CH1结构域、至少一部分铰链区和CH3结构域的多肽链,或者含有CH1结构域、至少一部分铰链区、CH2结构域和CH3结构域的多肽链。在另一实施方式中,本发明的多肽包括含有CH3结构域的多肽链。另外,本发明所用的结合多肽可能缺少CH2结构域的至少一部分(例如,所有或部分CH2结构域)。如上所述,本领域普通技术人员应理解,可修饰这些结构域(例如重链部分),从而其氨基酸序列不同于天然产生的免疫球蛋白分子。

[0070] 在本文公开的某些抗-SEMA4D抗体,或其抗原结合片段、变体或衍生物中,多聚体的一条多肽链的重链部分与该多聚体的第二条多肽链相同。或者,本发明的含有重链部分的单体是不同的。例如,各单体可包含不同的靶结合位点,形成例如双特异性抗体。双特异性抗体是由两种不同的单克隆抗体的片段组成并且因此结合两种不同类型抗原的人工蛋白。在本发明的范围内考虑双特异性抗体形式的变化。例如,可使用本领域熟知的技术生成双特异性抗体,参见例如,Ghayur等,Expert Review of Clinical Pharmacology 3.4 (2010年7月):第491页;Lu等,J.Biological Chemistry第280卷,第20期,第19665-19672页(2005);Marvin等,Acta Pharmacologic Sinica 26 (6):649-658(2005);和Milstein C等,Nature 1983;305:537-40;30Brennan M等,Science 1985;229:81-3;Thakur等,Curr Opin Mol Ther.2010年6月;12(3):340-9;和美国专利公开号2007/0004909。

[0071] 用于本文所述方法的结合分子的重链部分可衍生自不同的免疫球蛋白分子。例如,多肽的重链部分可包含衍生自IgG1分子的CH1结构域和衍生自IgG3分子的铰链区。在另一个示例中,重链部分可包含部分衍生自IgG1分子、部分衍生自IgG3分子的铰链区。在另一个示例中,重链部分可包含部分衍生自IgG1分子、部分衍生自IgG4分子的嵌合铰链。

[0072] 本文所用的术语“轻链部分”包括衍生自免疫球蛋白轻链,如κ或λ轻链的氨基酸序列。在某些方面中,轻链部分包含VL或CL结构域中的至少一种。

[0073] 本文所述的抗-SEMA4D抗体,或其抗原结合片段、变体或衍生物可根据它们识别或特异性结合的抗原如本文所述靶标多肽(如SEMA4D)的表位或部分进行描述或说明。靶多肽与抗体的抗原结合结构域特异性相互作用的部分是“表位”或“抗原决定簇”。靶多肽可包含单个表位,但通常包含至少两个表位,并可包括任意数量的表位,这取决于抗原的大小、构象和类型。而且,应该注意到,靶标多肽上的“表位”可以是或可包括非多肽元件,例如表位可包括糖侧链。

[0074] 认为抗体的肽或多肽表位的最小尺寸是约4至5个氨基酸。肽或多肽表位可包含至少7个,至少9个,并且在一些情况中至少约15至约30个氨基酸。由于CDR能以三联形式识别抗原性肽或多肽,所以包含表位的氨基酸不必定是毗连的,在某些情况下甚至可不在同一肽链上。本发明的抗-SEMA4D抗体识别的肽或多肽表位可含有SEMA4D中至少4个、至少5个、至少6个、至少7个、至少8个、至少9个、至少10个、至少15个、至少20个、至少25个、或约15-约30个毗连或非毗连的氨基酸。

[0075] “特异性结合”通常指该抗体通过其抗原结合结构域结合于表位,并且该结合需要抗原结合结构域和表位之间某种程度的互补。按照这一定义,当抗体通过其抗原结合结构域与表位结合比与随机无关的表位结合更容易时,称该抗体“特异性结合”该表位。本文中使用术语“特异性”定性分析某一抗体与某一表位结合的相对亲和性。例如,抗体“A”可被认为比抗体“B”对给定表位具有更高特异性或亲和性,或者抗体“A”据说可以比对相关表位“D”的特异性或亲和性更高的特异性或亲和性结合表位“C”。

[0076] “优选结合”指与结合相关、相似、同源或类似的表位相比,该抗体更容易特异性结合某表位。因此,与相关表位相比,“优选结合”给定表位的抗体更可能结合该表位,即便这种抗体可能与相关表位发生交叉反应。

[0077] 作为非限制性示例,如果抗体与第一表位结合的解离常数( $K_D$ )低于抗体与第二表位的 $K_D$ ,则可认为抗体优选结合第一表位。在另一个非限制性示例中,如果抗体与第一表位

结合的亲和性比抗体与第二表位的 $K_D$ 低至少一个数量级,则可认为抗体优先结合第一抗原。在另一个非限制性示例中,如果抗体与第一表位结合的亲和性比抗体与第二表位的 $K_D$ 低至少2个数量级,则可认为抗体优先结合第一表位。

[0078] 在另一个非限制性示例中,如果抗体与第一表位结合的解离速率( $k(\text{off})$ )比抗体与第二表位的 $k(\text{off})$ 低,则可认为抗体优先结合第一表位。在另一个非限制性示例中,如果抗体与第一表位结合的亲和性比抗体与第二表位的 $k(\text{off})$ 低至少1个数量级,则可认为抗体优先结合第一表位。在另一个非限制性示例中,如果抗体与第一表位结合的亲和性比抗体与第二表位的 $k(\text{off})$ 低至少2个数量级,则可认为抗体优先结合第一表位。

[0079] 如果抗体优先结合给定表位以至于在某种程度上阻断参照抗体与该表位的结合,则称该抗体能竞争性抑制参照抗体与该表位的结合。可通过本领域已知的任意方法确定竞争性抑制,例如,竞争ELISA试验。可以说,抗体将参照抗体与给定表位的结合竞争性抑制至少90%、至少80%、至少70%、至少60%或至少50%。

[0080] 本文所用的术语“亲和性”指单独表位与免疫球蛋白分子的CDR结合的强度量度。参见例如,Harlow等(1988)Antibodies:A Laboratory Manual(《抗体:实验室手册》)(冷泉港实验室出版社(Cold Spring Harbor Laboratory Press),第2版),第27-28页。本文所用的术语“亲合力”指免疫球蛋白群体和抗原间复合物的总体稳定性,即免疫球蛋白混合物与抗原的功能性结合强度。参见,例如,Harlow,第29-34页。亲合力既与群体中单独免疫球蛋白分子与特定表位的亲和性相关,也与免疫球蛋白分子和抗原的价态相关。例如,二价单克隆抗体和具有高度重复表位结构的抗原例如多聚体之间的相互作用是具有高亲合力的一个例子。

[0081] 本发明的抗-SEMA4D抗体或其抗原结合片段、变体或其衍生物也可就其交叉反应性方面进行描述或说明。本文所用的术语“交叉反应性”指抗体对某一种抗原具有特异性、与第二种抗原发生反应的能力;它是两种不同抗原性物质之间关联性的量度。因此,如果抗体与诱导其形成的表位以外的其他表位结合,则具有交叉反应性。交叉反应性表位通常含有许多与诱导表位相同的互补结构特征,在某些情况下甚至比原始表位更匹配。

[0082] 例如,某些抗体具有一定程度的交叉反应性,因为它们结合相关但不相同的表位,例如,与参照表位至少95%、至少90%、至少85%、至少80%、至少75%、至少70%、至少65%、至少60%、至少55%和至少50%相同(按照本领域已知方法和本文所述方法计算)的表位。如果抗体不结合与参照表位少于95%、少于90%、少于85%、少于80%、少于75%、少于70%、少于65%、少于60%、少于55%和少于50%相同性(按照本领域已知方法和本文所述方法计算)的表位,则可以说该抗体的交叉反应性很低或没有交叉反应性。如果某抗体不结合某表位的任何其它类似物、直系同源物或同源物,则可认为该抗体对该表位“高度特异”。

[0083] 本发明的抗-SEMA4D结合分子如抗体或其抗原结合片段、变体或衍生物可根据与本发明多肽的结合亲和性进行描述或说明,所述多肽例如SEMA4D,如人、鼠或者人和鼠的SEMA4D。在某些方面中,结合亲和性包括解离常数或 $K_D$ 低于 $5 \times 10^{-2} \text{M}$ 、 $10^{-2} \text{M}$ 、 $5 \times 10^{-3} \text{M}$ 、 $10^{-3} \text{M}$ 、 $5 \times 10^{-4} \text{M}$ 、 $10^{-4} \text{M}$ 、 $5 \times 10^{-5} \text{M}$ 、 $10^{-5} \text{M}$ 、 $5 \times 10^{-6} \text{M}$ 、 $10^{-6} \text{M}$ 、 $5 \times 10^{-7} \text{M}$ 、 $10^{-7} \text{M}$ 、 $5 \times 10^{-8} \text{M}$ 、 $10^{-8} \text{M}$ 、 $5 \times 10^{-9} \text{M}$ 、 $10^{-9} \text{M}$ 、 $5 \times 10^{-10} \text{M}$ 、 $10^{-10} \text{M}$ 、 $5 \times 10^{-11} \text{M}$ 、 $10^{-11} \text{M}$ 、 $5 \times 10^{-12} \text{M}$ 、 $10^{-12} \text{M}$ 、 $5 \times 10^{-13} \text{M}$ 、 $10^{-13} \text{M}$ 、 $5 \times 10^{-14} \text{M}$ 、 $10^{-14} \text{M}$ 、 $5 \times 10^{-15} \text{M}$ 或 $10^{-15} \text{M}$ 的那些。在某些实施方式中,抗-SEMA4D结合分子,例如,本发明的抗体或其抗原结

合片段以约 $5 \times 10^{-9}$ 至约 $6 \times 10^{-9}$ 的Kd结合人SEMA4D。在另一个实施方式中,抗-SEMA4D结合分子,例如,本发明的抗体或其抗原结合片段以约 $1 \times 10^{-9}$ 至约 $2 \times 10^{-9}$ 的Kd结合鼠SEMA4D。

[0084] 本文所用的术语“嵌合抗体”指其中免疫反应性区域或位点获自或衍生自第一物种,而恒定区(可能是完整、一部分或修饰的)获自第二物种的任何抗体。在一些实施方式中,靶标结合区或位点将来自非人来源(例如,小鼠或灵长类)并且恒定区是人的。

[0085] 本文所用的术语“工程改造的抗体”指通过从具有已知特异性的抗体至少部分置换一个或多个CDR和必要时通过部分构架区置换和序列变化,来改变重链或轻链或二者中可变区的抗体。虽然CDR可衍生自与产生构架区的抗体属于同一类或甚至亚类的抗体,但设想CDR衍生自不同类别的抗体或不同物种的抗体。将来自具有已知特异性的非人抗体的一个或多个“供体”CDR移植到人重链或轻链构架区内形成的工程改造的抗体在本文中称为“人源化抗体”。在某些方面中,可能不必定用来自供体可变区的完整CDR代替所有CDR以将一种可变区的抗原结合能力转移至另一可变区。相反,仅可转移对于保持针对靶抗原的结合位点活性所必需的残基。

[0086] 进一步认识到,人源化抗体的重链或轻链或二者中可变结构域内的构架区可仅包含人来源的残基,在这种情况下人源化抗体的这些构架区称为“完整人构架区”(例如,MAb VX15/2503,在美国专利申请公开号US2010/0285036 A1中为MAb 2503,其全文通过引用纳入本文)。或者,如果需要维持与SEMA4D抗原的适当结合或提高结合,可以在人源化抗体的重链或轻链或二者可变区中人框架区的相应位置内工程改造供体可变区中框架区的一个或多个残基。因此,以此方式工程改造的人构架区包含人和供体构架区残基的混合物,在本文中称为“部分人构架区”。

[0087] 例如,抗-SEMA4D抗体的人源化过程可基本按照Winter和同事所述方法进行(Jones等,Nature 321:522-525(1986);Riechmann等,Nature 332:323-327(1988);Verhoeven等,Science 239:1534-1536(1988)),即用啮齿动物或突变型啮齿动物CDR或CDR序列取代人抗-SEMA4D抗体的相应序列。也参见美国专利号5,225,539;5,585,089;5,693,761;5,693,762;5,859,205;其通过引用纳入本文。所得的人源化抗-SEMA4D抗体将在人源化抗体的重链和/或轻链可变区的完整人框架区内包含至少一个啮齿动物或突变型啮齿动物CDR。在一些情况下,人源化抗-SEMA4D抗体的一个或多个可变区的构架区内残基被相应非人(例如,啮齿动物)残基代替(参见例如,美国专利号5,585,089;5,693,761;5,693,762;和6,180,370),在这种情况下所得的人源化抗-SEMA4D抗体将在重链和/或轻链的可变区内包含部分人框架区。类似的方法可用于抗-VEGF抗体的人源化。

[0088] 而且,人源化抗体可包含在受体抗体或供体抗体中未发现的残基。进行这些修饰以进一步改善抗体性能(例如,获得所需亲和性)。通常,人源化抗体将包含几乎所有的至少一个、通常两个可变区,其中全部或基本上全部的CDR对应于非人免疫球蛋白的CDR,全部或基本上全部的构架区是人免疫球蛋白序列的构架区。人源化抗体还任选包含至少一部分免疫球蛋白恒定区(Fc),一般是人免疫球蛋白的Fc。更多的细节参见Jones等,Nature,331:522-525(1986);Riechmann等,Nature,332:323-329(1988);和Presta,Curr.Op.Struct.Biol.,2:593-596(1992);其通过全文纳入本文。因此,所述“人源化”抗体可包括其中明显小于完整的人可变区被来自非人物种的相应序列所取代的抗体。在实践中,人源化抗体一般是一些CDR残基,可能是一些框架残基被啮齿动物抗体中相似位点的

残基所取代的人抗体。参见,例如,美国专利号5,225,539;5,585,089;5,693,761;5,693,762;5,859,205。也参见美国专利号6,180,370和国际公开号W0 01/27160,其中公开了人源化抗体和用于产生对预定抗原的亲和性提高的人源化抗体的技术。

[0089] II. 靶标多肽描述-SEMA4D

[0090] 本文所用术语“脑信号蛋白-4D”、“SEMA4D”和“SEMA4D多肽”可互换使用,如“SEMA4D”和“Sema4D”。在某些实施方式中,SEMA4D表达在细胞表面上或由细胞分泌。在另一个实施方式中,SEMA4D是膜结合的。在另一个实施方式中,SEMA4D是可溶的,例如sSEMA4D。在另一个实施方式中,SEMA4D可包括完整大小的SEMA4D或其片段,或SEMA4D变体多肽,其中SEMA4D或SEMA4D变体多肽的片段保留完整大小的SEMA4D的一些或全部功能性质。

[0091] 完整大小的人SEMA4D蛋白质是由2条150kDa的多肽链组成的同二聚体跨膜蛋白。SEMA4D属于脑信号蛋白家族细胞表面受体并且也称为CD100。人和小鼠SEMA4D/Sema4D从其跨膜形式经蛋白水解切割以形成120-kDa可溶性形式,产生2个Sema4D同种型(Kumanogoh等,J.Cell Science 116(7):3464(2003))。脑信号蛋白由可溶性和膜结合蛋白组成,其原始定义为轴突引导因子,其在建立神经元与其合适靶标的精确连接中起到重要作用。从结构上考虑,IV类脑信号蛋白,SEMA4D由氨基末端信号序列接着特征性“Sema”结构域组成,其含有17个保守的半胱氨酸残基、Ig-样结构域、富赖氨酸伸长段、疏水性跨膜结构域和胞质尾。

[0092] SEMA4D多肽包含约13个氨基酸的信号序列,之后是约512个氨基酸的脑信号蛋白结构域,约65个氨基酸的免疫球蛋白样(Ig-样)结构域,104个氨基酸的富赖氨酸伸长段,约19个氨基酸的疏水性跨膜区,和110个氨基酸的胞质尾。胞质尾中酪氨酸磷酸化的共有位点支持SEMA4D与酪氨酸激酶的预测结合(Schlossman等编,(1995) Leucocyte Typing V(牛津,牛经大学出版社(Oxford University Press, Oxford)))。

[0093] SEMA4D已知具有至少3个功能性受体,从蛋白-B1、从蛋白-B2和CD72。从蛋白-B1在非淋巴组织中表达并且已经显示为SEMA4D的高亲和性(1nM)受体(Tamagnone等,Ceil 99:71-80(1999))。从蛋白B1信号转导的SEMA4D刺激已经显示出诱导神经元的生长锥塌陷,并且诱导少突细胞的过程延伸塌陷(process extension collapse)和凋亡(Giraudon等,J. Immunol. 172:1246-1255(2004);Giraudon等,NeuroMolecular Med. 7:207-216(2005))。在与SEMA4D结合之后,从蛋白B1信号转导介导R-Ras的失活,导致整联蛋白介导的胞外基质粘附减少,以及RhoA的激活,导致通过重组细胞骨架的细胞塌陷。参见Kruger等,Nature Rev. Mol. Cell Biol. 6:789-800(2005);Pasterkamp,TRENDS in Cell Biology 15:61-64(2005)。从蛋白-B2对SEMA4D有中等亲和性,并且最近的报道表明PLXNB2在角质形成细胞上表达并且激活SEMA4D-阳性 $\gamma$ δT细胞以促进上皮修复(Witherden等,Immunity. 2012年8月24日;37(2):314-25)。

[0094] 在淋巴组织中,CD72用作低亲和性(300nM)SEMA4D受体(Kumanogoh等,Immunity 13:621-631(2000))。B细胞和抗原呈递细胞(APC)表达CD72,并且抗-CD72抗体具有许多与sSEMA4D相同的作用,如增强CD40-诱导的B细胞应答和CD23的B细胞脱落。CD72被认为通过招募酪蛋白磷酸酶SHP-1发挥B细胞应答的负调节物的作用,其可与许多抑制性受体联合。SEMA4D与CD72的相互作用导致SHP-1的解离,以及这种负激活信号的失去。SEMA4D已经显示促进T细胞刺激和B细胞聚集以及体外存活。加入SEMA4D-表达细胞或sSEMA4D在体外增强

CD40-诱导的B细胞增殖和免疫球蛋白产生,并且在体内加快抗体应答(Ishida等,Inter.Immunol.15:1027-1034(2003);Kumanogoh和H.Kukutani,Trends in Immunol.22:670-676(2001))。sSEMA4D增强CD40诱导的DC成熟,包括共刺激分子上调和增加的IL-12分泌。另外,sSEMA4D可抑制免疫细胞迁移,其可能加入阻断抗-SEMA4D小鼠抗体来逆转(Elhabazi等,J.Immunol.166:4341-4347(2001);Delaire等,J.Immunol.166:4348-4354(2001))。

[0095] Sema4D在包括脾脏、胸腺和淋巴结的淋巴器官中以及如脑、心脏和肾脏的非淋巴器官中以高水平表达。在淋巴器官中,Sema4D在静息T细胞上大量表达,但是仅在静息B细胞和抗原呈递细胞(APC)如树突细胞(DC)上弱表达。

[0096] 细胞激活增加了SEMA4D的表面表达以及可溶性SEMA4D(sSEMA4D)的生成。SEMA4D的表达特性表明其在免疫系统中起到重要的生理和病理作用。SEMA4D已经显示促进B细胞激活、聚集和存活;增强CD40-诱导的增殖和抗体产生;增强对T细胞以来抗原的抗体响应;增加T细胞增殖;增强树突细胞成熟和刺激T细胞的能力;和直接涉及脱髓鞘和轴突变性(Shi等,Immunity 13:633-642(2000);Kumanogoh等,J Immunol 169:1175-1181(2002);和Watanabe等,J Immunol 167:4321-4328(2001))。

[0097] SEMA4D敲除(SEMA4D-/-)小鼠已经提供其他证据显示SEMA4D在体液和细胞免疫应答中起到重要作用。在SEMA4D-/-小鼠中没有已知的非淋巴组织异常。来自SEMA4D-/-小鼠的树突细胞(DC)具有弱刺激能力并且在共刺激分子的表达中显示出缺陷,其可通过加入sSEMA4D来拯救。SEMA4D缺陷(SEMA4D-/-)的小鼠无法发生由髓鞘少突细胞糖蛋白肽诱导的实验性自身免疫脊髓炎,因为在缺少SEMA4D的情况下,髓鞘少突细胞糖蛋白特异性T细胞生成微弱(Kumanogoh等,J Immunol 169:1175-1181(2002))。也在自身免疫倾向型MRL/lpr小鼠(全身性自身免疫疾病如SLE的模型)而不是正常小鼠的血清中检测到显著量的可溶性SEMA4D。此外,sSEMA4D的水平与自身抗体的水平相关并且随着年龄增加(Wang等,Blood 97:3498-3504(2001))。可溶性SEMA4D也已经显示在患有脱髓鞘性疾病的患者的脑脊液和血清中累积,并且sSEMA4D诱导人多潜能神经前体(Dev细胞)的凋亡,并且在体外同时抑制过程扩展并诱导大鼠少突细胞的凋亡(Giraudon等,J Immunol 172 (2) :1246-1255(2004))。由抗-SEMA4D单克隆抗体(MAb)封闭这种凋亡。

[0098] III.抗-SEMA4D抗体

[0099] 已经在本领域中描述了结合SEMA4D的抗体。参见,例如,美国公开号2008/0219971 A1、US 2010/0285036 A1和US 2006/0233793 A1、国际专利申请WO 93/14125、WO 2008/100995和WO 2010/129917,以及Herold等,Int.Immunol.7(1):1-8(1995),其各自通过引用全文纳入本文。

[0100] 本发明一般涉及在对象,例如人癌症患者中抑制、延迟或降低肿瘤生长或转移的方法,包括给予特异性结合SEMA4D的抗体、或其抗原结合片段、变体或衍生物。在某些实施方式中,该抗体阻断SEMA4D与其受体例如从蛋白-B1和/或从蛋白-B2中的一种或多种的相互作用。在某些实施方式中,癌细胞表达从蛋白-B1和/或从蛋白-B2。具有这些性质的抗-SEMA4D抗体可用于本文提供的方法。可使用的抗体包括,但不限于MAbs VX15/2503,67,76,2282及其抗原结合片段、变体或衍生物,其全部描述于US 2010/0285036 A1和US 2008/0219971 A1。可用于本文提供的方法的其他抗体包括US 2006/0233793 A1中所述的BD16抗

体及其抗原结合片段、变体或衍生物;或MAb 301、MAb 1893、MAb 657、MAb 1807、MAb 1656、MAb 1808、MAb 59、MAb 2191、MAb 2274、MAb 2275、MAb 2276、MAb 2277、MAb 2278、MAb 2279、MAb 2280、MAb 2281、MAb 2282、MAb 2283、MAb 2284和MAb 2285中的任意种,及其任意片段、变体或衍生物,如US 2008/0219971 A1所述。在某些实施方式中,用于本文提供的方法的抗-SEMA4D抗体结合人、鼠或人和鼠SEMA4D。还可使用与任意前述抗体结合相同表位的抗体和/或竞争性抑制任意前述抗体的结合或活性的抗体。

[0101] 在某些实施方式中,可用于本文提供的方法的抗-SEMA4D抗体或其抗原结合片段、变体或衍生物具有与参照抗-SEMA4D抗体分子的氨基酸序列具有至少约80%、约85%、约88%、约89%、约90%、约91%、约92%、约93%、约94%或约95%序列相同性的氨基酸序列,例如,上述的那些。在另一个实施方式中,所述结合分子与参照抗体共有至少约96%、约97%、约98%、约99%或100%的序列相同性。

[0102] 在另一个实施方式中,可用于本发明提供的方法的抗-SEMA4D抗体或其抗原结合片段、变体或衍生物,包含免疫球蛋白重链可变区(VH结构域)、基本由其组成或由其组成,其中所述VH结构域的至少一个CDR具有与SEQ ID NO:9、10、25或48的CDR1、CDR2或CDR3至少约80%、约85%、约90%、约95%、约96%、约97%、约98%、约99%相同或完全相同的氨基酸序列。

[0103] 在另一个实施方式中,可用于本发明提供的方法的抗-SEMA4D抗体或其抗原结合片段、变体或衍生物,包含免疫球蛋白重链可变区(VH结构域)、基本由其组成或由其组成,其中所述VH结构域的至少一个CDR具有与SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:27或SEQ ID NO:28至少约80%、约85%、约90%、约95%、约96%、约97%、约98%、约99%相同或完全相同的氨基酸序列。

[0104] 在另一个实施方式中,可用于本发明提供的方法的抗-SEMA4D抗体或其抗原结合片段、变体或衍生物,包含免疫球蛋白重链可变区(VH结构域)、基本由其组成或由其组成,其中除了1、2、3、4或5个保守氨基酸取代以外,所述VH结构域的至少一个CDR具有与SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:27或SEQ ID NO:28完全相同的氨基酸序列。

[0105] 在另一个实施方式中,可用于本文提供的方法的抗-SEMA4D抗体或其抗原结合片段、变体或衍生物的包含VH结构域、基本由其组成或由其组成,该VH结构域具有与SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:25或SEQ ID NO:48至少约80%、约85%、约90%、约91%、约92%、约93%、约94%、约95%、约96%、约97%、约98%、约99%或100%相同的氨基酸序列,其中抗-SEMA4D抗体包含特异性或优先结合SEMA4D的编码VH结构域。

[0106] 在另一个实施方式中,可用于本发明提供的方法的抗-SEMA4D抗体或其抗原结合片段、变体或衍生物,包含免疫球蛋白轻链可变区(VL结构域)、基本由其组成或由其组成,其中所述VL结构域的至少一个CDR具有与SEQ ID NO:17、18、29或47的CDR1、CDR2或CDR3至少约80%、约85%、约90%、约95%、约96%、约97%、约98%、约99%相同或完全相同的氨基酸序列。

[0107] 在另一个实施方式中,可用于本发明提供的方法的抗-SEMA4D抗体或其抗原结合片段、变体或衍生物,包含免疫球蛋白轻链可变区(VL结构域)、基本由其组成或由其组成,其中所述VL结构域的至少一个CDR具有与SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、SEQ

ID NO:30、SEQ ID NO:31或SEQ ID NO:32至少约80%、约85%、约90%、约95%、约96%、约97%、约98%、约99%相同或完全相同的氨基酸序列。

[0108] 在另一个实施方式中,可用于本发明提供的方法的抗-SEMA4D抗体或其抗原结合片段、变体或衍生物,包含免疫球蛋白轻链可变区(VL结构域)、基本由其组成或由其组成,其中除了1、2、3、4或5个保守氨基酸取代以外,所述VL结构域的至少一个CDR具有与SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:30、SEQ ID NO:31或SEQ ID NO:32完全相同的氨基酸序列。

[0109] 在另一个实施方式中,可用于本文提供的方法的抗-SEMA4D抗体或其抗原结合片段、变体或衍生物的包含VL结构域、基本由其组成或由其组成,该VL结构域具有与SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:29或SEQ ID NO:47至少约80%、约85%、约90%、约91%、约92%、约93%、约94%、约95%、约96%、约97%、约98%、约99%或100%相同的氨基酸序列,其中抗-SEMA4D抗体包含特异性或优先结合SEMA4D的编码VL结构域。

[0110] 本文提供的方法中使用的还包括编码本文所述的抗-SEMA4D抗体,或其抗原结合片段、变体或衍生物的多肽,编码这类多肽的多核苷酸,包含这类多核苷酸的载体,和包含这类载体或多核苷酸的宿主细胞,全部用于产生用于本文所述方法的抗-SEMA4D抗体,或其抗原结合片段、变体或衍生物。

[0111] 本发明抗-SEMA4D抗体的合适生物活性变体可用于本发明的方法。这种变体将保持母体抗-SEMA4D抗体的所需结合性质。本领域中制备抗体变体的方法通常是可得的。

[0112] 诱变和改变核苷酸序列的方法为是本领域中熟知的。参见例如,Walker和Gaastra编(1983)Techniques in Molecular Biology(《分子生物学技术》)(纽约麦克米兰出版公司(MacMillan Publishing Company)) ;Kunkel,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 82:488-492(1985) ;Kunkel等,Methods Enzymol.154:367-382(1987) ;Sambrook等(1989)Molecular Cloning:A Laboratory Manual(《分子克隆:实验室手册》)(纽约州冷泉港(Cold Spring Harbor,N.Y.)) ;美国专利号4,873,192;以及其中引用的参考文献;其通过引用纳入本文。有关不影响感兴趣多肽生物学活性的合适氨基酸取代的指南可参见下述文献中的模型:Dayhoff等(1978),Atlas of Protein Sequence and Structure(《蛋白质序列和结构图册》)(华盛顿特区的国家生物医学研究基金会(Natl.Biomed.Res.Found.,Washington, D.C.)),第345-352页,通过引用全文纳入本文。Dayhoff等的模型利用单点可接受突变(Point Accepted Mutation,PAM)氨基酸相似矩阵(PAM 250矩阵)来确定合适的保守性氨基酸取代。在某些方面中,使用保守取代,如用一种氨基酸替换具有类似性质的另一种氨基酸。Dayhoff等模型的PAM 250矩阵中教导的保守性氨基酸取代的示例包括但不限于:Gly↔Ala、Val↔Ile↔Leu、Asp↔Glu、Lys↔Arg、Asn↔Gln和Phe↔Trp↔Tyr。

[0113] 构建所述抗-SEMA4D结合分子的变体如抗体或其抗原结合片段、感兴趣多肽时,生成修饰,从而变体持续拥有所需属性,如能特异性结合SEMA4D,如人、灵长动物、鼠、或者人和鼠的SEMA4D,例如在表面上表达或由细胞分泌,并具有SEMA4D阻断活性,如本文所述。在某些方面中,编码变体多肽的DNA中的突变保持阅读框并且并不产生可能产生二级mRNA结构的互补区。参见欧洲专利申请公开号75,444。

[0114] 测定抗-SEMA4D结合分子如抗体或其抗原结合片段、变体或衍生物的结合特性的方法包括但不限于:标准竞争结合实验、T细胞或B细胞的免疫球蛋白分泌的监测试验、T

CN 105492016 B

细胞增殖实验、凋亡实验、ELISA实验等。参见例如,WO 93/14125;Shi等,Immunity 13:633-642(2000);Kumanogoh等,J Immunol 169:1175-1181(2002);Watanabe等,J Immunol 167:4321-4328(2001);Wang等,Blood 97:3498-3504(2001);和Giraudon等,J Immunol 172(2):1246-1255(2004)公开的实验,其都通过引用纳入本文。

[0115] 用于测量抗-SEMA4D抗体或其抗原结合片段、变体或衍生物的抗-血管生成能力的方法是本领域所熟知的。

[0116] 本文在讨论本文公开的任何具体多肽(包括恒定区、CDR、VH结构域或VL结构域)是否与另一多肽至少约65%、约70%、约75%、约80%、约85%、约90%、约91%、约92%、约93%、约94%、约95%、约96%、约97%、约98%、约99%或者甚至约100%相同时,相同性%可采用本领域已知的方法和计算机程序/软件测定,例如但不限于BESTFIT程序(威斯康星序列分析软件包,用于Unix系统的第8版,遗传学计算机团队(Genetics Computer Group),威斯康星州麦迪逊科学大道575大学研究园(University Research Park),53711)。53711).BESTFIT利用Smith和Waterman(1981)Adv.Appl.Math.2:482-489的局部同源性算法,以找到两条序列之间的最佳同源性区段。使用BESTFIT或任何其它序列比对程序来确定某具体序列是否与本发明所述参照序列(例如95%相同时,当然要设定参数从而在参照多肽序列的全长上计算相同性百分数,并且在参照序列的氨基酸总数中允许多至5%的同源性缺口。

[0117] 出于本发明的目的,可采用史密斯-沃特曼(Smith-Waterman)同源性搜索算法测定序列相同性百分数,该算法使用仿射缺口搜索,其中缺口开放罚12分,缺口延伸罚2分,BLOSUM矩阵计62分。Smith和Waterman(1981)Adv.Appl.Math.2:482-489中公开了史密斯-沃特曼同源性搜索算法。变体与参照抗CXCL13抗体(如MAb VX15/2503、67、76或2282)可以差异例如,少至1-15个氨基酸残基,少至1-10个氨基酸残基,如6-10个,少至5个,少至4、3、2、或者甚至1个氨基酸残基。

[0118] 可以多种方式使抗-SEMA4D抗体的恒定区突变从而改变效应物功能。例如,参见美国专利号6,737,056B1和美国专利申请公开号2004/0132101A1,其公开了优化抗体与Fc受体结合的Fc突变。

[0119] 在可用于本文提供的方法的抗-SEMA4D抗体或其片段、变体或衍生物中,可使用本领域已知的技术突变Fc部分以降低效应物功能。例如,恒定区结构域的缺失或失活(通过点突变或其它方式)可降低循环的修饰抗体与Fc受体的结合,从而提高肿瘤定位。在其他情况下,与本发明一致的恒定区修饰调节互补结合并因此缩短血清半衰期。可利用恒定区的其它修饰来改变二硫键连接或寡糖部分,能因抗原特异性或抗体灵活性提高而加强定位。无需过多实验,即可容易地利用熟知的免疫学技术测定或定量分析修饰所产生的生理学概况、生物利用度和其它生化作用,如肿瘤定位、生物分布和血清半衰期。

[0120] 用于本文提供的方法的抗-SEMA4D抗体包括修饰的衍生物,例如通过将任何类型的分子共价连接到抗体上,从而该共价连接不会防止抗体特异性结合其关联表位。例如但不限于,抗体衍生物包括通过,例如糖基化、乙酰化、PEG化、磷酸化、酰胺化、由已知保护/阻断基团衍生、蛋白水解切割、连接于细胞配体或其它蛋白质等方法修饰的抗体。通过已知技术可进行任意多种化学修饰,包括但不限于:特异性化学切割、乙酰化、甲酰化等。此外,衍生物可包含一种或多种非经典氨基酸。

[0121] “保守性氨基酸取代”是氨基酸残基被具有带相似电荷的侧链的氨基酸残基取代。本领域已定义具有带相似电荷的侧链的氨基酸残基家族。这些家族包括：具有碱性侧链的氨基酸(如赖氨酸、精氨酸、组氨酸)、具有酸性侧链的氨基酸(如天冬氨酸、谷氨酸)、具有不带电极性侧链的氨基酸(如甘氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸、半胱氨酸)、具有非极性侧链的氨基酸(如丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸、色氨酸)、具有 $\beta$ -分支侧链的氨基酸(如苏氨酸、缬氨酸、异亮氨酸)和具有芳族侧链的氨基酸(如酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、组氨酸)。或者，突变可沿着编码序列的全部或部分随机导入，如通过饱和突变，并且可筛选所得的突变体的生物活性以坚定保持活性(例如，在对象，例如癌症患者中结合抗-SEMA4D多肽，以阻断SEMA4D与其受体的相互作用，或抑制、延迟或减少转移的能力)的突变体。

[0122] 例如，可能仅在抗体分子的构架区内或仅在CDR区内引入突变。导入的突变可以是沉默或天然错义突变，即对抗体结合抗原的能力没有或有很少的影响。可使用这些突变类型来优化密码子使用，或提高杂交瘤的抗体生成。或者，非天然错义突变可改变抗体结合抗原的能力。本领域技术人员将能够设计并测试具有所需性质的突变体分子，如没有抗原结合活性或结合活性的变化(例如，改善抗原结合活性或改变抗体特异性)。诱变之后，编码的蛋白质可经常规表达并且能使用本文所述的技术或者通过本领域已知的常规修饰技术来确定编码的蛋白质的功能和/或生物活性(例如，免疫特异性结合SEMA4D多肽的至少一个表位的能力)。

[0123] 在某些实施方式中，用于本文提供的方法的抗-SEMA4D抗体包含至少一个优化的互补决定区(CDR)。“优化的CDR”指该CDR已经修饰并且经优化以提高包含优化的CDR的抗-SEMA4D抗体的结合亲和性和/或抗-SEMA4D活性。“抗-SEMA4D活性”或“SEMA4D阻断活性”可包括调节下列一种或多种与SEMA4D相关的活性的活性：B细胞活性、聚集和存活；CD40-诱导的增殖和抗体产生；对T细胞依赖抗原的抗体应答；T细胞或其他免疫细胞增殖；树突细胞成熟；脱髓鞘和轴突变性；多潜能神经前体和/或少突细胞的凋亡；诱导内皮细胞迁移；抑制自发性单核细胞迁移；抑制、延迟或减少肿瘤细胞生长或转移，与细胞表面从蛋白B1或其他受体结合，或者与可溶性SEMA4D或SEMA4D+细胞表面上表达的SEMA4D相关的任意其他活性。在特定实施方式中，抗-SEMA4D活性包括抑制、延迟或减少肿瘤转移，与抑制、延迟或减少原发肿瘤细胞生长和肿瘤转移结合，或者独立于原发肿瘤细胞生长和肿瘤转移。抗-SEMA4D活性也可导致与SEMA4D表达相关的疾病的发病或严重性降低，包括但不限于某些类型的癌症包括淋巴瘤，自身免疫疾病，炎性疾病包括中枢神经系统(CNS)和外周神经系统(PNS)炎性疾病，移植排斥和侵入性血管生成。基于鼠抗-SEMA4D MAb BD16的优化的抗体的示例描述于美国专利公开号2008/0219971 A1、国际专利申请号W0 93/14125和Herold等，Int. Immunol. 1.7(1) :1-8(1995)，其各自通过引用全文纳入本文。修饰可包括取代CDR内的氨基酸残基，使得抗-SEMA4D抗体保留对SEMA4D抗原的特异性并且具有改善的结合亲和性和/或改善的抗-SEMA4D活性。

[0124] IV. 抗-SEMA4D抗体的结合特性

[0125] 在某些实施方式中，结合分子是特异性结合SEMA4D的抗体，或其抗原结合片段、变体或衍生物。在某些实施方式中，结合分子结合SEMA4D的表位。SEMA4D的一种变体的核苷酸和氨基酸序列分别示于SEQ ID NO:13和SEQ ID NO:14，并且SEMA4D的另一种变体的核苷酸

和氨基酸序列分别示于SEQ ID NO:15和SEQ ID NO:16。在一些实施方式中,提供了命名为VX15/2503的抗-SEMA4D抗体。本文也公开了具有抗体VX15/2503的结合特性的抗体。这类抗体包括但不限于在与VX15/2503的竞争结合试验中竞争的抗体,以及结合能够结合VX15/2503的表位(如下定义)的抗体。用于评价抗体是否具有相同或相似结合特性的方法包括传统定量方法,例如,确定和比较对于抗原性表位(例如,SEMA4D肽)的抗体亲和性或亲合力。用于比较抗体的结合特性的其他示例性方法包括竞争性western印迹、酶免疫试验、ELISA和流式细胞术。用于评价和比较抗体-抗原结合特性的方法是本领域所熟知的。还提供了保留特异性结合SEMA4D的能力的VX15/2503的变体和片段。抗体VX15/2503和67拥有相同的6个CDR并且结合相同的SEMA4D表位。

[0126] 在一些实施方式中,本文所述的抗-SEMA4D抗体,或其抗原结合片段、变体或衍生物可根据它们识别或特异性结合的抗原如本文所述靶标多肽(如SEMA4D)的表位或部分进行描述或说明。靶多肽与抗体的抗原结合结构域特异性相互作用的部分是“表位”或“抗原决定簇”。

[0127] 在一些实施方式中,“表位”往往是用于产生抗体和/或抗体将特异性结合的抗原性分子的部分。“SEMA4D表位”包括抗-SEMA4D抗体结合的SEMA4D蛋白的部分。表位可包含线性氨基酸残基(即,以线性方式一个接着一个连续排列的表位内的残基)、非线性氨基酸残基(在本文中称作“非线性表位”或“构象表位”;这些表位并不连续排列)、或同时包含线性和非线性氨基酸残基。非线性表位或构象表位也可包含导致抗体的识别结构的总体构象的氨基酸残基,但其不必结合抗体。通常,表位是短氨基酸序列,例如,长度为约5个氨基酸。用于鉴定表位的系统分类技术是本领域已知的并且在例如下述的实施例中描述。

[0128] 靶多肽可包含单个表位,但通常包含至少两个表位,并可包括任意数量的表位,这取决于抗原的大小、构象和类型。而且,应该注意到,靶标多肽上的“表位”可以是或可包括非多肽元件,例如表位可包括糖侧链。

[0129] 认为抗体的肽或多肽表位的最小尺寸是约4至5个氨基酸。肽或多肽表位可含有至少7个,至少9个,后者至少约15至约30个氨基酸。由于CDR能以三联形式识别抗原性肽或多肽,所以包含表位的氨基酸不必定是毗连的,在某些情况下甚至可不在同一肽链上。本发明的抗-SEMA4D抗体识别的肽或多肽表位可含有SEMA4D中至少4个、至少5个、至少6个、至少7个、至少8个、至少9个、至少10个、至少15个、至少20个、至少25个、或约15-约30个毗连或非毗连的氨基酸。

[0130] 在一些实施方式中,表位与靶多肽氨基酸序列(例如,SEQ ID NO:42、SEQ ID NO:44或SEQ ID NO:46中所示序列)具有至少80%、85%、90%、95%或100%的相同性。

[0131] 在一些实施方式中,除了4、3、2、1或0个氨基酸取代以外,表位与靶多肽氨基酸序列(例如,SEQ ID NO:42、SEQ ID NO:44或SEQ ID NO:46中所示序列)相同。在另一个实施方式中,除了保守氨基酸取代(例如,10、9、8、7、6、5、4、3、2、1或0个保守氨基酸取代)以外,表位与靶多肽氨基酸序列(例如,SEQ ID NO:42、SEQ ID NO:44或SEQ ID NO:46中所示序列)相同。

[0132] 在一些实施方式中,表位包含SEQ ID NO:42、SEQ ID NO:44或SEQ ID NO:46中所示的序列。在另一个实施方式中,表位是SEQ ID NO:42、SEQ ID NO:44或SEQ ID NO:46中所示的序列。在一些实施方式中,表位是线性表位。在一些实施方式中,表位是构象表位。

[0133] 在一些实施方式中,表位包含LKVPVFYALFTPQLNNV (SEQ ID NO:42, 对应于SEQ ID NO:1所示的全长SEMA4D氨基酸序列的残基304至320)、KWTTSFLKARLIASRP (SEQ ID NO:44, 对应于SEQ ID NO:1所示的全长SEMA4D氨基酸序列的残基270至284, 其中281位可以是半胱氨酸或丙氨酸) 或EFVFRVLIPRIARV (SEQ ID NO:46, 对应于SEQ ID NO:1所示的全长SEMA4D氨基酸序列的残基243至256), 由其基本组成或由其组成。在一些实施方式中,表位包含SEQ ID NO:42、44和46中所示的氨基酸序列中的一个或多个。在一些实施方式中,表位是包含在跨SEQ ID NO:1的氨基酸残基243至320的结构域中的不连续表位。

[0134] V. 使用治疗性抗-SEMA4D抗体作为单一试剂或与至少一种免疫调节治疗组合的治疗方法

[0135] 本发明的方法涉及使用抗-SEMA4D或抗-丛蛋白-B1结合分子,例如,抗体,包括其抗原结合片段、变体和衍生物作为单一试剂或与至少一种其他免疫调节治疗组合以抑制、延迟或减少在需要这种抑制、延迟或减少的对象,例如癌症患者中的肿瘤生长或转移。在某些实施方式中,癌细胞表达SEMA4D受体,在某些实施方式中,该受体是从蛋白-B1。虽然以下说明涉及给予抗-SEMA4D抗体,本文所述的方法同等适用于保留本发明抗体的所需性质的这些抗体的抗原结合片段、变体和衍生物,例如,能够特异性结合SEMA4D,例如,人、小鼠、或人和小鼠SEMA4D,具有SEMA4D中和活性,和/或阻断SEMA4D与其受体的相互作用。本文所述的方法也适用于保留本发明抗体的所需性质的其他生物产品或小分子药物,例如,能够特异性结合SEMA4D,例如,人、小鼠、或人和小鼠SEMA4D,具有SEMA4D中和活性,和/或阻断SEMA4D与其受体的相互作用。

[0136] 在一个实施方式中,抗-SEMA4D分子,例如抗体,包括其抗原结合片段、变体和衍生物可用作单一试剂以抑制、延迟或减少需要这种抑制、延迟或减少的对象,例如癌症患者中的肿瘤生长。在某些实施方式中,癌细胞表达SEMA4D受体,例如,丛蛋白-B1或丛蛋白-B2。在其他实施方式中,癌细胞表达可与SEMA4D受体联合发挥作用的其他受体。这种受体的一个示例是HER2 (ErbB2)。其中已经观察到丛蛋白-B1或丛蛋白-B2与Her2联合表达的癌症的示例包括肺癌、乳腺癌、前列腺癌和卵巢癌。如此,在某些实施方式中,抗-SEMA4D分子,例如抗体,包括其抗原结合片段、变体和衍生物可用作单一试剂以抑制、延迟或减少患有肺癌、乳腺癌、前列腺癌或卵巢癌的对象中的肿瘤生长。

[0137] 在一个实施方式中,免疫调节治疗包括癌症疫苗、免疫刺激剂、过继T细胞或抗体治疗和免疫检查点阻滞的抑制剂 (Lizée等, 2013. Harnessing the Power of the Immune System to Target Cancer (控制免疫系统的能量靶向癌症) . Annu. Rev. Med. 卷64 No. 71-90)。

[0138] 癌症疫苗。癌症疫苗激活身体的免疫系统和对异常细胞的天然抵抗,如癌症,导致根除或控制疾病。癌症疫苗一般由免疫原性制剂中的肿瘤抗原组成,其激活肿瘤抗原特异性辅助细胞和/或CTL和B细胞。疫苗可以是多种制剂形式,包括,但不限于,树突细胞,尤其是肿瘤细胞或肿瘤抗原脉冲处理的自体树突细胞,用免疫刺激剂如GM-CSF转染的异源肿瘤细胞,重组病毒,或通常与强效免疫佐剂一起给予的蛋白质或肽,如CpG。

[0139] 免疫刺激剂。免疫刺激剂作用是增强或增加对肿瘤的免疫应答,这种应答通过多种机制在许多癌症患者中被抑制。免疫调节治疗可靶向淋巴细胞、巨噬细胞、树突细胞、自然杀伤细胞 (NK细胞)、或这些细胞的亚组,如细胞毒性T淋巴细胞 (CTL) 或自然杀伤T (NKT)

细胞。由于相互作用的免疫级联,对一组免疫细胞的作用将通常通过发展到其他细胞而放大,例如,增强的抗原呈递细胞活性促进T和B淋巴细胞的应答。免疫刺激剂的示例包括,但不限于,HER2,细胞因子如G-CSF、GM-CSF和IL-2,来自细菌的细胞膜片段,与CD1d结合以激活自然杀伤(NKT)细胞的糖脂,CpG寡核苷酸。

[0140] 免疫系统的粒吞噬细胞、巨噬细胞是先天防御机制的基础部分,其可通过诱导T细胞募集和激活来促进特异性免疫。尽管如此,它们在肿瘤微环境内的存在已经与增强的肿瘤发展相关并且显示出促进癌细胞生长和铺展、血管生成和免疫抑制。设定它们的表型的关键是巨噬细胞接触的微环境信号,其在包括M1(肿瘤抑制巨噬细胞)和M2(肿瘤促进巨噬细胞)极值的功能谱内选择性调节它们的功能。Sica等, *Seminars in Cancer Biol.* 18: 349-355 (2008)。在肿瘤期间增加的巨噬细胞数量与差预后相关(Qualls和Murray, *Curr. Topics in Develop. Biol.* 94:309-328 (2011))。在实体瘤中常见的多种独特的体细胞类型中,肿瘤相关巨噬细胞(TAM)对于促进肿瘤发展是显著的。调节TAN极化的靶向分子通路对于抗癌治疗而言很有希望。Ruffell等, *Trends in Immunol.* 33:119-126 (2012)。

[0141] 过继细胞转移。过继细胞转移可采用基于T细胞的细胞毒性应答来攻击癌细胞。生成对患者的癌症具有天然或遗传工程改造的活性的自体T细胞并且在体外增殖并随后转移回癌症患者。一项研究证明体外增殖的自体肿瘤浸润性淋巴细胞的过继转移是患有转移性黑素瘤的患者的有效治疗。(Rosenberg SA, Restifo NP, Yang JC, Morgan RA, Dudley ME (2008年4月). "Adoptive cell transfer:a clinical path to effective cancer immunotherapy" (过继细胞转移:有效癌症免疫疗法的临床路径). *Nat. Rev. Cancer* 8 (4) : 299-308)。这可通过获取在切除的患者肿瘤内发现的T细胞来实现。这些T细胞转移至肿瘤浸润性淋巴细胞(TIL)并且推测由于其对肿瘤抗原的特异性已经转运至肿瘤。可适用高浓度的IL-2、抗-CD3和异-反应性饲细胞诱导这类T细胞在体外增殖。这些T细胞然后与外部给予IL-2一起转移回患者以进一步强化它们的抗癌活性。在其他研究中,已经用嵌合抗原受体转导自体T细胞,该受体赋予它们对靶向的肿瘤抗原的反应性(Liddy等, *Nature Med.* 18: 980-7, (2012); Grupp等, *New England J. Med.* 368:1509-18, (2013))。

[0142] 其他过继细胞转移疗法采用离体接触天然或修饰的肿瘤抗原的自体树突细胞,其然后重新输注到患者中。普罗文奇(Provenge)是一种FDA批准的疗法,其中用前列腺酸性磷酸酶和GM-CSF的融合蛋白孵育自体细胞以治疗患有前列腺肿瘤的患者。GM-CSF被认为促进抗原呈递树突细胞的分化和活性(Small等, *J. Clin. Oncol.* 18:3894-903 (2000); 美国专利号7,414,108)。

[0143] 免疫检查点阻滞。免疫检查点阻滞疗法通过去除限制正在进行的免疫应答的负反馈控制来增强T细胞免疫。这些类型的治疗靶向免疫系统中的抑制通路,这些通路对于调控外周组织(抗-CTLA4)或表达PD-L1(抗-PD1或抗-PD-L1)的肿瘤组织中的生理免疫应答的持续时间和幅度以最小化附带组织损伤而言是关键的。肿瘤可进化以利用某些免疫检验点通路作为对肿瘤抗原有特异性的T细胞的免疫耐受的主要机制。由于通过配体-受体相互作用引发了许多免疫检验点,这些检验点可通过针对受体或配体的抗体来封闭或者可通过配体或受体的可溶重组形式来调节。免疫检验点的中和允许肿瘤特异性T细胞持续在其他免疫抑制的肿瘤微环境中发挥作用。免疫检查点阻滞治疗的示例是靶向细胞毒性T-淋巴细胞相关抗原4(CTLA-4)、PD-1、其配体PD-L1、LAG3和B7-H3的那些。

[0144] 环磷酰胺。一种常用的化疗即,环磷酰胺可增强免疫应答。环磷酰胺相对于效应T细胞差异性抑制调节T细胞(Treg)的功能。Treg在调节抗癌免疫应答中是重要的。肿瘤浸润性Treg之前已经与差预后相关。虽然,目前没有特异性靶向Treg的试剂,环磷酰胺已经出现作为一种相对于其他T细胞能够优先抑制Treg的临幊上可行的试剂,并且因此允许更有效地诱导抗肿瘤免疫应答。

[0145] 其他免疫调节疗法:在另一个实施方式中,用SEMA4D或从蛋白-B1结合分子,例如抗体或其抗原结合片段、变体或衍生物的疗法可与低剂量化疗或放疗结合。虽然,标准化疗通常是免疫抑制性的,低剂量的化疗剂如环磷酰胺、多柔比星和紫杉醇,已经显示出增强针对癌症的疫苗治疗的应答(Machiels等,Cancer Res.61:3689-3697(2001))。在一些情况下,化疗可差异性灭活负调节肿瘤环境中的免疫应答的髓系来源抑制细胞(MDSC)和T调节细胞(Treg)。通常已经采用放疗来利用电离辐射的直接肿瘤杀伤作用。事实上,高剂量的放射,与化疗一样,可能是免疫抑制的。然而,多次观察表明在剂量分离和定序的合适条件下,放疗可增强肿瘤特异性免疫应答以及免疫调节剂的效果。导致这一效果的几种机制之一是树突细胞和其他抗原呈递细胞对由放射诱导的肿瘤细胞死亡释放的肿瘤抗原的交叉呈递(Higgins等,Cancer Biol.Ther.8:1440-1449(2009))。在效果上,放疗可诱导针对肿瘤的原位疫苗接种(Ma等,Seminar Immunol.22:113-124(2010))并且这可通过与使用SEMA4D或从蛋白-B1结合分子,如抗体或其抗原结合片段、变体或衍生物的疗法结合来放大。

[0146] 在一个实施方式中,免疫调节疗法可以是免疫调节剂,包括但不限于白介素如IL-2、IL-7、IL-12;细胞因子如粒细胞集落刺激因子(G-CSF)、干扰素;各种趋化因子如CXCL13、CCL26、CXCL7;免疫检查点阻滞的拮抗剂,如抗-CTLA-4、抗-PD1或抗-PD-L1、抗-LAG3和抗-B7-H3;合成胞嘧啶磷酸酯-鸟嘌呤(CpG)、寡脱氧核苷酸、葡聚糖、调节T细胞(Treg)的调节剂如环磷酰胺、或其他免疫调节剂。在一个实施方式中,免疫调节剂是针对4-1BB的拮抗抗体(CD137)。如近来报道,这类针对4-1BB的拮抗抗体可产生新的一类KLRG1+T细胞,其对肿瘤有高度细胞毒性(Curran等,J.Exp.Med.210:743-755(2013))。在所有情况下,在抗-SEMA4D或抗-从蛋白-B1结合分子,例如抗体或其抗原结合片段、变体或衍生物疗法之前、期间或之后给予其他免疫调节治疗。在组合疗法包括给予抗-SEMA4D结合分子,例如,抗体或其抗原结合片段、变体或衍生物与给予另一种免疫调节剂的情况下,本发明的方法包括共同给予、使用单独制剂或单一药物制剂,其以任意顺序同时或连续给予。

[0147] 在一个实施方式中,免疫调节疗法可以是癌症治疗剂,包括但不限于手术或手术过程(例如,脾切除术、肝切除术、淋巴切除术、白细胞透入(leukapheresis)、骨髓移植等);放疗;化疗,任选地与自体骨髓移植或其他癌症疗法结合;其中其他癌症疗法在抗-SEMA4D结合分子,例如抗体或其抗原结合片段、变体或衍生物之前、同时或之后给予。在组合疗法包括给予抗-SEMA4D结合分子,例如,抗体或其抗原结合片段、变体或衍生物与给予另一种治疗的情况下,本发明的方法包括共同给予、使用单独制剂或单一药物制剂,以任意顺序同时或连续给予。

[0148] 在另一个实施方式中,本发明涉及使用抗-SEMA4D或抗-从蛋白-B1结合分子,例如,抗体,包括其抗原结合片段、变体和衍生物作为单一试剂或与至少一种其他免疫调节疗法结合以治疗具有与其他实体瘤患者(如在脑、卵巢、乳腺、结肠和其他组织中发现的那些,但排除血液癌症)相比升高水平的循环中B细胞、T细胞、或B细胞和T细胞的癌症患者。本文

CN 105492016 B

所用术语“升高”是指癌症患者的循环中B细胞和/或T细胞的平均数是其他癌症患者的至少1.5倍,例如,约1.5至约5倍,例如,约1.5、2、2.5、3、3.5、4、4.5或5或更多倍。在一个非限制性实施例中,在一组34名实体瘤患者中,B细胞的平均数是每微升血液98个,并且T细胞的平均数是每微升血液782个。因此,与其他癌症患者相比,在具有升高的B细胞和T细胞水平的该亚组的癌症患者中观察到的每微升血液的B细胞和T细胞的平均数量的范围分别可以是约147至约588和约1173至约3910。

[0149] 在另一个实施方式中,本发明涉及使用抗-SEMA4D或抗-丛蛋白-B1结合分子,例如,抗体,包括其抗原结合片段、变体和衍生物作为单一试剂或与至少一种其他免疫调节疗法结合以治疗具有落入正常个体范围或在该范围以上的循环中B细胞、T细胞、或B细胞和T细胞水平的患者。本文所用术语“正常”是指在健康非癌症患者中发现的B和/或T细胞水平。本文所用术语“落入”是指B细胞和/或T细胞水平的10%差异。在一个非限制性实施例中,正常水平的范围包括,例如,每微升约250个细胞或更多的B细胞量和/或每微升约1500个细胞或更多的T细胞量。因此,与其他健康非癌症患者相比,在具有升高的B细胞和T细胞水平的癌症患者中观察到的每微升血液的B细胞和T细胞的平均数量的范围分别可以是约225至约275或更多和约1350至约1650和更多。当然,本领域技术人员应该理解B细胞和T细胞的水平可根据多种因素变化,例如,癌症类型、癌症阶段等,并且因此,低于上述提供的范围的水平也可构成对某些类型或阶段的癌症而言升高的水平。

[0150] 在一些实施方式中,使用验证的基于流式细胞术的免疫表型试验(BD Mutitest 6-色TBNK试剂)来测量绝对T和B细胞计数,该试验是一种六色直接免疫荧光试验,其也采用BD Trucount管和BD FACScanto流式细胞仪。通常使用该试验来确定外周血中T细胞的CD4和CD8亚群以及T、B和NK细胞的绝对计数和百分比。外周血细胞首先在CD45+淋巴细胞上进行门选。T细胞在该门选中定义为CD3+细胞并且B细胞在该门选中定义为CD19+CD3-细胞。在设定合适的门选之后,从流式细胞仪中直接简单地获取百分比,并且使用以下公式(直接取自BD过程手册)计算绝对计数:[(#细胞群中的事件/#绝对计数珠区中的事件)]\*[(#珠/测试a)/测试体积]=细胞群绝对计数,其中“a”是在BD Trucount管箔囊袋标记上发现的值。

[0151] 也应理解本文所述的方法也适用于抗-丛蛋白-B1结合分子取代抗-SEMA4D结合分子。在一些实施方式中,抗-丛蛋白-B1结合分子可用于通过封闭SEMA4D与丛蛋白-B1的结合和/或通过防止SEMA4D激活丛蛋白-B1来抑制SEMA4D与丛蛋白-B1的相互作用。也应理解本文所述的方法也适用于小分子药物或其他生物产品抑制SEMA4D或丛蛋白-B1的活性的用途。在一些实施方式中,除抗-丛蛋白-B1结合分子以外的小分子药物或生物产品可用于通过封闭SEMA4D与丛蛋白-B1的结合和/或通过防止SEMA4D激活丛蛋白-B1来抑制SEMA4D与丛蛋白-B1的相互作用。

[0152] 在一个实施方式中,处理包括以单一试剂向患者或者与至少一种其他免疫调节治疗组合施加或给予抗-SEMA4D结合分子,例如本文所述的抗体或抗原结合片段,或者以单一试剂或者与至少一种其他免疫调节治疗组合向来自患者的分离组织或细胞系施加或给予抗-SEMA4D结合分子,其中该患者具有,或者处于癌细胞发展转移癌的风险中。在另一个实施方式中,治疗也往往包括与至少一种其他免疫调节治疗组合向患者给予包括抗-SEMA4D结合分子,例如抗体或其抗原结合片段的组合物,或者向来自患者的分离组织或细胞系施加或给予包括抗-SEMA4D结合分子和至少一种其他免疫调节治疗的组合物,其中该患者具

有,或者处于癌细胞发展转移癌的风险中。

[0153] 以单一试剂或与至少一种其他免疫调节治疗组合的本文所述的抗-SEMA4D结合分子,例如抗体或其结合片段可用于治疗各种恶性和非恶性肿瘤。“抗肿瘤活性”是指与肿瘤直接相关或与肿瘤环境的基质细胞间接相关的SEMA4D产生或积累速率降低,并且因此降低已有肿瘤或治疗期间出现的肿瘤的生长速率,和/或破坏已有的肿瘤细胞或新形成的肿瘤细胞,以及因此降低肿瘤的尺寸和/或治疗期间转移部位的数量。例如,以单一试剂形式或与至少一种其他免疫调节治疗组合的抗-SEMA4D抗体进行的治疗导致生理反应,例如,转移癌减少,其相对于人中SEMA4D-表达细胞相关的疾病状态的治疗而言有益。

[0154] 在一个实施方式中,本发明涉及以单一试剂形式或与至少一种其他免疫调节治疗组合的抗-SEMA4D结合分子,例如抗体或其抗原结合片段、变体或衍生物作为治疗或预防癌症或用于在癌前病症或损伤中抑制、减少、防止、延缓或最小化肿瘤细胞的生长或转移的药物的用途。

[0155] 按照本发明的方法,以单一试剂形式或与至少一种其他免疫调节治疗组合的至少一种抗-SEMA4D结合分子,例如抗体或其抗原结合片段、变体或衍生物可用于促进针对恶性人细胞的积极治疗性应答。癌症治疗的“阳性治疗响应”指与这些结合分子如抗体或其片段的抗肿瘤活性有关的疾病改善,和/或与疾病相关症状的改善。具体地,本发明提供的方法涉及抑制、预防、减少、缓解、延迟或减弱患者中肿瘤生长和/或原发肿瘤发展成转移瘤。即可观察到防止远端肿瘤派生。因此,例如,疾病改善的特征在于完全响应。“完全响应”是指标准化之前异常的放射显影研究,例如,在原发肿瘤部位或骨髓中存在肿瘤转移时,没有临幊上可检测到的转移癌。或者,疾病改善可分类为部分响应。“部分响应”是指全部可测量的转移癌(即,对象中远离原发肿瘤的部位处存在的肿瘤细胞的数量)减少至少约50%。或者,疾病改善可分类成无复发存活或“无进展存活”。“无复发存活”是指肿瘤在任意部位再出现的时间。“无进展存活”是在可检测到受监测部位处肿瘤的进一步生长之前的时间。

[0156] 可使用扫描计数,如成像,例如,荧光抗体成像、骨扫描成像和肿瘤活检取样包括骨髓抽吸(BMA)、或免疫组化来评价转移癌的抑制、延迟或减少。除这些阳性治疗响应外,接受抗-SEMA4D结合分子,如抗体或其抗原结合片段、变体或衍生物治疗的对象可产生疾病相关症状改善的有益效果。

[0157] 可利用筛选技术评估临床响应,如磁共振成像(MRI)扫描、x-射线成像、计算机断层成像(CT)扫描、流式细胞术或荧光活化细胞分选仪(FACS)分析、组织学分析、大体病理学分析和血液化学分析,包括但不限于可通过ELISA、RIA、色谱等检测到的改变。

[0158] 为了在某些实施方式中应用本发明的方法和系统,可在向具有Her2+和从蛋白B1+或从蛋白B2+的肿瘤的对象给予治疗之前或之后从患者获取样品,治疗包括:(1)有效量的特异性结合脑信号蛋白-4D(SEMA4D)的分离的结合分子和有效量的至少一种其他免疫调节治疗;或(2)有效量的特异性结合脑信号蛋白-4D(SEMA4D)的分离的结合分子。在一些情况下,可在已经开始治疗之后或已经停止治疗之后从患者获得连续样品。样品可以是,例如,由医疗提供者(例如,医生)或医疗福利提供者所需要,由相同或不同医疗提供者(例如,护士,医院)或临床实验室获得和/或处理,并且在处理之后,可将结果转送至另一个提供者、医疗福利提供者或患者。类似地,可由一个或多个医疗提供者、医疗福利提供者和/或临床实验室进行一个或多个分数的测量/确定、分数之间的比较、分数的评价和治疗决定。

[0159] 本文所用术语“医疗提供者”是指直接接触或向活的对象(例如人类患者)给药的个人或机构。医疗提供者的非限制性示例包括医生、护士、技师、治疗师、药师、顾问、替代医学从业者、医学设备、医生办公室、医院、急救室、诊所、急救中心、替代医学诊所/设备、和提供关于患者健康状态的全部或任意部分的一般和/或特殊治疗、评价、维持、疗法、医药和/或建议的任意其他实体,包括但不限于一般医学、特殊医学、手术、和/或任何其他类型治疗、评价、维持、疗法、医药和/或建议。

[0160] 在一些方面中,医疗提供者可给予或指导其他医疗提供者向具有或疑似具有Her2+和丛蛋白B1+或丛蛋白B2+的肿瘤细胞的对象给予治疗,该治疗包括: (1) 有效量的特异性结合脑信号蛋白-4D(SEMA4D)的分离的结合分子和有效量的至少一种其他免疫调节治疗; 或(2) 有效量的特异性结合脑信号蛋白-4D(SEMA4D)的分离的结合分子。医疗提供者可执行或指导其他医疗提供者或患者进行以下动作: 获取样品、处理样品、提交样品、接收样品、转移样品、分析或测量样品、定量样品、提供在分析/测量/定量样品之后得到的结果、接收在分析/测量/定量样品之后得到的结果、比较/评分在分析/测量/定量一个或多个样品之后得到的结果、提供来自一个或多个样品的比较/分数、获取来自一个或多个样品的比较/分数、向对象给予治疗(例如, (1) 有效量的特异性结合脑信号蛋白-4D(SEMA4D)的分离的结合分子和有效量的至少一种其他免疫调节治疗; 或(2) 有效量的特异性结合脑信号蛋白-4D(SEMA4D)的分离的结合分子), 其中该对象具有,或疑似具有Her2+和丛蛋白B1+或丛蛋白B2+的肿瘤细胞,开始给予治疗、停止给予治疗、继续给予治疗、暂时中断给予治疗、增加给予的治疗剂的量、减少给予的治疗剂的量、继续给予一定量的治疗剂、增加给予治疗剂的频率、降低给予治疗剂的频率、保持治疗剂的相同给药频率、由至少一种其他治疗或治疗剂取代治疗或治疗剂、将治疗或治疗剂与至少一种其他治疗或治疗剂组合。在一些方面中,医疗提供者可授权或拒绝例如,收集样品、处理样品、提交样品、接收样品、转移样品、分析或测量样品、定量样品、提供在分析/测量/定量样品之后得到的结果、转移在分析/测量/定量样品之后得到的结果、比较/评分在分析/测量/定量一个或多个样品之后得到的结果、转移来自一个或多个样品的比较/分数、给予治疗或治疗剂、开始给予治疗或治疗剂、停止给予治疗或治疗剂、持续给予治疗或治疗剂、暂时中断给予治疗或治疗剂、增加给予的治疗剂的量、减少给予的治疗剂的量、继续给予一定量的治疗剂、增加给予治疗剂的频率、降低给予治疗剂的频率、维持治疗剂的相同给药频率、由至少一种其他治疗或治疗剂取代治疗或治疗剂、或将治疗或治疗剂与至少一种其他治疗或治疗剂组合。

[0161] 另外,医疗福利提供者可以,例如授权或拒绝治疗处方,授权或拒绝治疗覆盖范围,授权或拒绝治疗成本的退还,确定或拒绝治疗合格性等。

[0162] 在一些方面中,临床实验室可以,例如,收集或获取样品、处理样品、提交样品、接收样品、转移样品、分析或测量样品、定量样品、提供在分析/测量/定量样品之后得到的结果、接收在分析/测量/定量样品之后得到的结果、比较/评分在分析/测量/定量一个或多个样品之后得到的结果、提供来自一个或多个样品的比较/分数、获取来自一个或多个样品的比较/分数、或其他相关活动。

[0163] VI. 诊断和治疗方法

[0164] 在某些实施方式中,本发明提供了治疗对象,例如癌症患者的方法,其中该对象具有升高水平的B细胞、T细胞或B细胞和T细胞,该方法包括如果该对象的B细胞、T细胞或B细

胞和T细胞水平超过B细胞、T细胞或B细胞和T细胞的预定阈值水平,或者相对于一个或多个对照样品中的B细胞、T细胞或B细胞和T细胞水平升高,则给予有效量的特异性结合脑信号蛋白-4D(SEMA4D)和有效量的至少一种其他免疫调节治疗的组合的分离的结合分子,对照样品可包括但不限于来自其他癌症患者或来自健康非癌症患者的样品。可由医疗提供者或临床实验室测量B细胞、T细胞或B细胞和T细胞水平,其中由医疗提供者或临床实验室从患者获取样品,例如,血液样品。在一个方面中,可在基于流式细胞术的免疫表型试验中测量患者的B细胞、T细胞或B细胞和T细胞的水平。

[0165] 在某些实施方式中,本发明也提供了治疗对象,例如癌症患者的方法,该方法包括:如果取自该对象的肿瘤细胞的样品中的Her2和从蛋白B1或从蛋白B2表达高于上述预定阈值水平,或者相对于一个或多个对照样品中的Her2和从蛋白B1或从蛋白B2表达升高,则向该对象给予有效量的特异性结合脑信号蛋白-4D(SEMA4D)的分离的结合分子。可由医疗提供者或临床实验室在蛋白质水平和/或mRNA水平上测量对象的肿瘤细胞中的Her2、从蛋白B1和/或从蛋白B2表达。在某些方面中,可通过例如成像技术在原位测量Her2、从蛋白B1和/或从蛋白B2表达。在某些方面中,可通过活检测量获取对象的肿瘤细胞样品中的Her2、从蛋白B1和/或从蛋白B2表达。在一个方面中,可在采用抗体或其抗原结合片段的生物试验中测量肿瘤细胞中的Her2、从蛋白B1和/或从蛋白B2表达,该抗体或抗原结合片段识别Her2、从蛋白B1、和/或从蛋白B2蛋白质、或其抗原结合片段、变体或衍生物。在另一个方面中,可通过定量基因表达试验,例如RT-PCR试验来测量Her2、从蛋白B1和/或从蛋白B2表达。

[0166] 本发明还提供了方法、试验和试剂盒来促进由医疗提供者、医疗福利提供者或临床实验室确定对象,例如癌症患者是否将受益于用以下治疗:(1)有效量的特异性结合脑信号蛋白-4D(SEMA4D)的分离的结合分子和有效量的至少一种其他免疫调节治疗;或(2)有效量的特异性结合脑信号蛋白-4D(SEMA4D)的分离的结合分子,其中该对象具有或疑似具有Her2+和从蛋白B1+或从蛋白B2+的肿瘤细胞。本发明提供的方法、试验和试剂盒还将促进由医疗提供者、医疗福利提供者或临床实验室确定对象,例如癌症患者是否将受益于用以下治疗:(1)有效量的特异性结合脑信号蛋白-4D(SEMA4D)的分离的结合分子和有效量的至少一种其他免疫调节治疗;或(2)有效量的特异性结合脑信号蛋白-4D(SEMA4D)的分离的结合分子(例如,其中该对象的肿瘤细胞表达或确定表达Her2和从蛋白B1或从蛋白B2)。

[0167] 本发明提供了治疗对象,例如癌症患者的方法,该方法包括如果取自该患者的样品中的B细胞、T细胞、或B细胞和T细胞的水平高于预定阈值水平,或者高于一个或多个对照样品中的B细胞、T细胞、或B细胞和T细胞的水平,则给予有效量的特异性结合脑信号蛋白-4D(SEMA4D)的分离的结合分子和有效量的至少一种其他免疫调节治疗。在一些方面中,从患者获取样品并且提交至例如临床实验室来测量样品中B细胞、T细胞、或B细胞和T细胞的水平。

[0168] 还提供了一种治疗对象,例如癌症患者的方法,该方法包括:(a)提交取自该对象的样品来测量样品中B细胞、T细胞、或B细胞和T细胞的水平;和(b)如果该对象的B细胞、T细胞、或B细胞和T细胞的水平高于预定阈值水平,或者高于一个或多个对照样品中的B细胞、T细胞、或B细胞和T细胞的水平,则给予该对象有效量的特异性结合脑信号蛋白-4D(SEMA4D)的分离的结合分子和有效量的至少一种其他免疫调节治疗。

[0169] 本发明还提供了治疗对象,例如癌症患者的方法,该方法包括(a)测量取自对象,

例如癌症患者的样品中B细胞、T细胞、或B细胞和T细胞的水平,其中在基于流式细胞术的免疫表型试验中测量样品中的B细胞、T细胞、或B细胞和T细胞的水平;(b)确定样品中B细胞、T细胞、或B细胞和T细胞的水平是否高于预定阈值水平,或者高于一个或多个对照样品中的B细胞、T细胞、或B细胞和T细胞的水平;和(c)如果该对象的B细胞、T细胞、或B细胞和T细胞的水平高于预定阈值水平,或者高于一个或多个对照样品中的B细胞、T细胞、或B细胞和T细胞的水平,则建议、指示或授权医疗提供者向该对象给予有效量的特异性结合脑信号蛋白-4D(SEMA4D)的分离的结合分子和有效量的至少一种其他免疫调节治疗。

[0170] 在一些方面中,可在基于流式细胞术的免疫表型试验中测量对象的B细胞、T细胞、或B细胞和T细胞的水平。在某些方面中,可通过医疗专业人员用例如本文所述的试验配制成“医疗点”诊断试剂盒对取自对象的样品进行试验。在一些方面中,可从对象获取样品并且可提交至例如临床实验室来按照医疗专业人员的说明测量样品中B细胞、T细胞、或T细胞和B细胞的水平,包括但不限于使用本文所述的基于流式细胞术的免疫表型试验。在某些方面中,临床实验室所进行的试验可建议医疗提供者或医疗福利提供者如果取自该患者的样品中的B细胞、T细胞、或B细胞和T细胞的水平高于预定阈值水平,或者高于一个或多个对照样品中的B细胞、T细胞、或T细胞和B细胞的水平,对象是否受益于用有效量的特异性结合脑信号蛋白-4D(SEMA4D)的分离的结合分子和有效量的至少一种其他免疫调节治疗的治疗。

[0171] 在某些方面中,本文所述提供的免疫试验的结果可提交至医疗福利提供者来确定患者的保险是否覆盖用特异性结合脑信号蛋白-4D(SEMA4D)的分离的结合分子和至少一种其他免疫调节治疗的治疗。

#### [0172] VII. 药物组合物和给药方法

[0173] 本领域技术人员熟知或不难确定制备和给予单一试剂形式或与至少一种其他免疫调节治疗组合的抗-SEMA4D结合分子,如抗体或其抗原结合片段、变体或衍生物的方法。单一试剂形式或与至少一种其他免疫调节治疗组合的抗-SEMA4D结合分子,如抗体或其抗原结合片段、变体或衍生物的给药途径可以是,例如,对于各治疗剂以相同或不同次数口服、胃肠外、通过吸入或局部给予。本文所用的术语“胃肠道外”包括例如,静脉内、动脉内、腹膜内、肌肉内、皮下、直肠或阴道给药。虽然所有这些给药形式均明确认为在本发明范围内,但给药形式的例子是注射液,特别是用于静脉内或动脉内注射或滴注。合适的注射用药物组合物可包含缓冲剂(如乙酸盐、磷酸盐或柠檬酸盐缓冲剂)、表面活性剂(如聚山梨酯),以及任选的稳定剂(如人白蛋白)等。然而,在与本文所教授内容相符的其它方法中,单一试剂形式或与至少一种其他免疫调节治疗组合的本发明抗-SEMA4D结合分子,如抗体或其抗原结合片段、变体或衍生物可直接递送到不良细胞群的位点,从而提高患病组织与治疗剂的接触。

[0174] 如本文所述,可以药学上有效的量给予单一试剂形式或与至少一种其他免疫调节治疗组合的本发明抗-SEMA4D结合分子,如抗体或其抗原结合片段、变体或衍生物用于体内治疗疾病,如肿瘤疾病,包括实体肿瘤。在这方面,应理解,将配制本发明公开的结合分子以利于给药并提高活性物质的稳定性。在某些实施方式中,本发明的药物组合物包含药学上可接受的无毒无菌运载体,如生理盐水、无毒缓冲液、防腐剂等。出于本申请目的,药学上有效的量的单一试剂形式或与至少一种其他免疫调节治疗组合的抗-SEMA4D结合分子,如抗体或其抗原结合片段、变体或衍生物的药学有效量应认为指足以结合靶标并实现抑制、延

迟或减少癌症患者中的转移癌的量。

[0175] 本发明所用的药物组合物包含药学上可接受的运载体,包括例如,离子交换剂、氧化铝、硬脂酸铝、卵磷脂,血清蛋白质如人血清白蛋白,缓冲物质如磷酸盐、甘氨酸、山梨酸、山梨酸钾、饱和植物脂肪酸的部分甘油酯混合物、水、盐或电解质,如硫酸鱼精蛋白、磷酸氢二钠、磷酸氢钾、氯化钠、锌盐、胶体二氧化硅、三硅酸镁、聚乙烯吡咯烷酮、纤维素基物质、聚乙二醇、羧甲基纤维素钠、聚丙烯酸酯、蜡、聚乙烯-聚氧丙烯-嵌段聚合物、聚乙二醇和羊毛脂。

[0176] 胃肠道外给药制剂包括无菌的水性或非水性溶液、悬液和乳液。非水性溶剂的示例是丙二醇、聚乙二醇、植物油如橄榄油,和可注射有机酯如油酸乙酯。水性运载体包括例如,水、醇/水溶液、乳液或悬液,包括盐水和缓冲介质。药学上可接受的运载体包括但不限于:0.01-0.1M例如0.05M的磷酸盐缓冲液或0.8%盐水。其它常见的胃肠道外载剂包括磷酸钠溶液、林格右旋糖、右旋糖和氯化钠、乳酸林格溶液或固定油。静脉内载剂包括液体和营养补充剂、电解质补充剂,例如基于林格右旋糖的那些物质等。也可存在防腐剂和其它添加剂,例如,抗微生物剂、抗氧化剂、螯合剂和惰性气体等。

[0177] 更具体地,适于注射应用的药物组合物包括无菌水溶液(水溶性时)或分散液,以及用于临时制备无菌注射液或分散液的无菌粉末。在这种情况下,该组合物必须无菌,并应该是达到存在注射容易性(easy syringability)程度的流体。它应该在制造和储存条件下稳定,并且应该在保存过程中能够抵抗微生物如细菌和真菌的污染作用。运载体可以是包含如水、乙醇、多元醇(例如甘油、丙二醇和液体聚乙二醇等)及其合适混合物的溶剂或分散介质。可维持合适的流动性,例如通过使用诸如卵磷脂的涂料、分散液情况下通过保持特定粒度以及通过使用表面活性剂。适用于本文所述治疗方法的制剂可参见Remington's Pharmaceutical Sciences(《雷明顿药物科学》)(马克出版公司(Mack Publishing Co.))第16版(1980)。

[0178] 也可通过各种抗菌剂和抗真菌剂(如对羟基苯甲酸酯类、氯丁醇、苯酚、抗坏血酸、硫柳汞等)实现防止微生物的作用。在某些实施方式中,组合物中可包含等渗剂,例如,糖、多元醇,如甘露醇、山梨醇或氯化钠。可在组合物中包含延迟吸收的试剂(如单硬脂酸铝和明胶)以延长可注射组合物的吸收。

[0179] 在任何情况下,制备无菌注射溶液可通过将特定量的活性化合物(如抗-SEMA4D抗体或其抗原结合片段、变体或衍生物,本身或与至少一种其他免疫调节治疗组合)掺入含有本文所列一种成分或多种成分组合的合适溶剂,然后进行过滤除菌。通常,将活性活化物掺入含有碱性分散介质和上述其它成分的无菌载剂中制备分散液。在制备无菌注射液所需的无菌粉末时,制备方法可包括真空干燥或冷冻干燥,由之前无菌过滤的溶液可产生活性组分和任何其它所需组分的粉末。注射制剂在无菌条件下按照本领域已知方法加工,装入容器(如安瓿、袋、瓶、注射器或小管)中,并密封。此外,可以试剂盒的形式包装并销售制剂。这类制品可具有标签或药品说明书,表明相关组合物可用于治疗患有或倾向于患有疾病或病症的对象。

[0180] 胃肠道外制剂可以是单次推注剂量,输注或负荷推注剂量,随后是维持剂量。可在具体固定或可变的间隔处给予这些组合物,例如,每天一次或者“按需”基础。

[0181] 某些药物组合物可以可接受的剂型口服给予,包括例如,胶囊、片剂、水性悬液或

溶液。也可通过鼻气溶胶或吸入来给予某些药物组合物。这类组合物可采用苯甲醇或其他合适的防腐剂,吸收促经济以增强生物可及性,和/或其他常规增溶剂或分散剂制备成盐水溶液。

[0182] 待与载体材料组合以产生单剂型的单一试剂形式或与至少一种其他免疫调节治疗组合的抗-SEMA4D结合分子,如抗体或其抗原结合片段、变体或衍生物的量将根据治疗的宿主和给药的具体模式变化。可以单剂型、多剂型或在确立的时间段内的输注中给予组合物。也可调整给药方案,以提供最优所需响应(例如,治疗或预防性响应)。

[0183] 在本发明范围内,单一试剂形式或与至少一种其他免疫调节治疗组合的抗-SEMA4D抗体或其抗原结合片段、变体或衍生物可按照上述治疗方法给予人或其它动物,其给予量足以产生疗效。单一试剂形式或与至少一种其他免疫调节治疗组合的抗-SEMA4D抗体或其抗原结合片段、变体或衍生物可以常规剂型给予人或其他动物,通过按照已知技术将本文提供的抗体与常规的药学上可接受的运载体或稀释剂合并来制备常规剂型。本领域技术人员应认识到,药学上可接受运载体或稀释剂的形式和特点由混合的活性成分含量、给药途径和其它熟知变量决定。本领域技术人员还将理解,可使用包含一种或多种抗-SEMA4D结合分子,如本发明提供的抗体或其抗原结合片段、变体或衍生物的混合物。

[0184] “治疗上有效的剂量或量”或“有效量”是指当给予时对于治疗患有待治疗疾病的患者带来积极治疗响应,例如抑制、延迟或减少患者中的转移癌的单一试剂形式或与至少一种其他免疫调节治疗组合的抗-SEMA4D结合分子,如抗体或其抗原结合片段、变体或衍生物的量。

[0185] 用于抑制、延迟或减少转移癌的本发明的药物制剂的治疗有效的剂量可根据许多不同的因素变化,包括给药方式、目标位点、患者的生理状态、患者是人还是动物、给予的其他药物和治疗是预防性还是治疗性。在某些实施方式中,患者是人,但也可治疗非人哺乳动物,包括转基因哺乳动物。可使用本领域技术人员已知的常规方法对治疗剂量进行滴定以优化安全性和功效。

[0186] 本领域普通技术人员容易确定以单一试剂或与至少一种其他免疫调节治疗组合给予的抗-SEMA4D结合分子,如抗体或其抗原结合片段、变体或衍生物的量,而不需要过多的本发明中给出的实验。影响以单一试剂或与至少一种其他免疫调节治疗组合给予的抗-SEMA4D结合分子,如抗体或其抗原结合片段、变体或衍生物各自用量和给药模式的因素包括但不限于:接受治疗的个体的疾病严重程度、病史、转移癌的可能性、年龄、身高、重量、健康和身体状况。类似地,待以单一试剂或与至少一种其他免疫调节治疗组合给予的抗-SEMA4D结合分子,如抗体或其抗原结合片段、变体或衍生物的量将取决于给药模式以及患者是否将接受单一剂量或多次剂量的该试剂。

[0187] 本发明还提供了单一试剂或与至少一种其他免疫调节治疗组合的抗-SEMA4D结合分子,如抗体或其抗原结合片段、变体或衍生物在制备用于治疗癌症患者的药物中的用途,其中该药物用于已经用至少一种其他治疗进行预治疗的对象。“预治疗”或“预处理”是指对象在接受包含单一试剂或与至少一种其他免疫调节治疗组合的抗-SEMA4D结合分子,如抗体或其抗原结合片段、变体或衍生物的药物之前已经接受了一种或多种其他治疗(例如,已经用至少一种其他癌症治疗进行治疗)。“预治疗”或“预处理”包括在开始用包含单一试剂或与至少一种其他免疫调节治疗组合的抗-SEMA4D结合分子,例如本文公开的单克隆抗体

VX15/2503或其抗原结合片段、变体或衍生物的药物治疗开始2年内、18个月内、1年内、6个月内、2个月内、6周内、1个月内、4周内、3周内、2周内、1周内、6天内、5天内、4天内、3天内、2天内、或者甚至1天内已经用至少一种其他治疗进行治疗的对象。对象不必对用之前的一种或多种治疗进行的预治疗有响应。因此,接受包含单一试剂或与至少一种其他免疫调节治疗组合的抗-SEMA4D结合分子,如抗体或其抗原结合片段、变体或衍生物的药物的对象可能已经对或没有对用之前的治疗进行的预治疗,或者预治疗包括多次治疗的之前的治疗中的一个或多个有响应(例如,难治的癌症)。接受包含单一试剂或与至少一种其他免疫调节治疗组合的抗-SEMA4D结合分子,如抗体或其抗原结合片段、变体或衍生物的药物的之前对象可能已经接受预治疗的其他癌症治疗的示例包括但不限于手术;放疗;化疗,其任选与自体骨髓移植组合,其中合适的化疗剂包括,但不限于,上述所列的那些;其他抗癌单克隆抗体治疗;基于小分子的癌症治疗,包括但不限于,上文所列的小分子;基于疫苗/免疫治疗的癌症治疗;类固醇治疗;其他癌症治疗;或其任意组合。

[0188] 除非另有说明,本发明的实施将采用细胞生物学、细胞培养、分子生物学、转基因生物学、微生物学、重组DNA和免疫学的常规技术,它们均在本领域技术范围内。这些技术在文献中已有充分描述。参见例如,Sambrook等编(1989)Molecular Cloning A Laboratory Manual(《分子克隆:实验室手册》)(第2版;冷泉港实验室出版社(Cold Spring Harbor Laboratory Press));Sambrook等编(1992)Molecular Cloning:A Laboratory Manual(《分子克隆:实验室手册》),(纽约州的冷泉港实验室出版社(Cold Springs Harbor Laboratory, NY));D.N.Glover编,(1985)DNA Cloning(《DNA克隆》),第I和II卷;Gait编(1984)Oligonucleotide Synthesis(《寡核苷酸合成》);Mullis等,美国专利号4,683,195;Hames和Higgins编(1984)Nucleic Acid Hybridization(《核酸杂交》);Hames和Higgins编(1984)Transcription And Translation(《转录和翻译》);Freshney(1987)Culture Of Animal Cells(《动物细胞培养》)(ARL公司(Alan R.Liss, Inc.));Immobilized Cells And Enzymes(《固定的细胞和酶》)(IRL出版社)(1986);Perbal(1984)A Practical Guide To Molecular Cloning(《分子克隆实践指南》);论文,Methods In Enzymology(《酶学方法》)(学术出版社公司(Academic Press, Inc.),纽约州);Miller和Calos编(1987)Gene Transfer Vectors For Mammalian Cells(《哺乳动物细胞的转基因载体》)(冷泉港实验室出版社(Cold Spring Harbor Laboratory));Wu等编,Methods In Enzymology(《酶学方法》),第154和155卷;Mayer和Walker编(1987)Immunochemical Methods In Cell And Molecular Biology(《细胞和分子生物学中的免疫化学方法》)(学术出版社(Academic Press),伦敦);Weir和Blackwell编(1986)Handbook Of Experimental Immunology(《实验免疫学手册》),第I-IV卷;Manipulating the Mouse Embryo(《小鼠胚胎操作》),纽约州冷泉港的冷泉港实验室出版社(Cold Spring Harbor Laboratory,Cold Spring Harbor, N.Y.),(1986);和Ausubel等(1989)Current Protocols in Molecular Biology(《新编分子生物学实验指南》)(马里兰州巴尔的摩的约翰韦利父子公司(John Wiley & Sons, Baltimore, Md.))。

[0189] 抗体工程的一般原理可参见Borrebaeck编(1995)Antibody Engineering(《抗体工程》)(第2版;牛津大学出版社(Oxford Univ. Press))。蛋白质工程的一般原理可参见Rickwood等编(1995)Protein Engineering,A Practical Approach(《蛋白质工程,实践方

法》, (英国牛津的牛津大学出版社的IRL出版公司 (IRL Press at Oxford Univ. Press, Oxford, Eng.))。抗体和抗体-半抗原结合的一般原理可参见: Nisonoff (1984) Molecular Immunology (《分子免疫学》) (第2版; 马萨诸塞州桑德兰的辛奥尔联合公司 (Sinauer Associates, Sunderland, Mass.)) ; 和Steward (1984) Antibodies, Their Structure and Function (《抗体的结构和功能》) (Chapman and Hall, 纽约州纽约市)。此外, 本领域已知且没有具体描述的免疫学标准方法通常按照下述文献所述进行: Current Protocols in Immunology (《新编免疫学实验指南》), 纽约州的约翰韦利父子公司 (John Wiley & Sons) ; Stites等编 (1994) Basic and Clinical Immunology (《基础和临床免疫学》) (第8版; Appleton和Lange, 康涅狄格州的诺沃克 (Norwalk, Conn.)) 和Mishell和Shiigi (编) (1980) Selected Methods in Cellular Immunology (《细胞免疫学的选用方法》) (W.H. 弗里曼公司 (W.H. Freeman and Co), 纽约州)。

[0190] 列出免疫学通用原理的标准参考文献包括: Current Protocols in Immunology (《新编免疫学实验指南》), 约翰韦利父子公司 (John Wiley & Sons), 纽约州; Klein (1982) J., Immunology: The Science of Self-Nonself Discrimination (《免疫学: 自身-非自身区别的科学》) (约翰韦利父子公司, 纽约州) ; Kennett等编 (1980) Monoclonal Antibodies, Hybridoma: A New Dimension in Biological Analyses (《单克隆抗体, 杂交瘤: 生物学分析的新领域》) (普莱努公司 (Plenum Press), 纽约州) ; Campbell (1984) "Monoclonal Antibody Technology" in Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology (《生化和分子生物学实验室技术》中的“单克隆抗体技术”), Burden等编 (的埃尔斯威尔公司 (Elsevere), 阿姆斯特丹) ; Goldsby等编 (2000) Kuby Immunology (《库比免疫学》) (第4版; H. 弗里曼公司 (H. Freeman&Co.)) ; Roitt等 (2001) Immunology (《免疫学》) (第6版; 伦敦: 摩兹比公司 (Mosby)) ; Abbas等 (2005) Cellular and Molecular Immunology (《细胞和分子免疫学》) (第5版; 埃尔斯威尔健康科学分公司 (Elsevier Health Sciences Division)) ; Kontermann和Dubel (2001) Antibody Engineering (《抗体工程》) (施普林格公司 (Springer Verlag)) ; Sambrook和Russell (2001) Molecular Cloning: A Laboratory Manual (《分子克隆: 实验室手册》) (冷泉港出版社 (Cold Spring Harbor Press)) ; Lewin (2003) Gene VIII (《基因VIII》) (普伦蒂斯霍尔出版社 (Prentice Hall) 2003) ; Harlow和Lane (1988) Antibodies: A Laboratory Manual (《抗体: 实验室手册》) (冷泉港出版社) ; Dieffenbach和Dveksler (2003) PCR Primer (《PCR引物》) (冷泉港出版社)。

[0191] 将上文中引用的所有参考文献以及其中引用的所有参考文献通过引用全文纳入本文。

[0192] 通过说明的方式, 而非限制性方式提供以下实施例。

## 实施例

[0193] 实施例1: 测试抗体-SEMA4D抗体在免疫活性小鼠中延迟肿瘤生长的能力

[0194] 实验设计。基本实验设计如下。0.2ml盐水中的结肠26 (Colon26) 肿瘤细胞皮下植入同系免疫活性Balb/c小鼠 ( $5 \times 10^5$ 细胞) 或免疫缺陷SCID小鼠 ( $1 \times 10^5$ 细胞) 腋下。在肿瘤移植后第2天开始用对照Ig 2B8或抗-SEMA4D Ab 67进行治疗。通过腹膜内 (IP) 注射用1.0mg (大约50mg/kg) 的各单克隆抗体每周处理小鼠2次 (n=20)。从植入后3天开始用卡尺

每周3次测量肿瘤。从第3天开始每周2次称量小鼠。当肿瘤体积达到1000mm<sup>3</sup>时处死动物。

[0195] 抗-SEMA4D治疗延迟具有活性免疫系统的小鼠中的肿瘤生长。用卡尺测量肿瘤生长并且使用测量值通过公式  $(w^2 \times 1) / 2$  来计算肿瘤体积,其中w=肿瘤的宽度,较小的测量值并且1=肿瘤的长度,单位是mm。随着时间确定平均肿瘤体积(图1A)和卡普兰-迈耶生存曲线(图1B),直至终点,其中肿瘤体积=1000mm<sup>3</sup>,如图1A和1B所示。分别使用双向方差分析(ANOVA)和对数秩分析来进行统计学分析,其显示了在Balb/c小鼠中使用抗-SEMA4D抗体的统计学显著的治疗效果。

[0196] 在Balb/c小鼠中实现了29%的肿瘤生长延迟,然而,在SCID小鼠中没有观察到治疗相关的肿瘤生长延迟。肿瘤生长延迟(TGD)定义为治疗组与对照组相比中值时间-终点(TTE) (median time-to-endpoint)的增加: %TGD- [(T-C) / C] × 100, T=治疗组的中值TTE, C=对照组的中值TTE。在处死时,用抗-SEMA4D抗体67治疗的Balb/c动物显示出原发肿瘤体积相比对照动物在统计学上显著减少( $P < 0.0001$ )。该发现显示抗-SEMA4D抗体在延迟具有活性免疫系统的小鼠中的肿瘤生长方面是有效的,但在免疫缺陷小鼠中不是。

[0197] 实施例2:测试抗-SEMA4D抗体在CD8+效应T细胞存在下延迟肿瘤生长的能力

[0198] 实验设计。结肠26肿瘤细胞皮下植入Balb/c小鼠的腋下(0.2ml盐水中 $5 \times 10^5$ 细胞)。抗-CD8消耗抗体(Clone 2.43, BioXCell)或对照大鼠Ig(Clone LTF-2, BioXCell) (150mg/kg)通过腹膜内(IP)注射在第-1、0、1、11天和此后每周给予。在第2天开始用对照Ig 2B8或抗-SEMA4D Ab 67进行治疗。通过腹膜内注射用1.0mg(大约50mg/kg)的单克隆抗体每周处理小鼠2次( $n=20$ )。从植入后3天开始用卡尺每周3次测量肿瘤。当对照组的平均肿瘤体积达到1000mm<sup>3</sup>时,对于用大鼠Ig治疗的组,第30天处死动物,对于用抗-CD8治疗的组,第25天处死动物。

[0199] 抗-SEMA4D治疗在CD8+T淋巴细胞存在下延迟肿瘤生长。用卡尺测量并且使用公式  $(w^2 \times 1) / 2$  来计算肿瘤体积,其中w=肿瘤的宽度,较小的测量值并且1=肿瘤的长度,单位是mm。使用双尾单相方差分析(ANOVA)比较抗体治疗的组和对照Ig 2B8组来确定肿瘤体积的统计学差异。平均肿瘤体积示于图2。

[0200] 也确定肿瘤生长的抑制。使用以下公式测量肿瘤生长抑制(TGI): %TGI = 1 - [(Tf - Ti) / mean (Cf - Ci)];报告的%TGI是各治疗肿瘤的%TGI的平均值。使用双尾单相方差分析(ANOVA),之后通过邓奈特多重比较检验比较抗体治疗的组和对照Ig 2B8组来确定肿瘤体积的统计学差异。在用抗-SEMA4D抗体治疗之后实现了30%的肿瘤生长抑制,然而当CD8+T细胞消耗时没有观察到治疗相关的影响。这些结果显示用抗-SEMA4D进行的肿瘤生长抑制依赖于CD8+效应T细胞的存在。

[0201] 实施例3:测试抗-SEMA4D抗体增加肿瘤浸润性淋巴细胞(TIL)的密度的能力

[0202] 实验设计。结肠26肿瘤细胞皮下植入Balb/c小鼠的腋下(0.2ml盐水中 $5 \times 10^5$ 细胞)。在第2天开始用对照Ig 2B8或抗-SEMA4D Ab 67进行治疗(50mg/kg IP,每周2次, $n=10$ )。从植入后3天开始用卡尺每周3次测量肿瘤。当对照组的平均肿瘤体积达到1000mm<sup>3</sup>时,第27天处死动物。收集包括周围的基质和皮肤的肿瘤并且在福尔马林中固定24小时,然后转移到70%乙醇中。然后处理样品用于石蜡包埋,并且从所得的块中切割5微米切片。

[0203] 使用以下方法对相邻切片进行Sema4D、CD8和CD20染色:

[0204] 对于Sema4D检测,载玻片在60°C下烘烤1小时,然后通过二甲苯和梯度乙醇浴脱石

蜡并脱水。通过用靶标修复溶液(加利福尼亚州卡皮特亚的大科公司(Dako, Carpinteria, CA))沸腾20分钟之后冷却30分钟来进行表位修复。用含0.05%吐温-20的PBS(TPBS)洗涤载玻片2次,然后通过用双酶封闭物(加利福尼亚州卡皮特亚的大科公司)封闭10分钟使内源性过氧化物酶失活。用TPBS洗涤载玻片2次,然后通过用TPBS中2.5%正常山羊血清孵育20分钟来封闭非特异性结合。在单次TPBS洗涤之后,用TPBS中2 $\mu$ g/ml的兔抗-Sema4D孵育60分钟,之后用TPBS洗涤2次。然后用Envision HRP标记的山羊抗兔聚合物(加利福尼亚州卡皮特亚的大科公司)孵育载玻片20分钟,之后用TPBS洗涤2次并用DAB+孵育5分钟(加利福尼亚州卡皮特亚的大科公司)。用哈里斯苏木精复染切片,脱色,并用自来水蓝变,脱水,并用Permount进行非水性固定。

[0205] 使用上述方法,但是使用2 $\mu$ g/ml的市售的兔多克隆抗体(Abbiotec)检测CD8。

[0206] 使用上述方法,但是使用正常驴血清用于封闭,并且使用1 $\mu$ g/ml的山羊抗-CD20一抗(圣克鲁兹公司(Santa Cruz))之后是用HRP-标记的抗山羊抗体(金桥公司(Golden Bridge))孵育20分钟来检测CD20。

[0207] 使用与Olympus IX50耦合的Retiga QICAM-12位照相机在20倍放大下对载玻片进行成像。

[0208] 抗-SEMA4D治疗增加了肿瘤浸润性免疫细胞(TIL)的频率。通过对整个肿瘤的切片进行扫描、对CD8+或CD20+肿瘤浸润性淋巴细胞(TIL)进行定量、并且然后对总肿瘤面积标准化来测量免疫细胞密度。使用来自每组9(对照Ig)或10(抗-SEMA4D Ab 67)只小鼠的切片用于分析。使用双尾未配对T检验计算CD8和CD20的统计学差异达到95%CI。

[0209] 用抗-SEMA4D抗体67治疗结肠26肿瘤导致与对照组相比,CD8+T细胞密度和CD20+T细胞密度同时增加。CD20+T细胞密度的增加统计学上显著达到95%,P值为0.0388。CD8+T细胞密度的增加显示出一种趋势,但不是统计学上显著的。这些发现表明对结肠26肿瘤的抗-SEMA4D治疗导致肿瘤浸润性免疫细胞的频率增加。结果示于图3A和3B。

[0210] 实施例4:测试抗-SEMA4D抗体影响肿瘤前缘处CD8+T细胞与M1和M2巨噬细胞亚组的分布和迁移。

[0211] 抗-SEMA4D治疗改变了肿瘤前缘处的巨噬细胞和CD8+T细胞分布。通过扫描整个肿瘤的切片、定量M1(用2 $\mu$ g/ml的Alexa647偶联的大鼠抗-F4/80(白乐津公司(Biolegend),克隆BM8)染色)和M2(用2 $\mu$ g/ml的生物素偶联的大鼠抗-CD206(白乐津公司,克隆C068C2)染色)的面积、并且然后对总肿瘤面积标准化以确定肿瘤内的M1和M2密度来测量巨噬细胞分布。使用来自每组9(对照Ig)或10(抗-SEMA4D Ab 67)只经治疗小鼠的切片用于分析。为了确定肿瘤生长前端的细胞密度,从肿瘤的边缘定义300像素宽度的区域(250微米)。使用克-瓦二氏检验和邓奈特事后检验的单相ANOVA计算M1和M2的统计学显著性达到95%CI。标准化至肿瘤前缘的M1巨噬细胞的密度变化是显著的。

[0212] 在用抗CD8抗体(1:250的Abbiotec批号250596)和DAB检测系统染色的全肿瘤切片中测量CD8+T细胞数量。在使用Imagepro软件对阳性信号阈值化之后对全肿瘤切片中CD8+事件的数量进行计数。通过将CD8+事件的数量除以全肿瘤像素免疫来计算各动物的CD8+密度。个体CD8密度经平均化以得到2B8和mAb67治疗的动物(n=10)中的CD8+T细胞分布。使用克-瓦二氏检验和邓奈特事后检验的单相ANOVA计算统计学显著性达到95%CI。

[0213] 通过用针对与Ab 67所识别的不同的表位的抗体扫描SEMA4D染色的整个肿瘤并分

析Sema4D分布来测量SEMA4D分布。使用来自每组9(对照Ig)或10(抗-SEMA4D Ab 67)只经治疗小鼠的切片用于分析。

[0214] 当在体外培养时,结肠26肿瘤细胞表达低水平的SEMA4D,但是在体内肿瘤的前缘处表达上调的SEMA4D。这导致在肿瘤外周建立高浓度的SEMA4D表达梯度。用抗-SEMA4D抗体治疗中和SEMA4D并且破坏了该表达梯度。这导致巨噬细胞迁移和分布的明显变化,如图4A所示。具体地,用抗-SEMA4D Ab 67治疗的肿瘤在肿瘤的前缘处具有较高水平的M1+促炎性巨噬细胞,如图4B所示。M1+巨噬细胞的增加是统计学上显著的。用抗-SEMA4D Ab 67治疗的肿瘤也显示在肿瘤的前缘处促肿瘤M2巨噬细胞频率的下降,如图4C所示。这些发现显示用抗-SEMA4D Ab 67治疗以在肿瘤前缘处增加肿瘤抑制性巨噬细胞(即M1)的密度,同时在相同区域中减少肿瘤促进巨噬细胞(即M2)的存在的方式改变巨噬细胞分布。此外,这些发现显示从MAb 67-治疗的小鼠中分离的肿瘤内的CD8+T细胞密度的总体增加,如图4D所示。这些发现表明用MAb 67-2中和SEMA4D促使抗肿瘤M1巨噬细胞进入高度增殖的肿瘤细胞区域中和CD8+T细胞通过该区域并延伸到前缘中(小图)。

[0215] 实施例5:测试抗-SEMA4D抗体与抗-CTLA4抗体联用时延迟小鼠中肿瘤生长的能力

[0216] 实验设计。 $5 \times 10^5$ 结肠26肿瘤细胞皮下植入雌性Balb/c小鼠的腋下。在接种后1天开始用对照小鼠IgG1/2B8或抗-SEMA4D/MAb 67-2,与或不与抗-CTLA4/MAb UC10-4F10-11(肿瘤接种后第8天100 $\mu$ g,第11天和第14天50 $\mu$ g)结合治疗(50mg/kg,IP,每周5次)。在接种后1天开始用抗-PD1/RMP1-14(第3天100 $\mu$ g,每周2次)与抗-CTLA4/MAb UC10-4F10-11结合治疗。每组有20只小鼠。从植入后5天开始用卡尺每周2次测量肿瘤。当肿瘤体积达到1000mm<sup>3</sup>时处死动物。

[0217] 抗-SEMA4D和抗-CTLA4抗体的组合延迟小鼠中肿瘤生长。用卡尺测量肿瘤生长并且使用测量值通过公式 $(w^2 \times 1) / 2$ 来计算肿瘤体积,其中w=肿瘤的宽度,较小的测量值并且1=肿瘤的长度,单位是mm。随着时间确定平均肿瘤体积和卡普兰-迈耶生存曲线,直至终点,其中肿瘤体积=1000mm<sup>3</sup>,分别如图5A和5B所示。分别使用双相方差分析(ANOVA)和对数秩分析来进行统计学分析,其显示用抗-SEMA4D抗体(9%肿瘤生长延迟,TGD\*\*)和抗-CTLA4抗体(2%TGD.ns)的统计学上显著的治疗效果,以及用抗-SEMA4D和抗-CTLA4抗体(最大TGD,114%\*\*\*\*)的组合的高度显著的肿瘤生长延迟增加。响应可持续至少60天。

[0218] 也确定的结肠26肿瘤模型中肿瘤消退的频率。消退是缺少可触摸的肿瘤,定义为肿瘤测量<50mm<sup>3</sup>,基于至少2次连续测量。如图5C所示,抗-SEMA4D和抗-CTLA4抗体的组合增加了结肠26肿瘤模型中消退的数量。如菲希尔精确检验所确定,与对照Ig( $p < 0.0001$ )和抗-CTLA4或抗-SEMA4D单一治疗( $p = 0.0022$ )相比,组合治疗(抗-SEMA4D+抗-CTLA4抗体)的消退是统计学上显著的。重要的是,这些发现显示抗-SEMA4D和抗-CTLA4抗体的组合有协同性:即组合比单独用抗-SEMA4D抗体或抗-CTLA4抗体治疗明显更有效,导致增加的可持续肿瘤消退频率。此外,这些结果证明抗-SEMA4D和抗-CTLA4抗体的组合与抗-PD1和抗-CTLA4的组合至少一样有效,或者更有效。

[0219] 还证明了用抗-SEMA4D抗体治疗增加了肿瘤反应性CTL活性,并且也增加抗-CTLA4-介导的CTL活性。进行随访研究以检验抗-CTLA单一治疗与抗-CTLA4和抗-SEMA4D组合治疗相比对肿瘤特异性肿瘤浸润性淋巴细胞(TIL)的频率和促炎性细胞因子分泌的影响。在该随访研究中,从用对照IgG1/MAb2B8、抗-CTLA4/MAbUC10-4F10、或抗-CTLA4/

MAbUC10-4F10和抗-SEMA4D/MAb67的组合体内治疗的携带结肠26肿瘤的小鼠的脾和肿瘤中分离免疫细胞。在第15天收获组织,这是最后的抗-CTLA4抗体剂量之后并刚好在肿瘤消退之前的1天。评价总CD45+TIL的分泌的细胞因子水平,并且通过ELISPOT确定MHC-I-限制的结肠26肿瘤-特异性优势免疫gp70肽存在下的IFNg分泌CD8+T的频率。通过从含肽的孔中减去介质对照来计算MHC I特异性应答的频率。

[0220] 如图5D所示,在用抗-CTLA4抗体单一治疗治疗的小鼠的肿瘤中观察到增加的促炎性细胞因子IFNg的水平( $p=0.0135$ ),其在用抗-CTLA4和抗-SEMA4D的组合疗法治疗之后进一步并显著增强(与对照或单一治疗相比 $p=0.0002$ )。在图5E中,在用抗-CTLA4抗体治疗的小鼠的脾中观察到增加的肽特异性IFNg分泌响应频率。期望该发现,因为抗-CTLA4经报道诱导外周的T细胞激活。没有发现抗-CTLA4和抗-SEMA4D的组合治疗进一步增强脾中的活性。相反,在用抗-CTLA4单一疗法治疗后TIL中观察到肽特异性IFNg分泌响应频率的明显增加,其在用抗-CTLA4和抗-SEMA4D组合疗法治疗之后得到进一步显著增强。这一发现表明加入抗-SEMA4D治疗可以局部肿瘤特异性的方法显著改善肿瘤特异性CD8+T细胞活性。

[0221] 实施例6:测试抗-SEMA4D抗体影响肿瘤特异性细胞毒性CD8+T细胞的肿瘤浸润的能力

[0222] Mab 67-2治疗增加了肿瘤特异性TIL的频率和促炎性细胞因子的分泌。在4周的体内抗-SEMA4D治疗之后,通过磁性分离解离肿瘤并富集CD45+细胞。在存在和不存在优势免疫肿瘤肽AH-1下孵育各种细胞密度的从5只小鼠收集的CD45+TIL。通过ELISPOT测量IFN  $\gamma$  分泌细胞;通过减去不含肽的孔的平均值来确定肽特异性响应。各样品重复测试6次并如上绘图。使用曼-惠特尼非参数t检验来确定统计学显著性。

[0223] 图6A显示在存在或缺失肽的情况下Mab 67-2治疗的小鼠中观察到IFN  $\gamma$  分泌细胞的增加。CD45+TIL,尤其是MHC-I-限制的肽特异性CD8+细胞毒性T细胞,代变用Mab 67-2治疗之后激活的效应细胞。图6B显示代表性ELISPOT图像。然后离体培养CD45+TIL持续48小时并且使用CBA分析测试细胞因子分泌。如图6C所示,Mab 67-2促进了TIL中抗肿瘤细胞因子,如IFN  $\gamma$  和TNF $\alpha$ 的分泌。使用曼-惠特尼非参数t检验来确定统计学显著性。

[0224] 进行随访研究来检验MAb 67-2治疗对肿瘤特异性肿瘤浸润性淋巴细胞(TIL)的频率和促炎性细胞因子分泌的影响。在该随访研究中,从用对照IgG1/MAb2B8或抗-SEMA4D/MAb67体内治疗的携带结肠26肿瘤的小鼠的肿瘤中分离免疫细胞。评价总CD45+TIL的分泌的细胞因子水平,并且通过ELISPOT确定MHC-I-限制的结肠26肿瘤-特异性优势免疫gp70肽存在下的IFNg分泌CD8+T的频率。通过从含肽的孔中减去介质对照来计算MHC I特异性应答的频率。

[0225] 如图6D所示,在用抗-SEMA4D抗体治疗的小鼠的TIL中观察到增加水平的促炎性细胞因子IFNg和TNF $\alpha$ 。此外,如图5E所示,在用抗-SEMA4D抗体治疗的小鼠的TIL中观察到增加的肽特异性IFNg分泌响应频率。这一发现表明加入抗-SEMA4D治疗可以局部肿瘤特异性的方法显著改善肿瘤特异性CD8+T细胞活性。

[0226] 实施例7:测试抗-SEMA4D抗体与抗-PD1抗体联用时延迟小鼠中肿瘤生长的能力

[0227] 实验设计。 $5 \times 10^5$ 结肠26肿瘤细胞皮下植入雌性Balb/c小鼠的腋下。从接种后1天开始用对照小鼠IgG1/2B8或抗-SEMA4D/MAb 67-2的治疗(50mg/kg, IP, 每周一次)。还用对照大鼠-Ig或大鼠抗-PD1/MAbRMP1-14治疗各组小鼠(100 $\mu$ g, 每周2次, 从接种后3天开始2

周)。每组有20只小鼠。从植入后5天开始用卡尺每周3次测量肿瘤。当肿瘤体积达到1000mm<sup>3</sup>时处死动物。

[0228] 抗-SEMA4D和抗-PD1抗体的组合延迟小鼠中肿瘤生长。用卡尺测量肿瘤生长并且使用测量值通过公式  $(w^2 \times 1)/2$  来计算肿瘤体积, 其中  $w$ =肿瘤的宽度, 较小的测量值并且  $1$ =肿瘤的长度, 单位是mm。随着时间确定平均肿瘤体积和卡普兰-迈耶生存曲线, 直至终点, 其中肿瘤体积=1000mm<sup>3</sup>, 分别如图7A和7B所示。分别使用双向方差分析 (ANOVA) 和对数秩分析来进行统计学分析, 其显示了在Balb/c小鼠中使用抗-SEMA4D抗体与抗-PD1抗体的组合的统计学显著的治疗效果。这些发现显示抗-SEMA4D和抗-PD1抗体的组合比单独用抗-SEMA4D或用抗-PD1抗体的治疗更有效。

[0229] 也测量了结肠26肿瘤模型中的消退频率并且如图7C和7D所示。消退是缺少可触摸的肿瘤, 定义为肿瘤测量<50mm<sup>3</sup>, 基于至少2次连续测量。抗-SEMA4D和抗-PD1抗体的组合增加了结肠26肿瘤模型中的消退数量。如菲希尔精确检验所确定, 与对照Ig ( $p=0.0083$ ) 或单一试剂抗-PD-1 ( $p=0.02$ ) 相比, 组合治疗 ( $\alpha$ SEMA4D+ $\alpha$ PD1抗体) 的消退是统计学显著的。

[0230] 实施例8: 测试抗-SEMA4D抗体与环磷酰胺联用时延迟小鼠中肿瘤生长的能力

[0231] 实验设计。 $5 \times 10^5$ 结肠26肿瘤细胞皮下植入雌性Balb/c小鼠的腋下。从接种后1天开始用对照小鼠IgG1/2B8或抗-SEMA4D/MAb 67-2的治疗 (50mg/kg, IP, 每周一次)。在第12天和第20天给予环磷酰胺治疗 (50mg/kg, IP)。每组有20只小鼠。从植入后5天开始用卡尺每周3次测量肿瘤。当肿瘤体积达到1000mm<sup>3</sup>时处死动物。

[0232] 抗-SEMA4D抗体和环磷酰胺的组合延迟小鼠中肿瘤生长。用卡尺测量肿瘤生长并且使用测量值通过公式  $(w^2 \times 1)/2$  来计算肿瘤体积, 其中  $w$ =肿瘤的宽度, 较小的测量值并且  $1$ =肿瘤的长度, 单位是mm。随着时间确定平均肿瘤体积、中值肿瘤体积和卡普兰-迈耶生存曲线, 直至终点, 其中肿瘤体积=1000mm<sup>3</sup>, 分别如图8A、8B和8C所示。分别使用双向方差分析 (ANOVA) 和对数秩分析来进行统计学分析, 其显示了在Balb/c小鼠中使用抗-SEMA4D抗体和环磷酰胺的组合的统计学显著的治疗效果。

[0233] 具体地, 该发现显示当抗-SEMA4D抗体与环磷酰胺联用时232%的肿瘤生长延迟 (TGD)。如MC对数秩分析所确定, 该发现相比对照Ig是统计学上显著的 ( $p<0.0001$ )。如MC对数秩分析所确定, 当单独使用抗-SEMA4D抗体治疗时也有3%TGD (与对照Ig相比是统计学显著的 ( $p=0.0282$ )) 并且当单独使用环磷酰胺时有96%TGD (与对照Ig相比是统计学显著的 ( $p<0.0001$ ))。响应可持续至少81天。这些发现显示抗-SEMA4D抗体与环磷酰胺的组合在延迟肿瘤生长方面比单独用抗-SEMA4D抗体或环磷酰胺治疗更有效。

[0234] 也测量了结肠26肿瘤模型中的消退频率并且如图8D和8E所示。消退是缺少可触摸的肿瘤, 定义为肿瘤测量<50mm<sup>3</sup>, 基于至少2次连续测量。抗-SEMA4D抗体和环磷酰胺的组合增加了结肠26肿瘤模型中的消退数量。如菲希尔精确检验所确定, 与对照Ig相比, 组合治疗 ( $\alpha$ SEMA4D抗体+环磷酰胺) 的消退是统计学显著的 ( $p<0.003$ )。这些数据证明环磷酰胺与抗-SEMA4D抗体组合时有增加的功效和响应。

[0235] 实施例9: 测试抗-SEMA4D抗体与抗-HER2/neu抗体联用时延迟小鼠中肿瘤生长的能力

[0236] 实验设计。 $3 \times 10^4$ Tubo.A5肿瘤细胞皮下植入雌性Balb/c小鼠的乳腺脂肪垫中。从接种后7天开始用对照小鼠IgG1/2B8.1E7或抗-SEMA4D/MAb 67-2的治疗 (50mg/kg, IP, 每周

6次)。用抗-Neu/MAb7.16.4治疗(200 $\mu$ g, IP, 每周2次, 从肿瘤体积为约200mm<sup>3</sup>时开始, 第21天和第28天)。每组有15只小鼠。从植入后11天开始用卡尺每周2次测量肿瘤。当肿瘤体积达到800mm<sup>3</sup>时处死动物。

[0237] 抗-SEMA4D和抗-HER2/Neu抗体的组合延迟小鼠中肿瘤生长。用卡尺测量肿瘤生长并且使用测量值通过公式( $w^2 \times 1$ ) / 2来计算肿瘤体积, 其中w=肿瘤的宽度, 较小的测量值并且1=肿瘤的长度, 单位是mm。随着时间确定平均肿瘤体积和卡普兰-迈耶生存曲线, 直至终点, 其中肿瘤体积=800mm<sup>3</sup>, 分别如图9A和9B所示。分别使用双向方差分析(ANOVA)和对数秩分析来进行统计学分析, 其显示了在Balb/c小鼠中使用抗-SEMA4D抗体与抗-Her2/Neu抗体的组合的统计学显著的处理效果。该发现显示当抗-SEMA4D抗体与抗-Neu抗体联用时有48%的肿瘤生长延迟, 并且这与使用无关对照抗体( $p=0.017$ )或抗-Neu单一治疗( $p=0.006$ )相比是统计学显著的, 如MC对数秩分析所确定。

[0238] 也测量Tubo肿瘤模型中肿瘤消退的频率并示于图9C。消退是缺少可触摸的肿瘤, 定义为肿瘤测量<50mm<sup>3</sup>, 基于至少2次连续测量。抗-SEMA4D和抗-Neu抗体的组合增加了携带Tubo的小鼠中的消退数量。如菲希尔精确检验所确定, 与对照Ig相比, 组合治疗( $\alpha$ SEMA4D +  $\alpha$ Neu抗体)的消退是统计学显著的( $p=0.016$ )。

[0239] 实施例10: 测试抗-SEMA4D抗体延迟体内乳腺癌模型的生长的能力

[0240] 实验设计。 $3 \times 10^4$ Tubo.A5肿瘤细胞皮下植入雌性Balb/c小鼠的乳腺脂肪垫中。从接种后6天开始用对照小鼠IgG1/2B8.1E7或抗-SEMA4D/MAb 67-2的治疗(50mg/kg, IP, 每周6次)。每组有20只小鼠, 然而, 一些小鼠由于在到达终点之前因溃疡或一般疾病过早死亡而排除在分析以外。从植入后13天开始用卡尺每周2次测量肿瘤。当肿瘤体积达到800mm<sup>3</sup>时处死动物。

[0241] 抗-SEMA4D抗体治疗延迟小鼠中肿瘤生长。用卡尺测量肿瘤生长并且使用测量值通过公式( $w^2 \times 1$ ) / 2来计算肿瘤体积, 其中w=肿瘤的宽度, 较小的测量值并且1=肿瘤的长度, 单位是mm。随着时间确定平均肿瘤体积和卡普兰-迈耶生存曲线, 直至终点, 其中肿瘤体积=800mm<sup>3</sup>, 分别如图10A和10B所示。分别使用双向方差分析(ANOVA)和对数秩分析来进行统计学分析, 其显示了使用抗-SEMA4D抗体的统计学显著的治疗效果。该发现显示用抗-SEMA4D抗体治疗的最大肿瘤生长延迟(133%);这与使用无关对照抗体( $p<0.0001$ )相比是统计学上显著的, 如MC对数秩分析所确定。

[0242] 也测量Tubo.A5肿瘤模型中肿瘤消退的频率并示于图10C-10E。消退是缺少可触摸的肿瘤, 定义为肿瘤测量<50mm<sup>3</sup>, 基于至少2次连续测量。在植入后第90天, 与用对照Ig治疗的小鼠中0/14的消退相比, 85% (12/14)的MAb67-治疗的小鼠是无肿瘤的消退者, 并且14只中的一只从未发展出可测量的肿瘤。在第90天, 在对侧用活性Tubo.A5(30000)攻击已经完全排除其原发肿瘤的小鼠(MAb67-治疗的小鼠中13/14);包括原初小鼠用作移植对照。如图10D所示, 用抗-SEMA4D治疗的全部13只小鼠排除了后续的肿瘤攻击, 表明免疫记忆响应, 与图10E所示的不排除肿瘤攻击的原初小鼠相反。如菲希尔精确检验所确定, 与对照Ig相比, 消退频率是统计学显著的( $p<0.0001$ )。

[0243] 实施例11: 抗-SEMA4D抗体对Tubo.A5肿瘤模型中MDSC和T细胞浸润的影响

[0244] 实验设计。将Tubo.A5肿瘤植入同源BALB/c小鼠中。在第6天开始用对照Ig或抗-SEMA4D MAb 67进行治疗(50mg/kg, IP, 每周一次)。紧临肿瘤消退之前, 在第39天收获肿瘤。

对从14-21只小鼠/组的肿瘤中收集的淋巴细胞组分进行FACS。显示了试验重复的平均值；使用双尾t-检验确定显著性。

[0245] 如图11A和11B所示,抗-SEMA4D抗体治疗在用抗-SEMA4D治疗的小鼠的肿瘤中增加了CD3+T细胞浸润并且减少了CD11b+Gr1+MDSC。这些数据表明抗致瘤性T细胞响应的增加和免疫抑制细胞如MDSC的减少。这些数据与结肠26模型中观察到的免疫平衡调节相一致。

[0246] 实施例12:Tubo.A5和结肠26肿瘤模型中Mab 67的剂量滴定

[0247] Tubo.A5肿瘤模型的实验设计。 $3 \times 10^4$  Tubo.A5肿瘤细胞皮下植入雌性Balb/c小鼠的乳腺脂肪垫中。在接种后6天开始用对照小鼠IgG1/2B8.1E7治疗(50mg/kg, IP每周6次)或抗-SEMA4D/MAb 67-2(1、10或50mg/kg, IP, 每周6次)。每组有至少20只小鼠,然而,一些小鼠由于在到达终点之前由于溃疡或一般疾病过早死亡而排除在分析以外。从植入后13天开始用卡尺每周2次测量肿瘤。当肿瘤体积达到 $800\text{mm}^3$ 时处死动物。

[0248] 结肠26肿瘤模型的实验设计。 $5 \times 10^5$  结肠26肿瘤细胞皮下植入雌性Balb/c小鼠的腋下。在接种后1天开始用对照小鼠IgG1/2B8.1E7(50mg/kg, IP, 每周5次)或抗-SEMA4D/MAb 67-2(0.3、3、10或50mg/kg, IP, 每周5次),与或不与抗-CTLA4/MAb UC10-4F10-11(肿瘤接种后第8天 $100\mu\text{g} \sim 5\text{mg}/\text{kg}$ , 第11天和第14天 $50\mu\text{g} \sim 2.5\text{mg}/\text{kg}$ )结合治疗。每组有15只小鼠。从植入后5天开始用卡尺每周2次测量肿瘤。当肿瘤体积达到 $\geq 1000\text{mm}^3$ 时处死动物。

[0249] 最小有效剂量是约3mg/kg。与对照IgG相比,用50或10mg/kg MAb67治疗Tubo.A5肿瘤导致统计学显著的肿瘤生长延迟(分别p<0.0001和d p=0.0015),但是彼此没有显著差异。用50或10mg/kg MAb67治疗的Tubo.A5肿瘤中38% (9/24) 和54% (6/13) 的消退频率也是显著的(p=0.0069和p=0.0014)相反,1mg/kg Mab67是无效的并且不显著延迟肿瘤生长(p=0.01441)。在该模型中,确定最小有效剂量为1至10mg/kg。用卡尺测量肿瘤生长并且使用测量值通过公式 $(w^2 \times 1)/2$ 来计算肿瘤体积,其中w=肿瘤的宽度,较小的测量值并且1=肿瘤的长度,单位是mm。随着时间确定平均肿瘤体积和卡普兰-迈耶生存曲线,直至终点,其中肿瘤体积= $800\text{mm}^3$ ,分别如图12A和12B所示。分别使用双相方差分析(ANOVA)和对数秩分析来进行统计学分析。

[0250] 在结肠26模型中研究有效Mab67剂量的进一步精修并且确定为 $\geq 3\text{mg}/\text{kg}$ 。与抗-CTLA4单一治疗相比,当抗-SEMA4D/MAb 67的剂量 $\geq 3\text{mg}/\text{kg}$ 时用抗-CTLA4+抗-SEMA4D治疗结肠26肿瘤得到最大肿瘤生长延迟(119%)；与抗-CTLA1单一治疗相比,在10mg/kg MAb67处p=0.0101并且在3mg/kg处p=0.0571,使用MC对数秩分析确定。3-50mg/kg之间的所有剂量彼此没有显著差异。相反,当抗-CTLA4与0.3mg/kg MAb67组合给予时,差异与用10mg/kg MAb 67治疗相比(p=0.0325)在统计学上不同,但是与用抗-CTLA4单一治疗相比差异不显著(p=0.4945)。用卡尺测量肿瘤生长并且使用测量值通过公式 $(w^2 \times 1)/2$ 来计算肿瘤体积,其中w=肿瘤的宽度,较小的测量值并且1=肿瘤的长度,单位是mm。随着时间确定平均肿瘤体积和卡普兰-迈耶生存曲线,直至终点,其中肿瘤体积= $1000\text{mm}^3$ ,分别如图12C和12D所示。分别使用双相方差分析(ANOVA)和对数秩分析来进行统计学分析。

[0251] 实施例13:抗-SEMA4D抗体在延迟结肠26和Tubo.A5肿瘤模型中肿瘤生长的作用

[0252] 实验设计。图13是上述实施例中进行的实验的总结,这些实施例显示在结肠26和Tubo.A5肿瘤模型中进行肿瘤重新攻击之后的肿瘤消退和生长。上述实施例中总结了各实验的实验设计。

[0253] 抗-SEMA4D抗体治疗导致完全和可持续的肿瘤消退。如图13所示,与在结肠26和Tubo.A5模型中用对照小鼠IgG1治疗相比时,用抗-SEMA4D抗体疗法治疗导致在肿瘤消退的统计学显著增加,分别达7% ( $P \leq 0.001***$ ) 和85% ( $P \leq 0.0001****$ )。此外,用抗-SEMA4D抗体疗法治疗并不与单独使用抗-PD1治疗显著不同(单独用抗-SEMA4D的7%对比单独用抗-PD1的8%,n.s.) ,但是当与抗-PD1治疗联用时显著增强(组合疗法的28%对比抗-SEMA4D单一治疗的7%或抗-PD1单一治疗的8%, $P \leq 0.0001****$ )。此外,与单独用抗-CTLA4治疗相比,用抗-SEMA4D抗体疗法与抗-CTLA4疗法的组合治疗导致肿瘤消退的统计学显著增加(组合治疗的74%对比抗-CTLA4单一治疗的20%, $P \leq 0.0001****$ )。另外,与用抗-SEMA4D和抗-PD1组合治疗相比,用抗-SEMA4D抗体疗法与抗-CTLA4疗法的组合治疗导致肿瘤消退的统计学显著增加(抗-SEMA4D/抗-CTLA4组合治疗的74%对比抗-SEMA4D/抗-PD1组合治疗的60%, $P \leq 0.001***$ )。与抗-SEMA4D和抗-PD1的组合相比抗-SEMA4D和抗-CTLA4的组合的更大表观协同性表明不是所有的免疫检查点阻滞抑制剂在这方面是等价的并且机理的差异可能与不同的治疗益处相关。最后,与单独用环磷酰胺治疗相比,用抗-SEMA4D抗体疗法与环磷酰胺的组合治疗导致肿瘤消退的统计学显著增加(组合治疗的40%对比环磷酰胺单一治疗的10%, $P \leq 0.01****$ )。

[0254] 通过以上描述和相关图所示内容,本发明相关领域技术人员可以想到本发明的许多改良和其它的实施方式。因此,应当理解本发明不仅限于所公开的具体实施方式,所述改良和其它实施方式也包括在所附权利要求书和所列实施方式的范围之内。尽管在本发明中使用了具体的术语,但是这些术语仅以通用和描述性意义使用,而不同于对本发明构成限制。

## 序列表

<110> E·E· 埃文斯 (Evans, Elizabeth E.)  
 E·S· 史密斯 (Smith, Ernest S.)  
 M· 左德勒 (Zauderer, Maurice)  
 <120> 脑信号蛋白-4D抑制分子与免疫调节治疗联用以抑制肿瘤生长和转移的应用  
 <130> 58008-133124  
 <140> 待分配  
 <141> 随同文件  
 <150> 61/907845  
 <151> 2013-11-22  
 <150> 61/884771  
 <151> 2013-09-30  
 <150> 61/874241  
 <151> 2013-09-05  
 <150> 61839170  
 <151> 2013-06-25  
 <160> 48  
 <170> PatentIn version 3.3  
 <210> 1  
 <211> 862  
 <212> PRT  
 <213> 智人 (Homo sapiens)  
 <400> 1  
 [0001] 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 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  
 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 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 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

[0002] 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  
 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 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  
 465 470 475 480

Lys Lys Gly Asn Arg Phe Val Tyr Ala Gly Ser Asn Ser Gly Val Val  
 485 490 495

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  
 545 550 555 560

Tyr Arg Gln His Phe Phe Lys His Gly Gly Thr Ala Glu Leu Lys Cys  
 565 570 575

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

[0003] 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 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 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 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

<210> 2

<211> 861

<212> PRT

<213> 鼠 (Murine 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

[0004]

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  
165 170 175

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 Gln Lys Ser Pro Asp Gly Pro  
 210 215 220

Glu Gly Glu Asp Asp Lys Val Tyr 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 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

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

[0005]

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

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
---	-----	-----	-----	-----

[0006]

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	725	730	735
---	-----	-----	-----

Ser Leu Leu Leu Phe Ile Phe Val Leu Phe Leu Cys Leu Phe Ser Tyr	740	745	750
---	-----	-----	-----

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

Ala Leu Leu Leu Gly Lys Lys Thr Pro Lys Ser Asp Phe Ser Asp Leu	770	775	780
---	-----	-----	-----

Glu Gln Ser Val Lys Glu Thr Leu Val Glu Pro Gly Ser Phe Ser Gln
---

785	790	795	800
-----	-----	-----	-----

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

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

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

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

<210> 3

<211> 30

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 多核苷酸抗-CD100 VH CDR1

<400> 3

ggctacagct tcagegacta ctacatgcac

30

<210> 4

<211> 51

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 多核苷酸抗-CD100 VH CDR2

<400> 4

cagattaatc ctaccactgg cggcgctagc tacaaccaga agttcaaggg c

51

<210> 5

<211> 27

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 多核苷酸抗-CD100 VH CDR3

<400> 5

tattactacg gcagacactt cgatgtc

27

<210> 6

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 多核苷酸抗-CD100 VH CDR1

<400> 6

Gly Tyr Ser Phe Ser Asp Tyr Tyr Met His
1 5 10

<210> 7

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 多核苷酸抗-CD100 VH CDR2

&lt;400&gt; 7

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

Gly

&lt;210&gt; 8

&lt;211&gt; 9

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 多核苷酸抗-CD100 VH CDR3

&lt;400&gt; 8

Tyr	Tyr	Tyr	Gly	Arg	His	Phe	Asp	Val
1			5					

&lt;210&gt; 9

&lt;211&gt; 118

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 多核苷酸抗-CD100 VH 2503

&lt;400&gt; 9

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

[0008]

Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Ser	Phe	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				

&lt;210&gt; 10

&lt;211&gt; 118

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 多核苷酸抗-CD100 VH 67

&lt;400&gt; 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

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

<210> 11  
 <211> 45  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

[0009] <220>  
 <223> 多核苷酸抗-CD100 VL CDR1

<400> 11  
 aaggccagcc aaagcgtgga ttatgatggc gatacgatata tgaac 45

<210> 12  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 多核苷酸抗-CD100 VL CDR2

<400> 12  
 gctgcatcca atctggaaag c 21

<210> 13  
 <211> 27  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 多核苷酸抗-CD100 VL CDR3

<400> 13  
 cagcaaagca atgaggatcc ctacacc 27

<210> 14  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 多核苷酸抗-CD100 VL CDR1

<400> 14

Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Asp Gly Asp Ser Tyr Met Asn  
1 5 10 15

<210> 15

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 多核苷酸抗-CD100 VL CDR2

<400> 15

Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser  
1 5

<210> 16

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 多核苷酸抗-CD100 VL CDR3

<400> 16

Gln Gln Ser Asn Glu Asp Pro Tyr Thr  
1 5

<210> 17

<211> 111

<212> PRT

[0010] <213> 人工序列

<220>

<223> 多核苷酸抗-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 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

<210> 18

<211> 111

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 多核苷酸抗-CD100 VL 67

<400> 18

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 Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile His  
65 70 75 80

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

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

<210> 19

<211> 354

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 多核苷酸抗-CD100 VH 2503

<400> 19

caggtgcagc tggcagag cggcgctgag gtgaagaagc ctggcagcag cgtgaaggc 60

tctgcagg ctgcggcta cagttcagc gactactaca tgcactgggt gagacaggcc 120

cctggccaag gcctggagt gatggccag attaattccta ccactgggg cgctagctac 180

aaccagaagt tcaaggccaa ggccaccatt accgtggaca aaagcaccag cacagcctac 240

atggagctga gcagcctgag aagcgaggac accggcggtt attactgtgc cagatattac 300

tacggcagac acttcgatgt ctggggccaa ggcaccacgg tcaccgttc ttca 354

<210> 20

<211> 354

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 多核苷酸抗-CD100 VH 67

<400> 20

caggtccagc tgcagcagtc tggacctgag ctggtaagc ctggggcttc agtgaagata 60

tctgcagg cttctggta ctcattcagt gactactaca tgcactgggt gaagcaaagt 120

cctgaaaata gtcttgagt gattggacag attaattccta ccactgggg tgctagctac 180

aaccagaagt tcaaggccaa ggccacattt actgttagata aatcctccag cacagcctac 240

atgcagctca agacgcgtac atctgaagag tctgcgtt attactgtac aagatattac 300

tacggtagac	acttcgatgt	ctggggccaa	gggaccacgg	tcaccgttcc	ctca	354
<210>	21					
<211>	333					
<212>	DNA					
<213>	人工序列					
<220>						
<223>	多核苷酸抗-CD100 VL 2503					
<400>	21					
gacatcgta	tgaccagag	ccagacagc	ctggctgtga	gcctggcga	gagggccacc	60
atcaactgca	aggccagcca	aagcggtggat	tatgtatggcg	atagctatat	gaactggta	120
cagcagaaac	caggccagcc	tcctaagctg	ctgatattacg	ctgcatccaa	tctggaaagc	180
ggcgtgcctg	acagattcag	cggcagcggc	agcggcacag	atttcacctt	gaccatcage	240
acgctcgagg	ctgaagatgt	ggcagtgtat	tactgtcagc	aaagcaatga	ggatccctac	300
acattcgccc	aagggaccaa	gctcgagatc	aaa			333
<210>	22					
<211>	333					
<212>	DNA					
<213>	人工序列					
<220>						
<223>	多核苷酸抗-CD100 VL 67					
<400>	22					
gacattgtga	tgaccagtc	tccagttct	ttggctgtgt	ctctaggcga	gagggccacc	60
atccctgca	aggccagcca	aagtgttgat	tatgtatggtg	atagtttat	gaactggta	120
caacagaaac	caggacagcc	acccaaactc	ctcatctatg	ctgcatccaa	tctagaatct	180
gggatcccag	ccaggtttag	tggcagtggg	tctggacag	acttcaccc	caacatccat	240
cctgtggagg	aggaggatgc	tgcaacctat	tactgtcagc	aaagtaatga	ggatccgtac	300
acgctcgagg	gggggaccaa	gctcgagatc	aaa			333
<210>	23					
<211>	2586					
<212>	DNA					
<213>	智人 (Homo sapiens)					
<400>	23					
atgaggatgt	gcaccccat	taggggctg	ctcatggccc	ttgcagtgtat	gtttgggaca	60
gcatggcat	ttgcacccat	acccggatc	acctgggagc	acagagaggt	gcacctgggt	120
cagtttcatg	agccagacat	ctacaactac	tcagccttgc	tgctgagcga	ggacaaggac	180
acattgtaca	taggtccccg	ggaggcggtc	ttcgctgtga	acgcactcaa	catctcccg	240
aagcgcgt	aggtgtattt	gaaggctca	gaagacaaaa	aagcaaaatg	tgcagaaaaag	300
ggaaatcaa	aacagacaga	gtgcctcaac	tacatccgg	tgctgcagcc	actcagegcc	360
actcccttt	acgtgtgtgg	gaccaacgca	ttccagccgg	cctgtgacca	cctgaaactta	420
acatcctta	agtttctggg	gaaaaatgaa	gatggcaaag	gaagatgtcc	ctttgaccca	480
gcacacagct	acacatccgt	catggttgat	ggagaacttt	attcgggac	gtcgtaataat	540
ttttggaa	gtgaacccat	catctccgaa	atttttccc	acagtccctt	gaggacagaa	600
tatgeaatcc	cttggctgaa	cgagcctagt	ttcgcttttgc	ctgacgtgtat	ccgaaaaagc	660
ccagacagcc	ccgacggcga	ggatgacagg	gtctacttct	tcttcacgga	ggtgtctgt	720

[0013]	gagttatgatg ttgtgttcag ggtgtgtatc ccacggatag caagagtgtg caagggggac	780
	cagggccggcc tgaggacatt gcagaagaaa tggacctct tctgaaagc cggactcatc	840
	tgctcccgcc cagacagcg cttggcttc aatgtgtgc gggatgttt cgtgtcagg	900
	tccccggcc tgaagggtgc tgggtctat gcactttca ccccacagct gaacaacgtg	960
	gggctgtcgg cagtgtgcgc ctacaacctg tccacagccg aggagggttt ctccacggg	1020
	aagtatcatgc agagcaccac agtggggcag tcccacacca agtgggtgcg ctataatggc	1080
	ccggtaaccca agccggggcc tggagcgtgc atcgacagcg aggcacgggc cgccaactac	1140
	accagctct tgaatttgcg agacaagacg ctgcagttcg taaaagacca cccttgatg	1200
	gatgactcgg taacccaaat agacaacagg cccaggttaa tcaagaaaga tgtgaactac	1260
	acccagatcg tgggtggaccc gaccaggcc ctggatggga ctgtctatga tgtcatgtt	1320
	gtcagcacag accggggagc tctgcacaaa gccatcagcc tcgagcacgc tgttcacatc	1380
	atcgaggaga cccagcttt ccaggacttt gagccagttc agaccctgtc gctgtttca	1440
	aagaaggcga acaggtttgt ctatgtggc tctaactcg gctgtggtcca ggccccgtc	1500
	gccttcgtg ggaagcacgg caccctcgag gactgtgtgc tggcgccggc cccctactgc	1560
	gcctggagcc cgccccacagc gacctcggtg gctctgcacc agaccgagag cccagcagg	1620
	ggtttatttc aggatgttag cggcgatgtc tctgtgtgcc cggataaaag taaaggaagt	1680
	taccggcagc atttttcaa gcacgggtggc acacggaaac tgaatgtct caaaaatcc	1740
	aacctggccc gggtcttttgc gaagttccag aatggcgatgt tgaaggccga gagccccaaag	1800
	tacggtctta tggcagaaa aaacttgc tcttcaact tgcagaagg agacagtgg	1860
	gtgttaccatg gcctgtcaga ggagagggtt aagaacaaaa cggcttcca agtggtcggc	1920
	aagcacgtcc tggaaagtggc ggtggttcca aagcccgtag tggcccccac ctgtcagg	1980
	gttcagacag aaggtatgt gattgccacc aaagtgttg tggcatccac ccaagggtct	2040
	tctccccaa cccagccgt gcaggccacc tcctccgggg ccatcacct tcctccaaag	2100
	cctgcgccca cggcacatc ctgcacacca aagatgtca tcaacacggt ccccgacgc	2160
	cactcgaggaa aaaccatgtt tcttaagtcc agcgacaacc gcctctcat gtccctcttc	2220
	cttttttttctt ttgtttctt cctctgcctc ttttttatac actgtataa gggatactt	2280
	cccgacagt gcttggaaatt ccgctcgcccttactaattt ggaagaagaa gccaaagtca	2340
	gattttgttgc accgtgagca gagcctgaag gagacgttag tagagccagg gagcttctcc	2400
	cagcagaatg gggagcaccc caagccagcc ctggacaccg gctatgagac cgagcaagac	2460
	accatcacca gcaaaatccc cacggatagg gaggactcac agaggatcga cgacctttt	2520
	gccaggggaca agcccttga cgtcaagtgt gagctgaagt tegctgactc agacgcagat	2580
	ggagac	2586

〈210〉 24

〈211〉 13

<212> PRT

〈213〉 人工序列

<220>  
<888>

<223> 蛋白脂蛋白PLP的肽表位(139-151)

〈400〉 24

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

<210> 25  
<211> 118  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 多肽抗-CD100 VH 76

<400> 25

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

[0014]

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

<210> 26  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 多肽抗-CD100 VH 76 CDR1

<400> 26

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

<210> 27  
<211> 17  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 多肽抗-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

&lt;210&gt; 28

&lt;211&gt; 9

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 多肽抗-CD100 VH 76 CDR3

&lt;400&gt; 28

Asp Pro Tyr Gly Trp Thr Met Asp Ser  
1 5

&lt;210&gt; 29

&lt;211&gt; 107

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 多肽抗-CD100 VL 76

&lt;400&gt; 29

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly  
1 5 10 15Asp Thr Ile Thr Ile Thr Cys His Ala Ser Gln Asn Ile Asn Val Trp  
20 25 30Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Asn Ile Pro Lys Leu Leu Ile  
35 40 45[0015] Tyr Lys Ala Ser Asn Leu His Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
50 55 60Ser Gly Ser Gly Thr Gly Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
65 70 75 80Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Gln Ser Tyr Pro Tyr  
85 90 95Thr Phe Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
100 105

&lt;210&gt; 30

&lt;211&gt; 11

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 多肽抗-CD100 VL 76 CDR1

&lt;400&gt; 30

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

&lt;210&gt; 31

&lt;211&gt; 7

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 多肽抗-CD100 VL 76 CDR2

<400>	31	
Lys Ala Ser Asn Leu His Thr		
1	5	
<210>	32	
<211>	9	
<212>	PRT	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	多肽抗-CD100 VL 76 CDR3	
<400>	32	
Gln Gln Gly Gln Ser Tyr Pro Tyr Thr		
1	5	
<210>	33	
<211>	354	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	多核苷酸抗-CD100 VH 76	
<400>	33	
cagggtccagtc tgccagcgtc tggggctgaa ctggcaaaac ctggggcctc agtgaagatg	60	
tcttgcaagg cttctggcta cacctttact aggtactgga tgcactgggt aaaacagagg	120	
cctggacagg gtcgttggatg gattggatac attaatttctt gcaactgggtt ttctgttac	180	
aatcagaagt tcaaggacaa ggccacattt actgcagaca aatctccatg cacagcttac	240	
atgcacttgcgacatcgttggatc tctgcgttctt attactgtgc aagagacccc	300	
[0016] tacggcttggatc ctatggactc ctggggccaa gggactctgg tcaccgttctc ctca	354	
<210>	34	
<211>	30	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	多核苷酸抗-CD100 VH 76 CDR1	
<400>	34	
ggctacaccc ttacttaggta ctggatgcac	30	
<210>	35	
<211>	51	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	多核苷酸抗-CD100 VH 76 CDR2	
<400>	35	
tacattaaatc cttagactgg ttattctgtat tacaatcaga agttcaagga c	51	
<210>	36	
<211>	27	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	多核苷酸抗-CD100 VH 76 CDR3	
<400>	36	
gacccttaacg gctggactat ggactcc	27	

<210>	37					
<211>	321					
<212>	DNA					
<213>	人工序列					
<220>						
<223>	多核苷酸抗-CD100 VL 76					
<400>	37					
gacatccaga	tgacccagtc	tccatccagt	ctgtctgcat	cccttgaga	cacaattacc	60
atcacttgcc	atgccagtca	gaacattaaat	gtttggtaa	gctggatcca	gcagaaacca	120
ggaaatattc	ctaaactatt	gatctataag	gcttccaact	tgcacacagg	cgtcccatca	180
agtttagtg	gcagtggatc	tggaacaggt	ttcacattaa	ccatcagcag	cctgcagcct	240
gaagacattg	ccacttacta	ctgtcaacag	ggtcaaagtt	atccgtacac	gttcggaggg	300
gggaccaage	tcgagatcaa	a				321
<210>	38					
<211>	33					
<212>	DNA					
<213>	人工序列					
<220>						
<223>	多核苷酸抗-CD100 VL 76 CDR1					
<400>	38					
catgccagtc	agaacattaa	tgttggtaa	agc			33
<210>	39					
<211>	21					
<212>	DNA					
<213>	人工序列					
<220>						
<223>	多核苷酸抗-CD100 VL 76 CDR2					
<400>	39					
aaggcttcca	acttgacac	a				21
<210>	40					
<211>	27					
<212>	DNA					
<213>	人工序列					
<220>						
<223>	多核苷酸抗-CD100 VL 76 CDR3					
<400>	40					
caacagggtc	aaagttatcc	gtacacg				27
<210>	41					
<211>	51					
<212>	DNA					
<213>	人工序列					
<220>						
<223>	表位1					
<400>	41					
ctgaagggtgc	ctgtgttcta	tgcactcttc	accccacagc	tgaacaacgt	g	51
<210>	42					
<211>	17					
<212>	PRT					
<213>	人工序列					

<220>  
<223> 表位1

<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> DNA  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 表位2

<400> 43  
aatatggacct ctttcctgaa agcccgactc atctgtccc ggcca

45

<210> 44  
<211> 15  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 表位2

<400> 44

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

[0018] <210> 45  
<211> 42  
<212> DNA  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 表位3

<400> 45  
gagtttgtt tcaggggtct gatecccacgg atagcaagag tg

42

<210> 46  
<211> 14  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 表位3

<400> 46

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

<210> 47  
<211> 113  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 2282 VL结构域

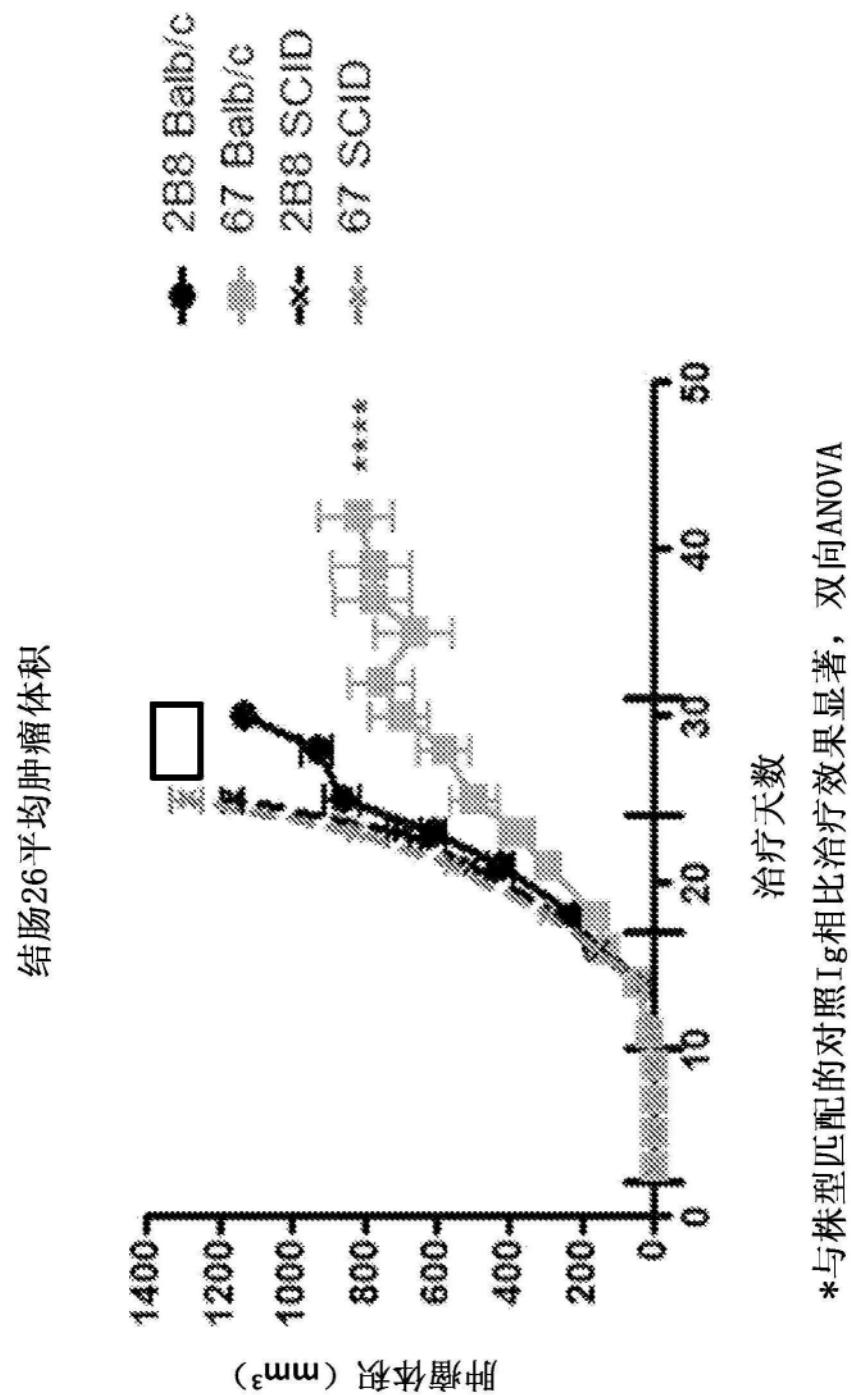
<400> 47  
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Pro Gly  
1 5 10 15  
Glu Pro Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Phe Asn Ser  
20 25 30

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 G1y Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val  
 50 55 60  
 Pro Asp Arg Phe 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

<210> 48  
 <211> 122  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

[0019] <220>  
 <223> 2282 VH结构域

<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



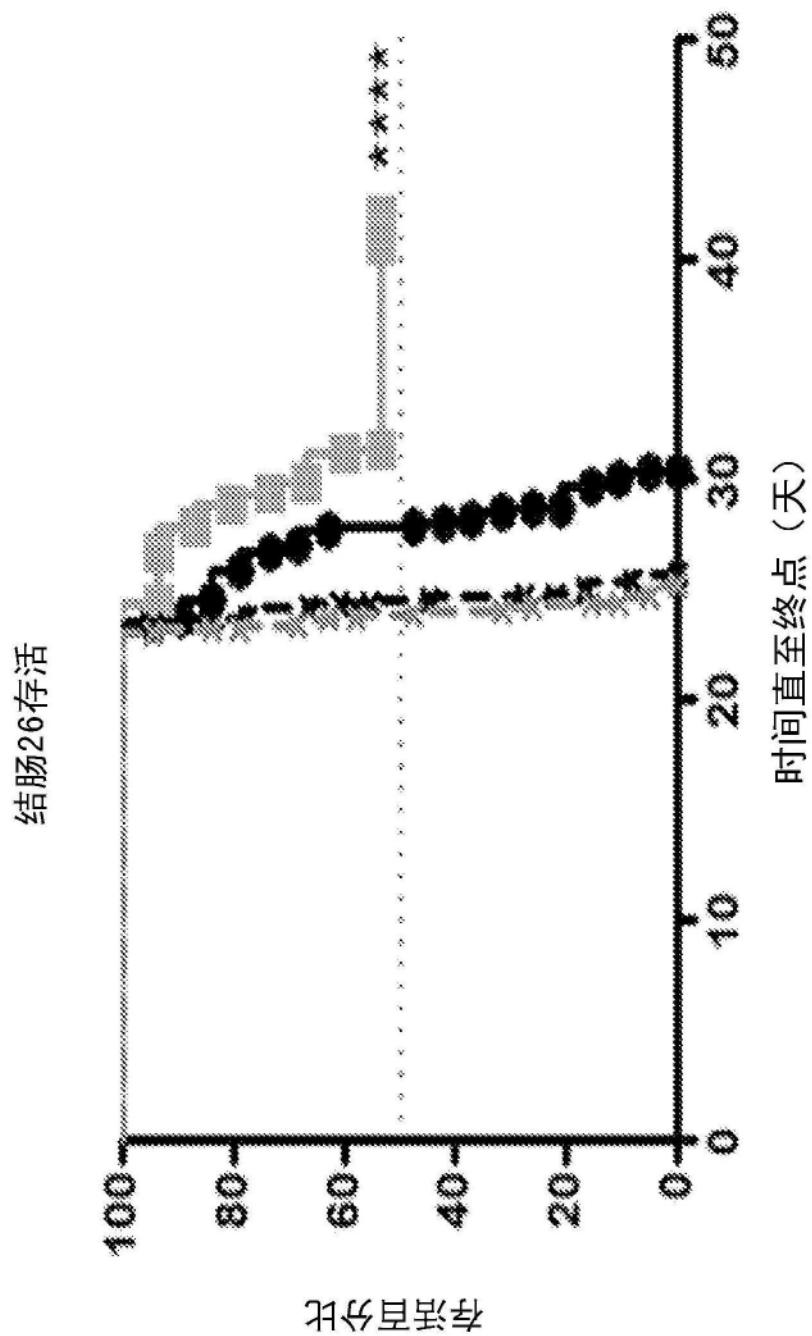


图1B

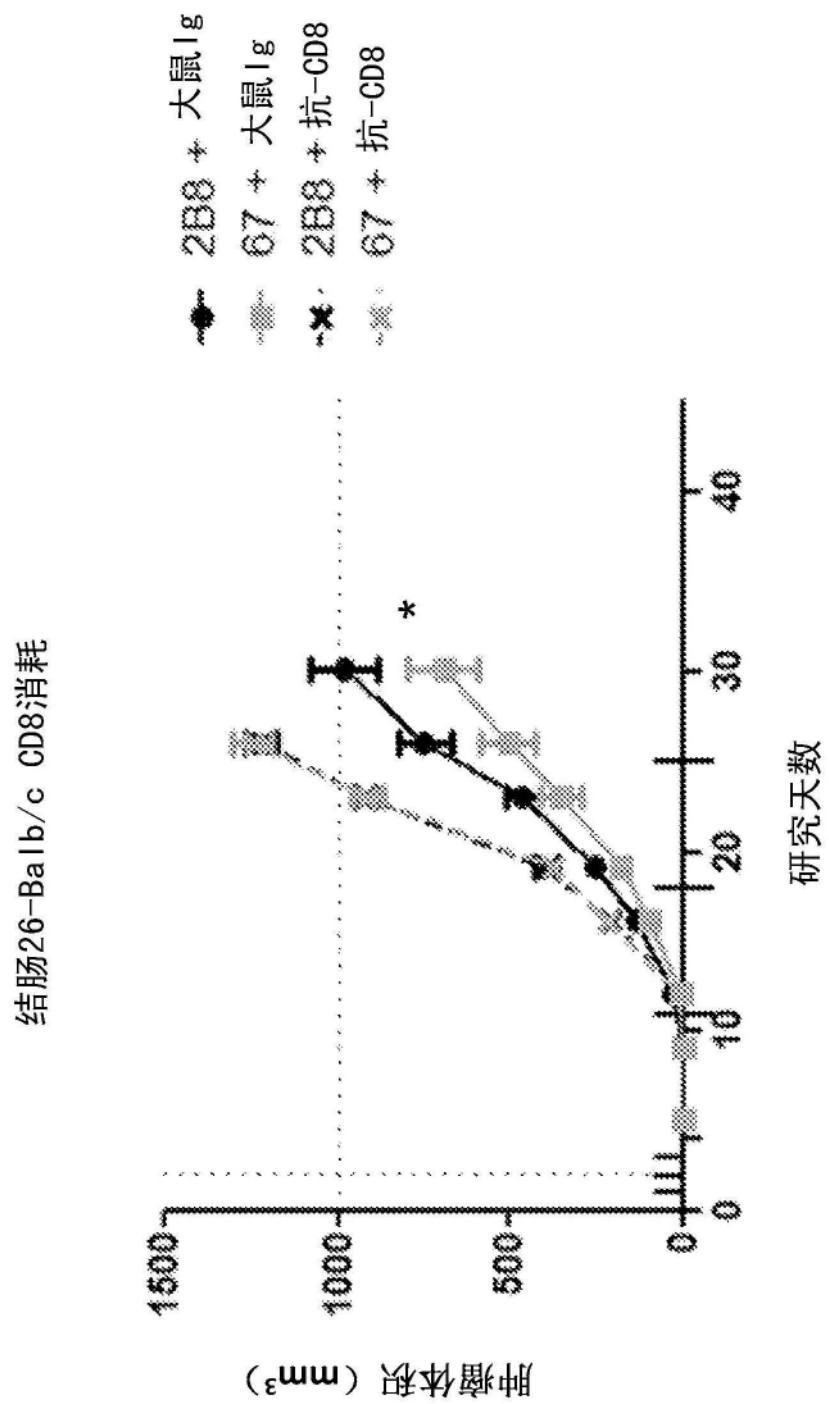


图2

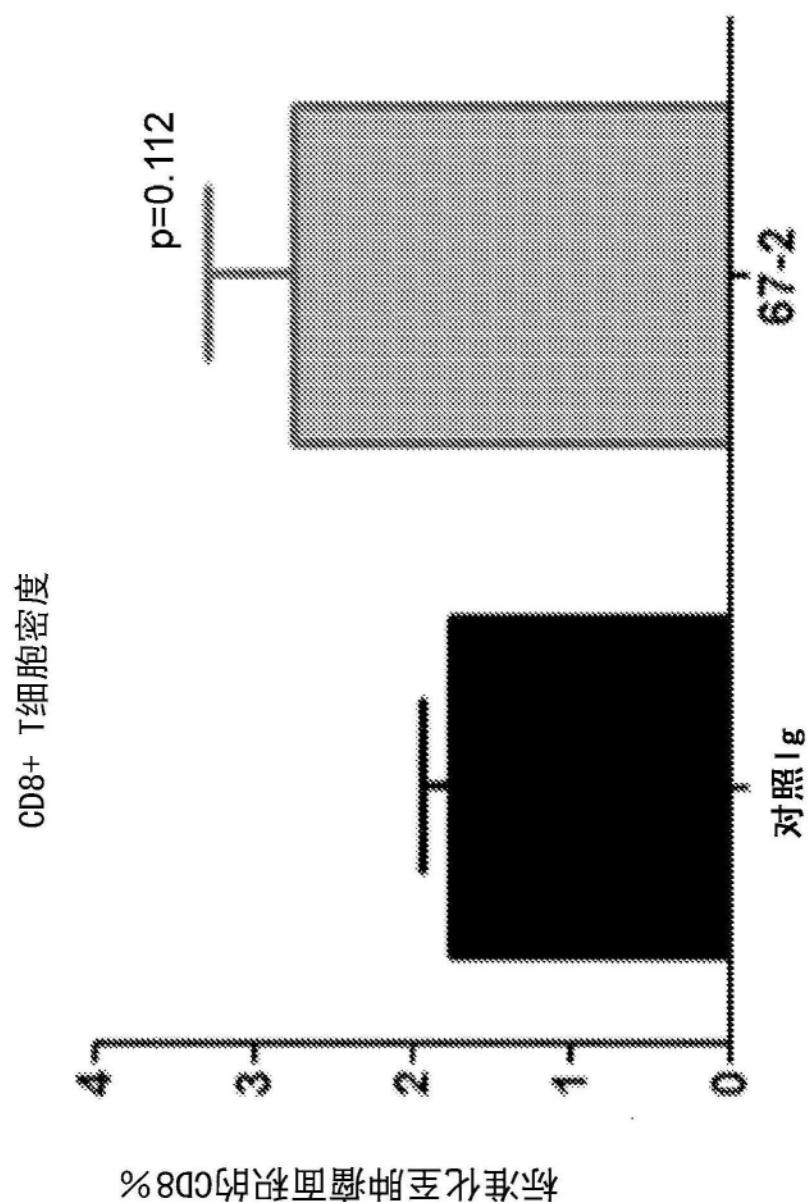


图3A

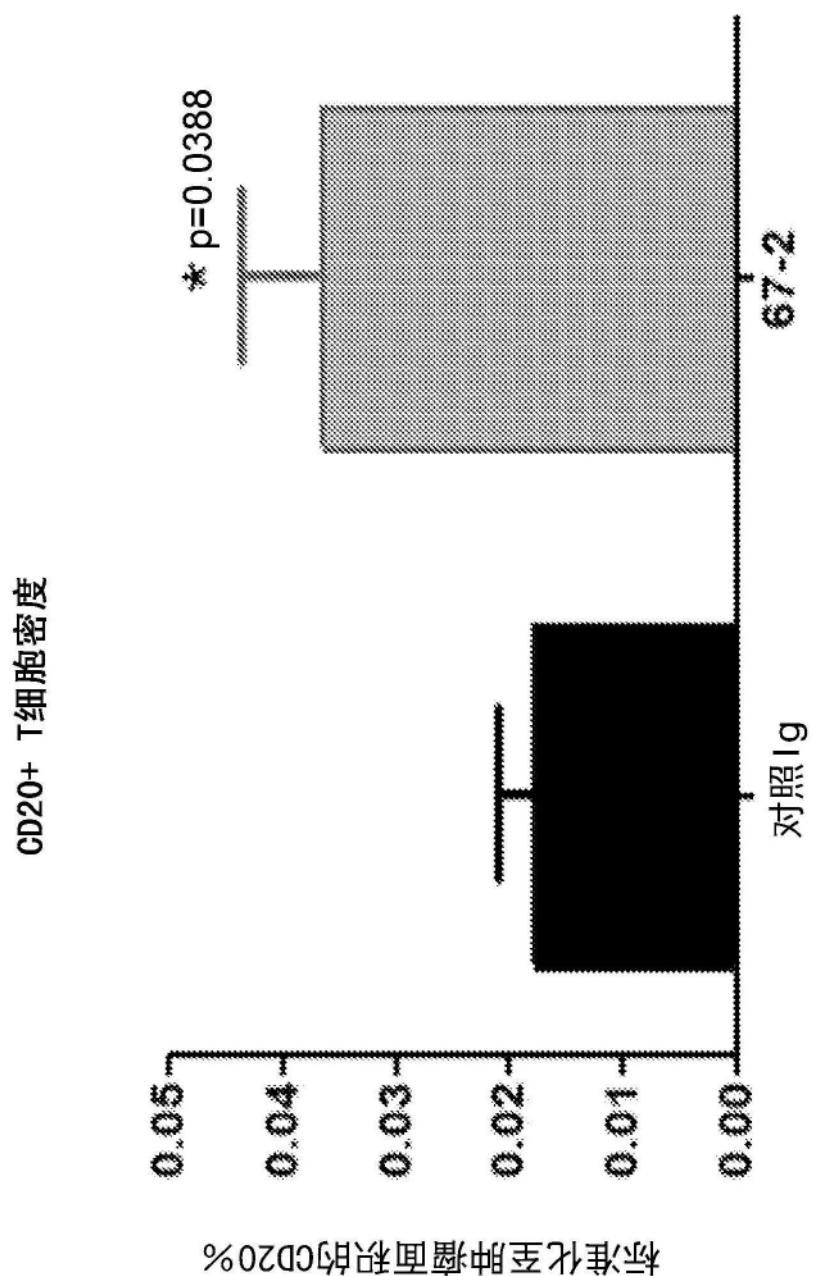
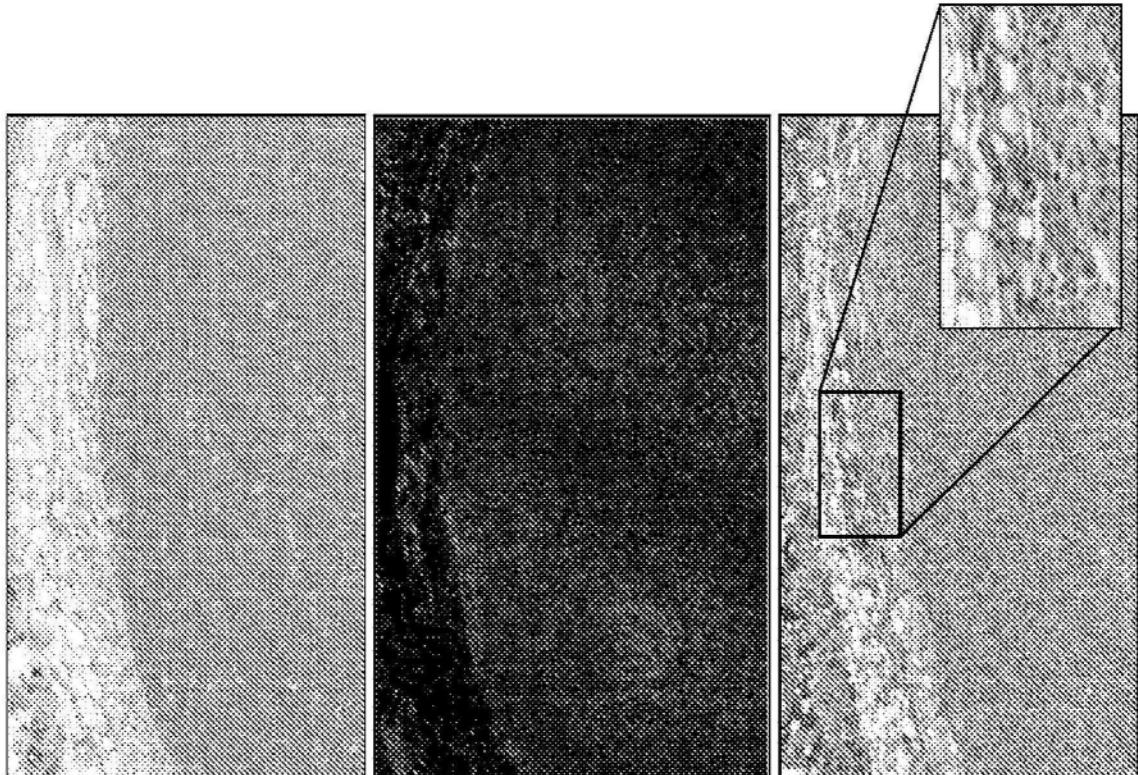


图3B

抗-SEMA4D MAb 67



对照 Ig

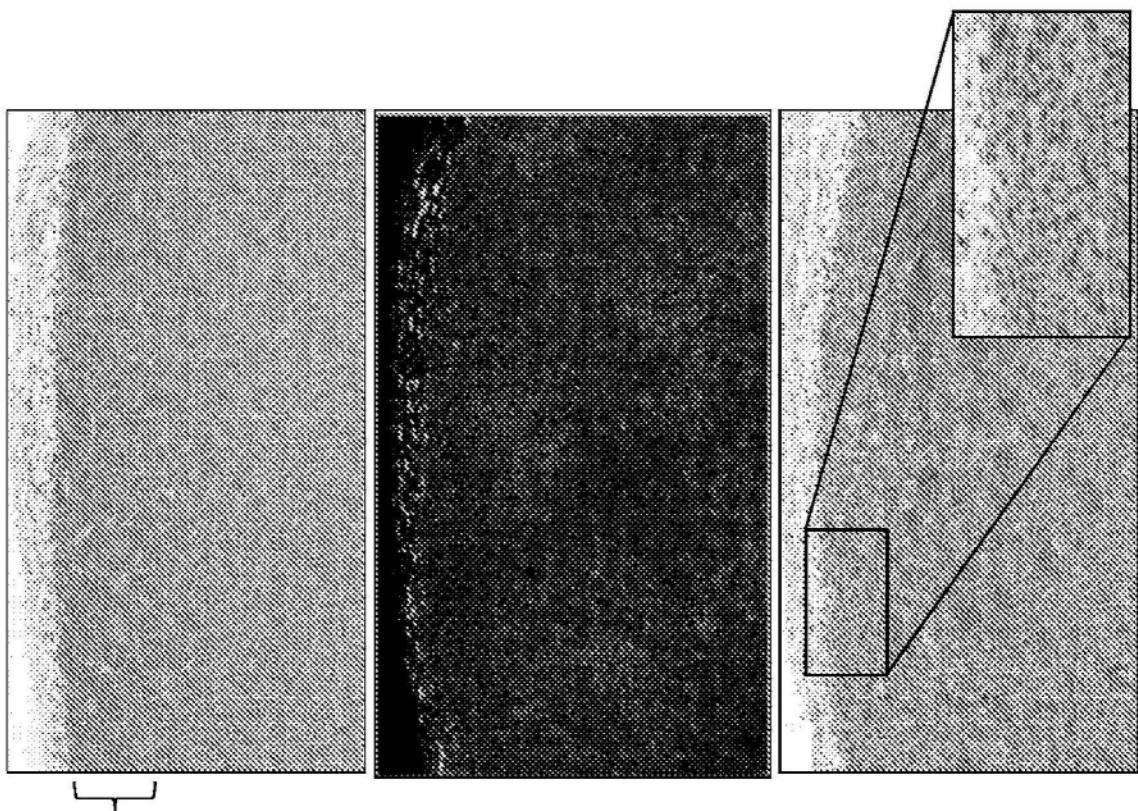


图4A

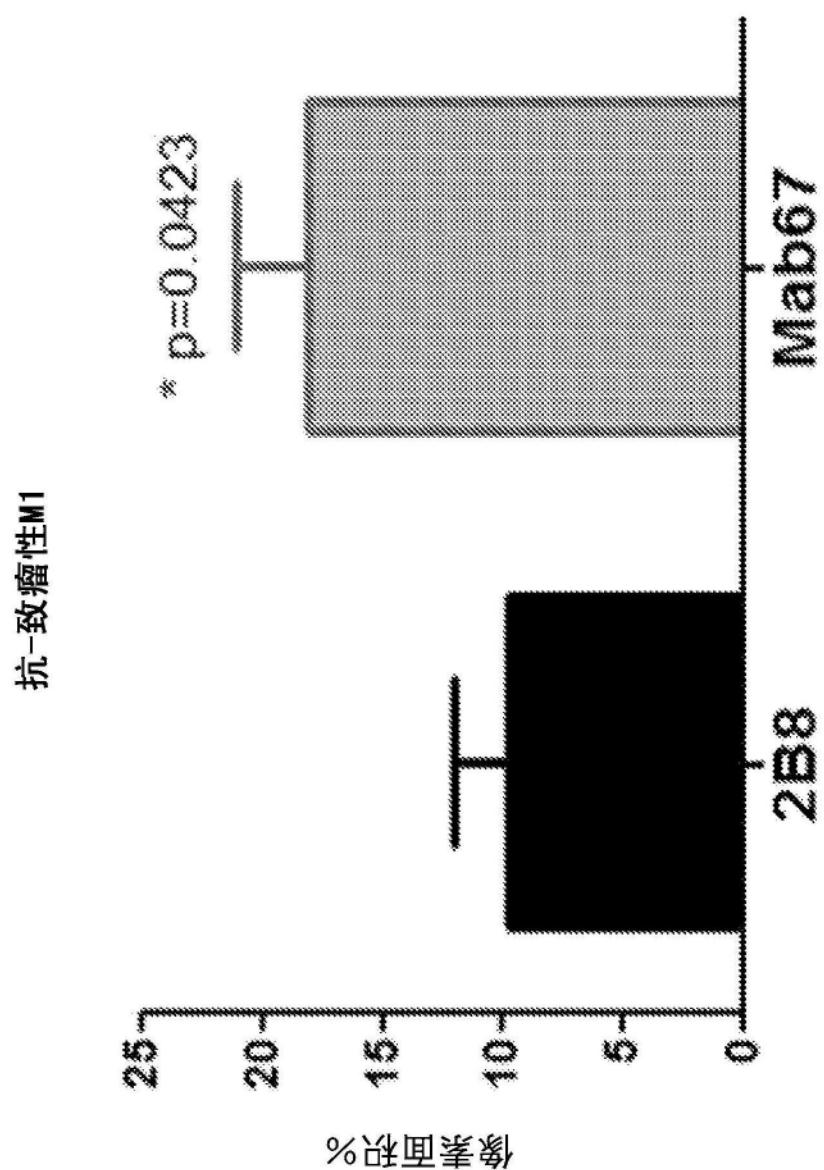


图4B

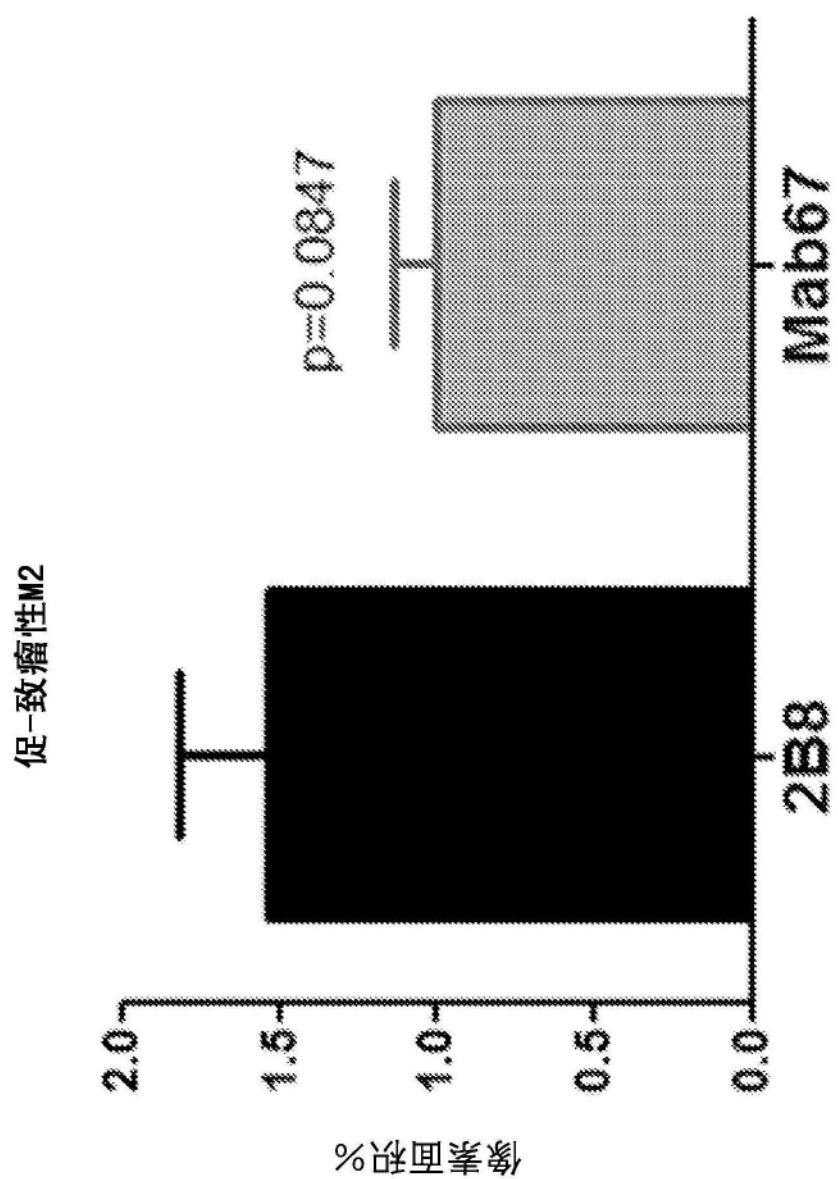


图4C

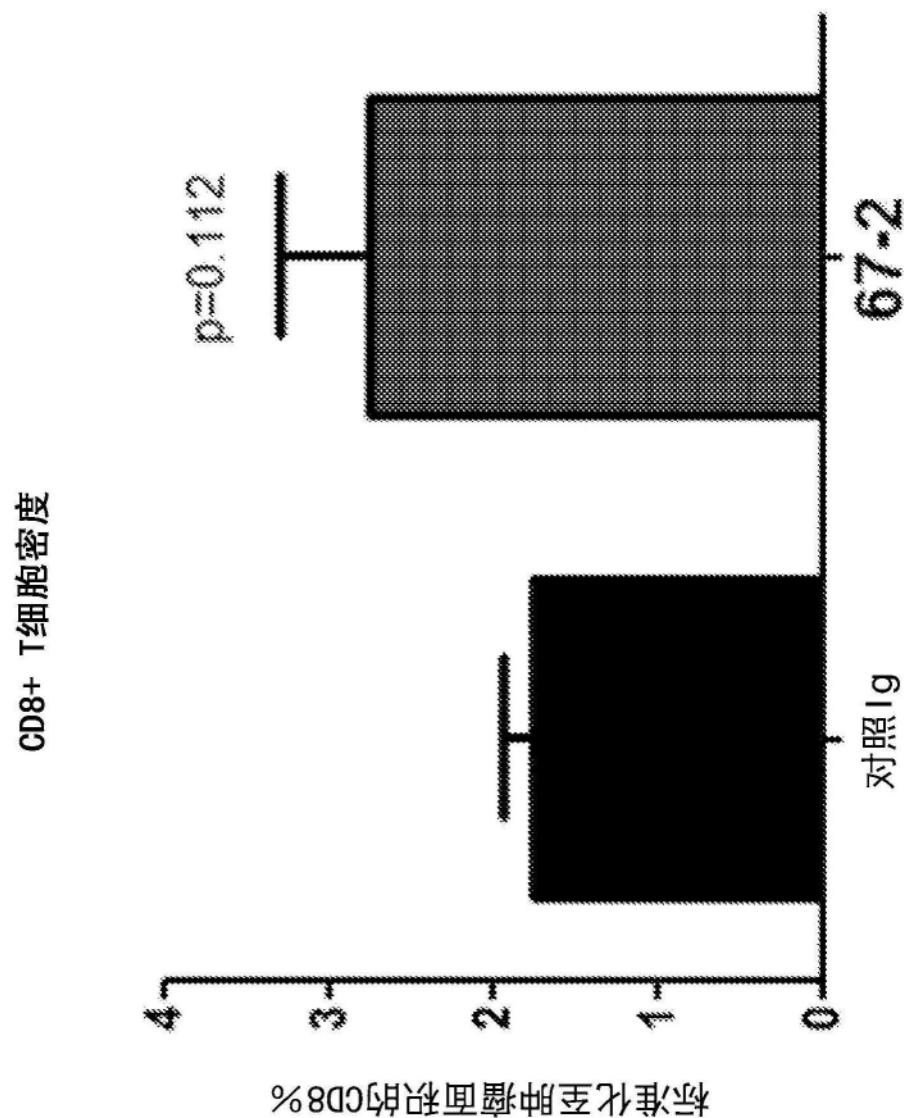


图4D

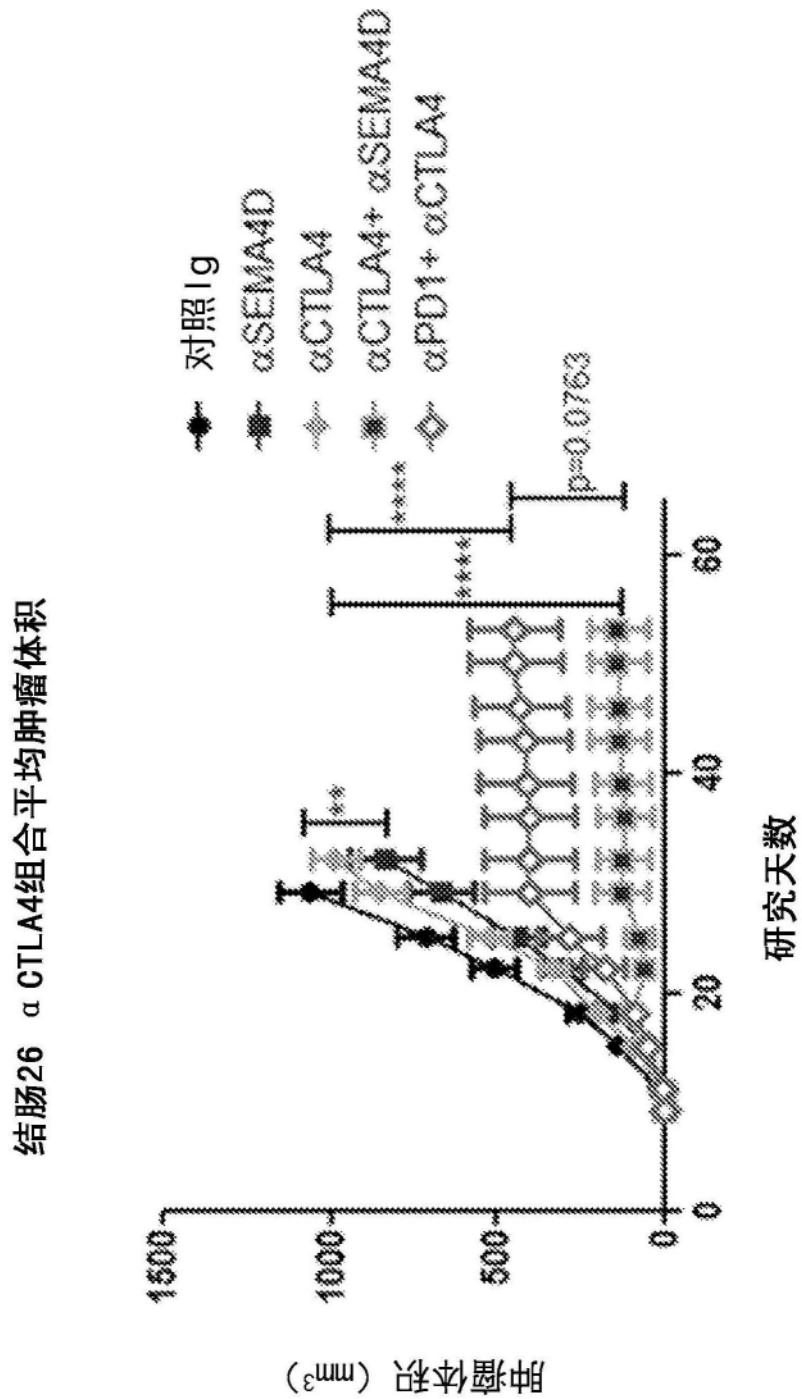


图5A

## 结肠26 α CTLA4组合存活

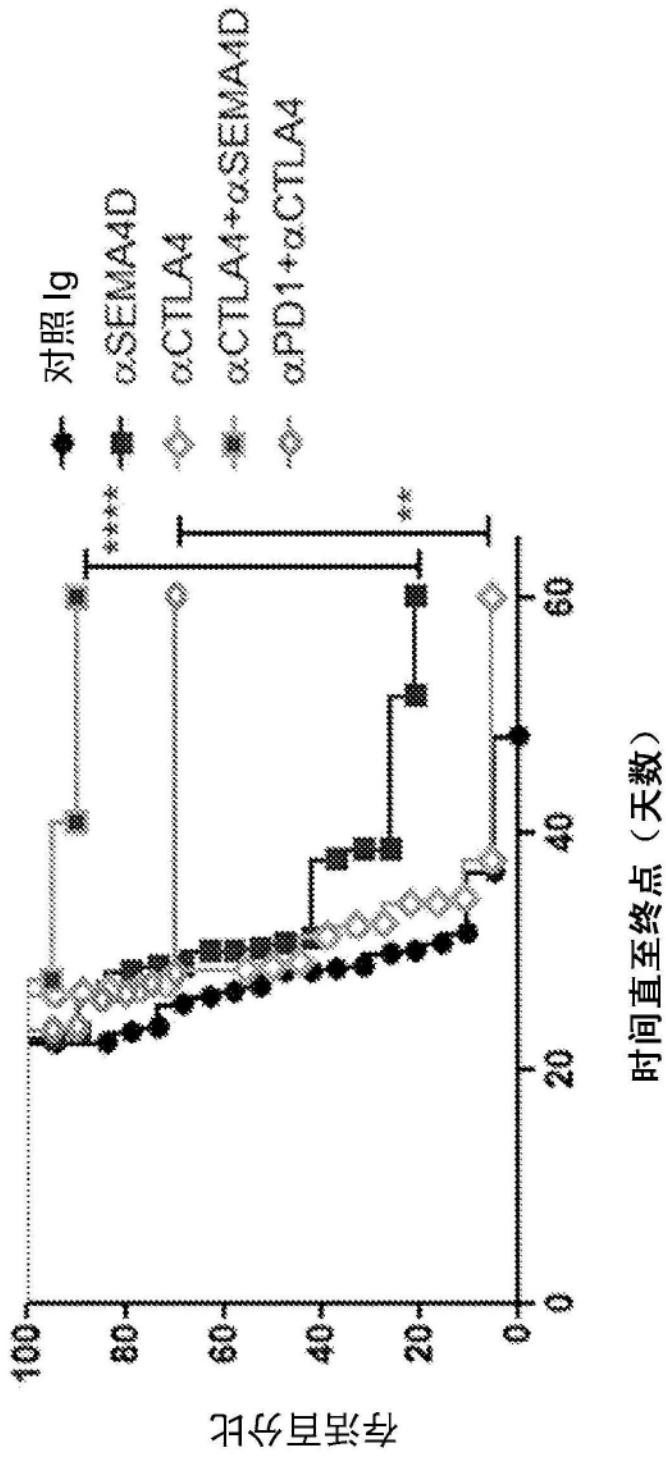


图5B

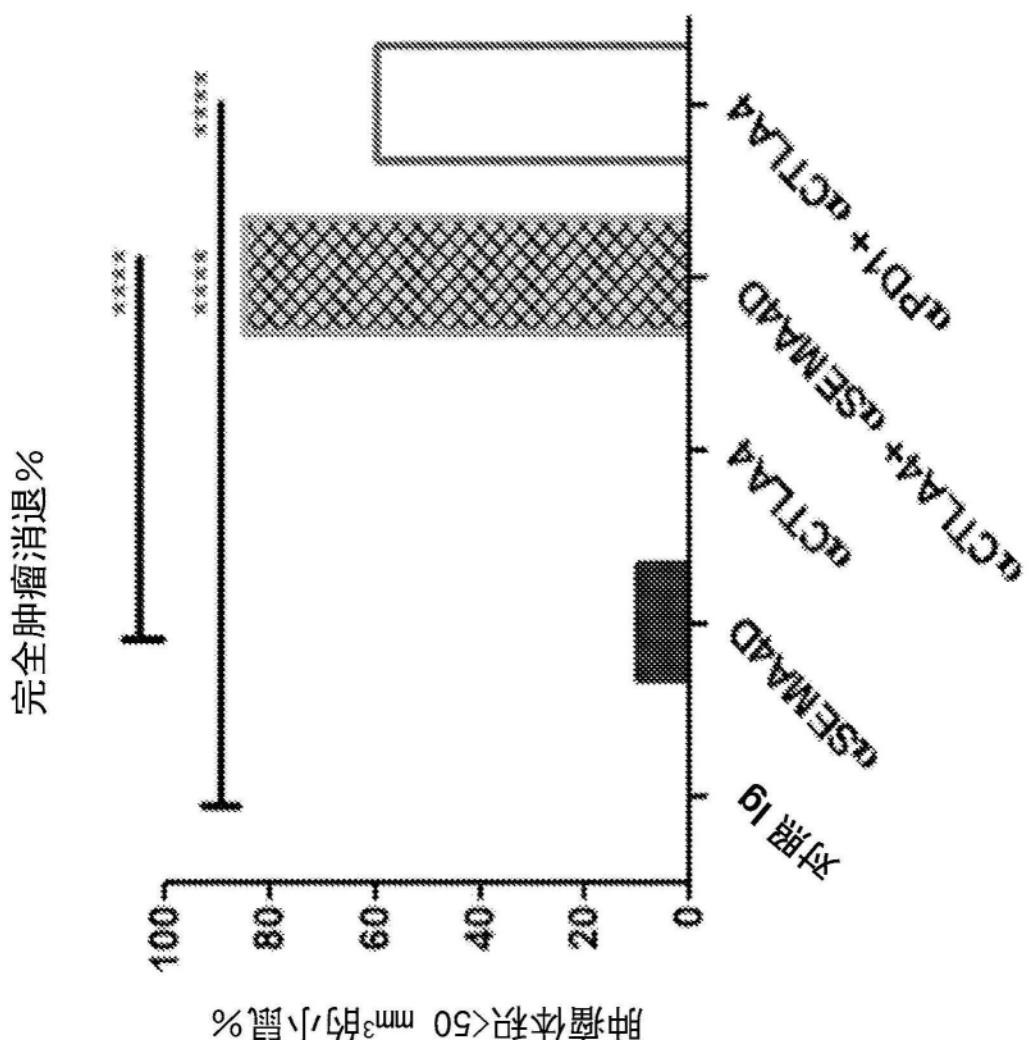


图5C

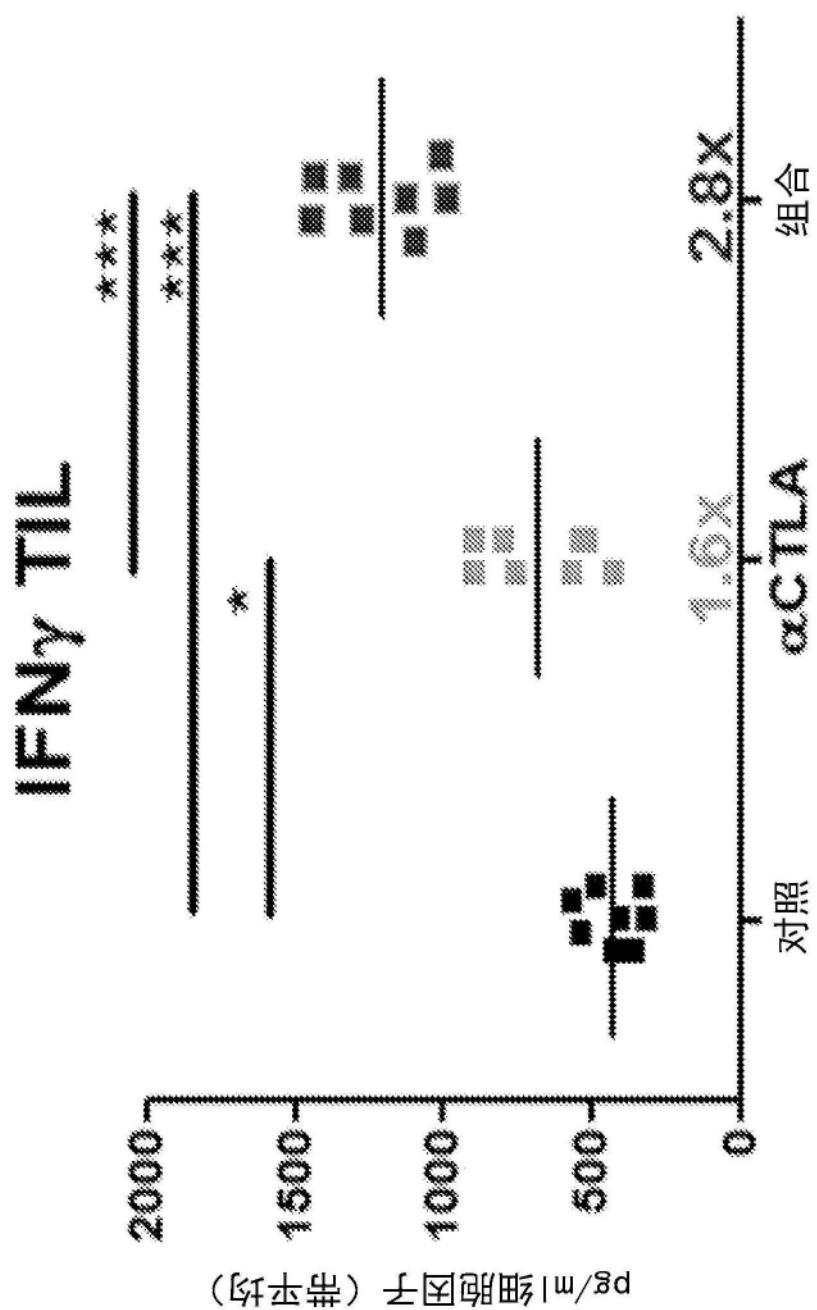


图5D

优势免疫肽特异性CTL响应

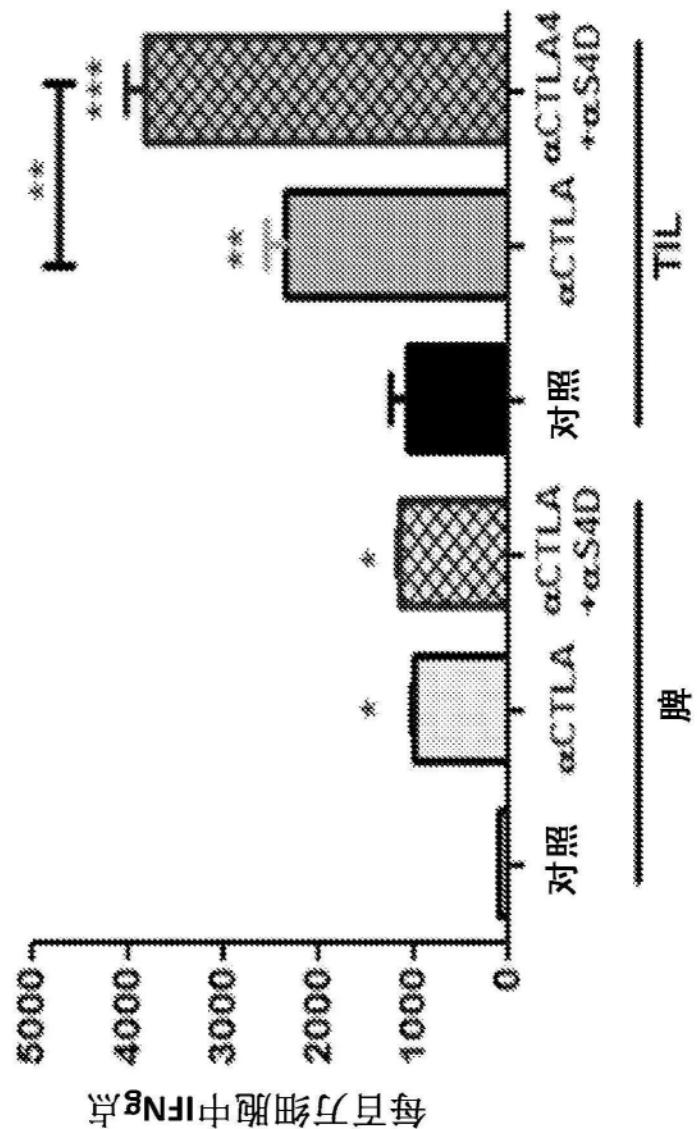


图5E

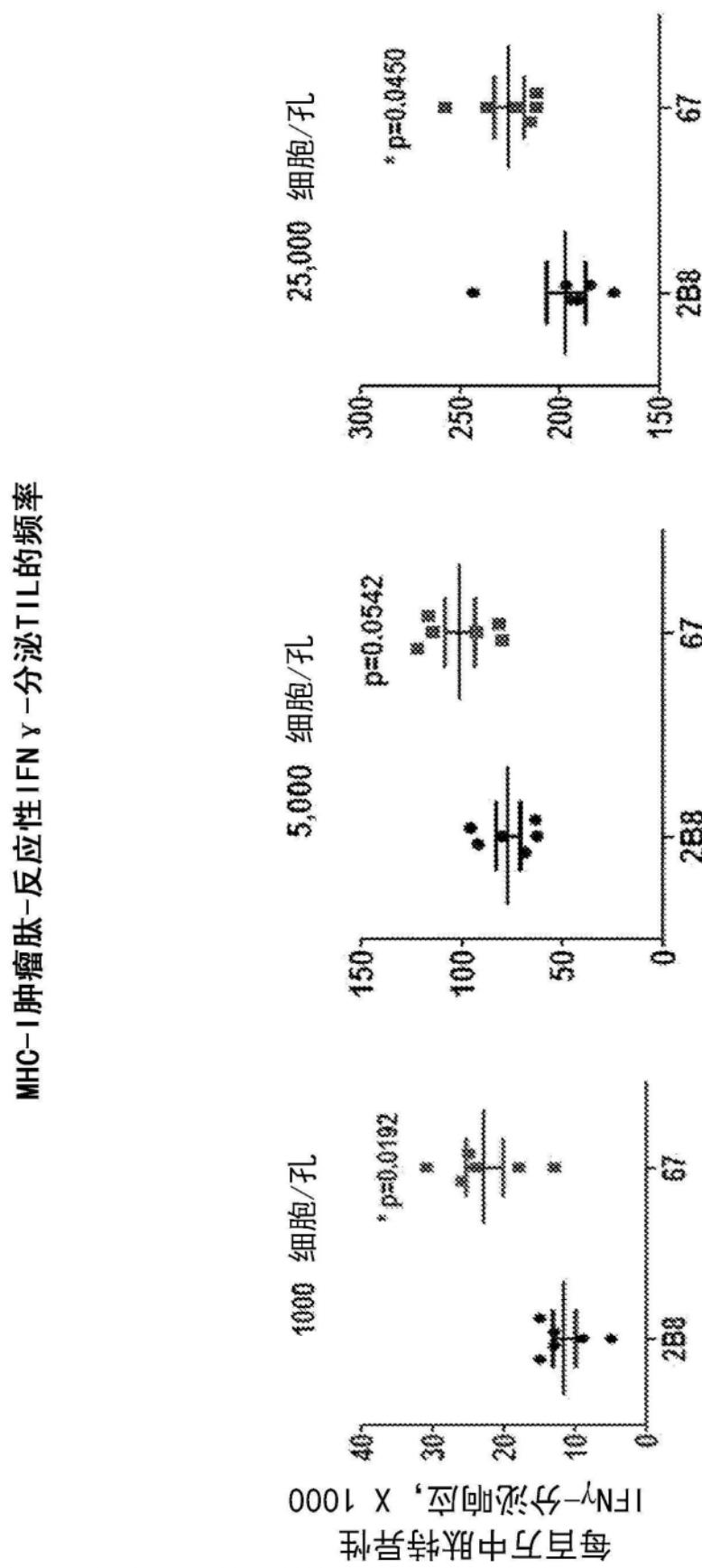


图6A

MHC-I 肿瘤肽-反应性 IFN  $\gamma$ -分泌 TIL 的频率

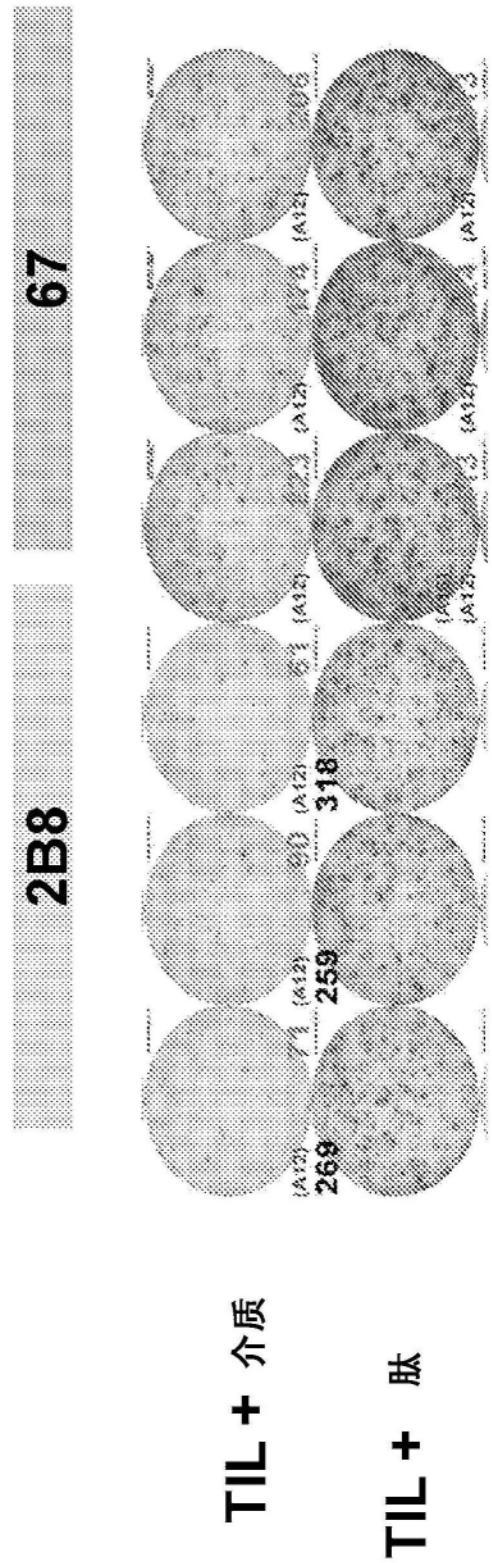


图6B

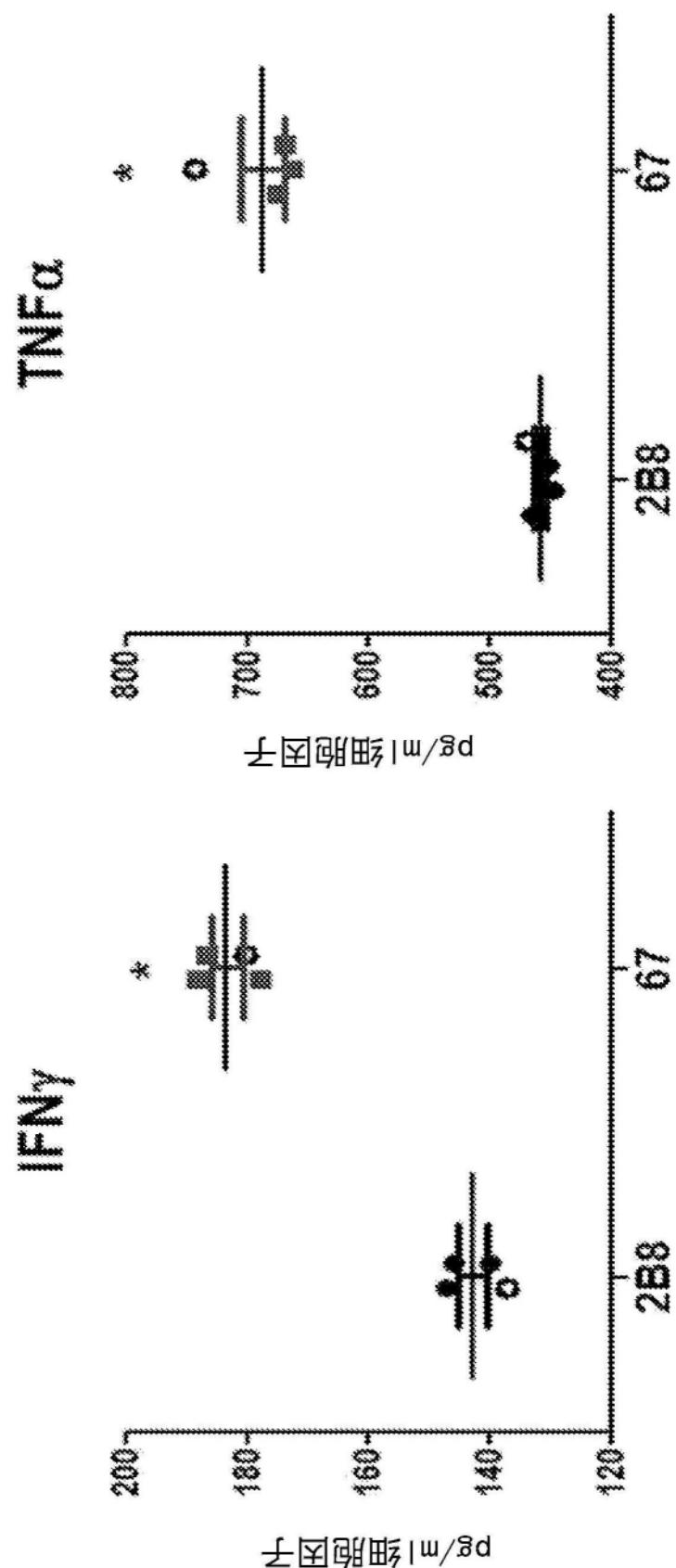


图6C

细胞因子分泌CD45+ TIL

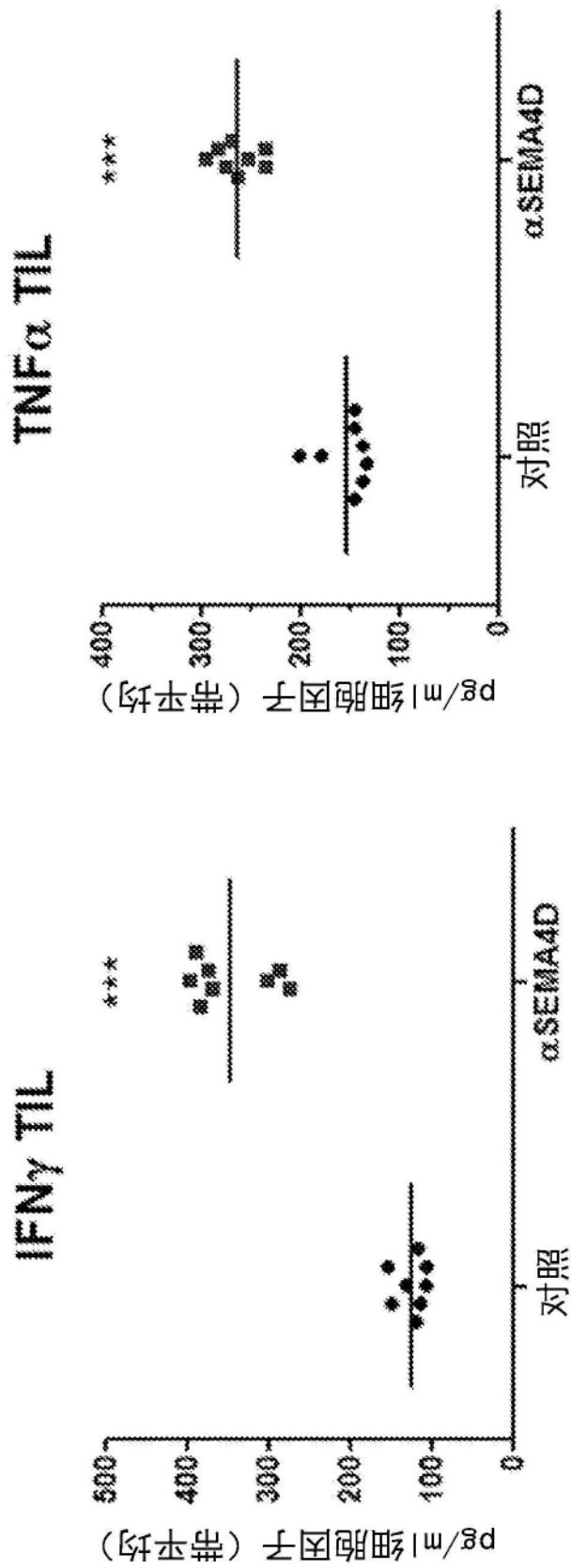


图6D

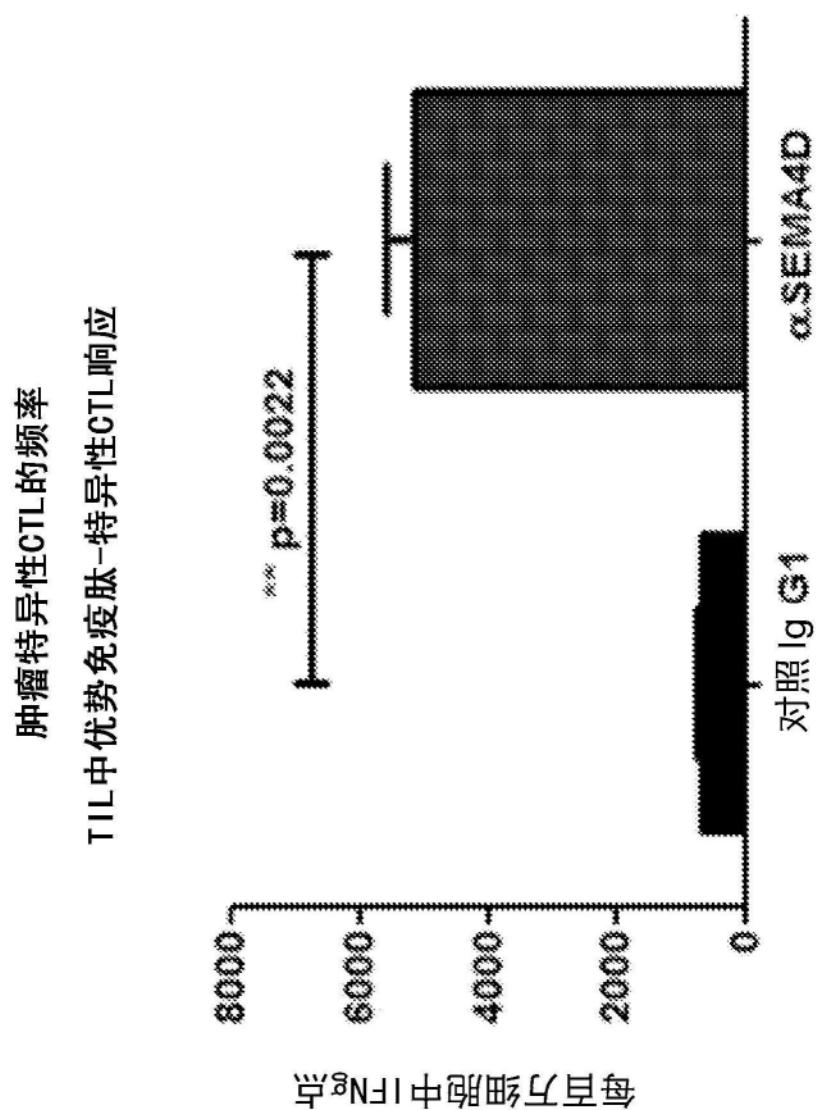


图6E

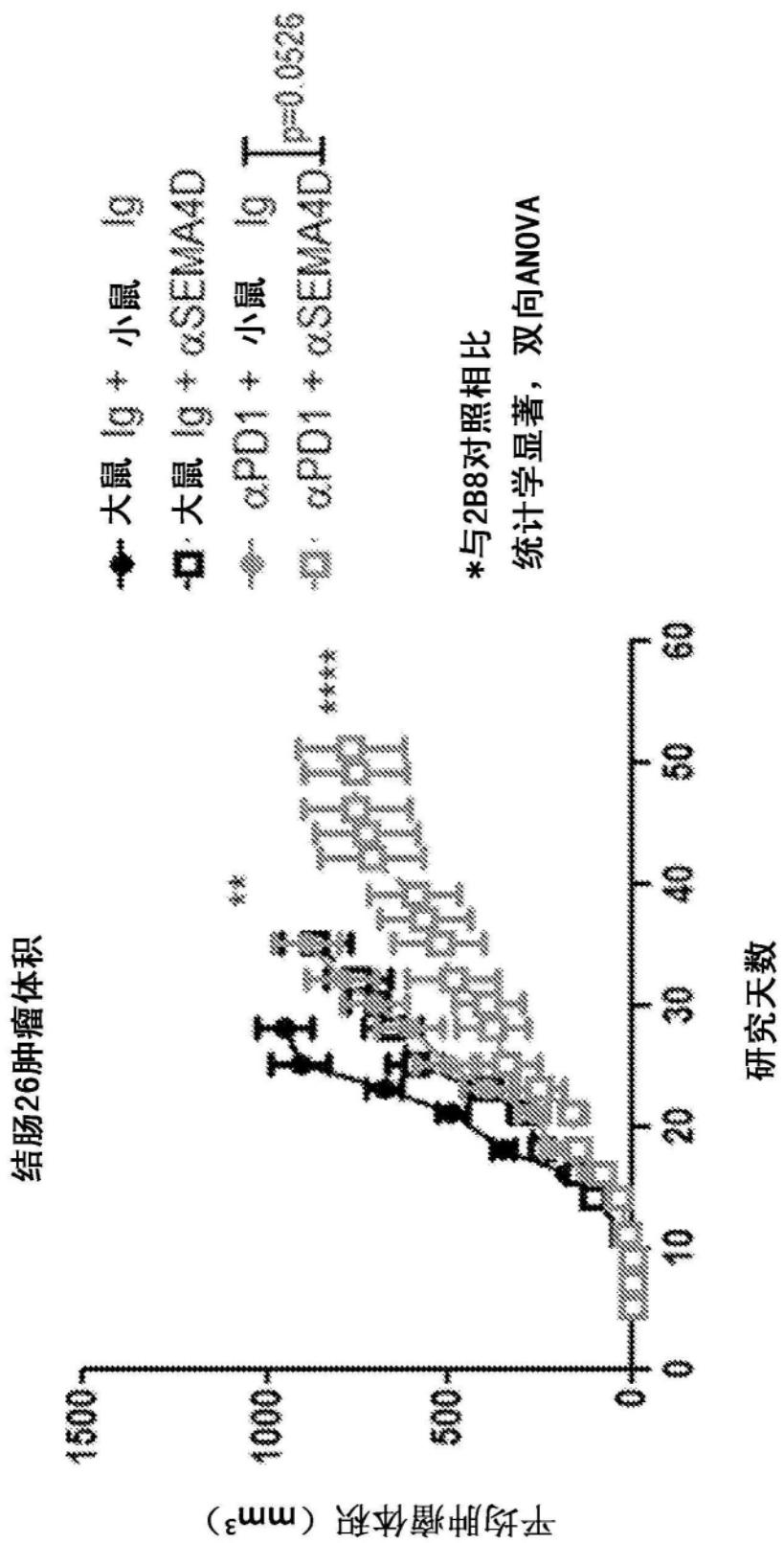


图7A

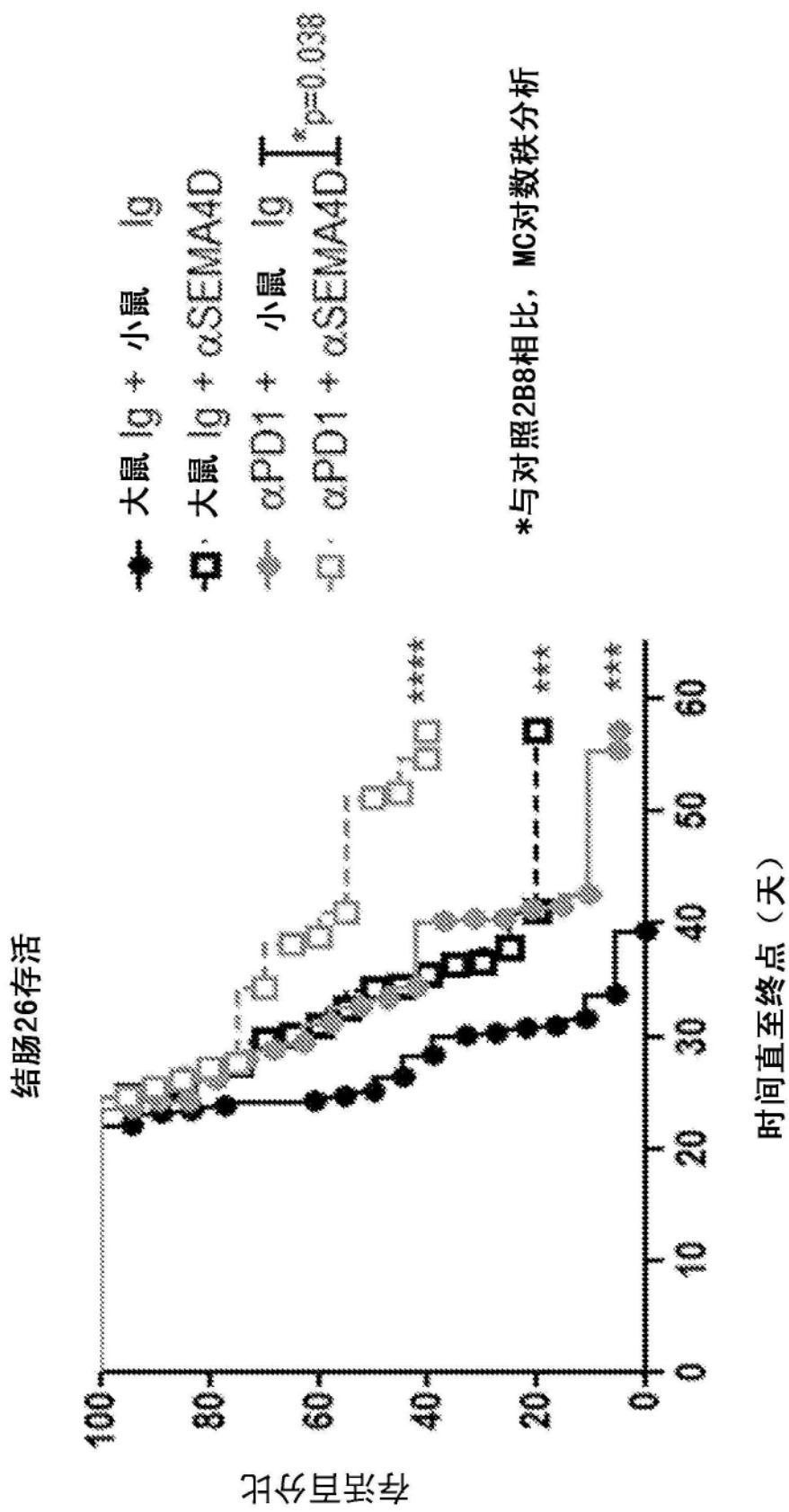


图7B

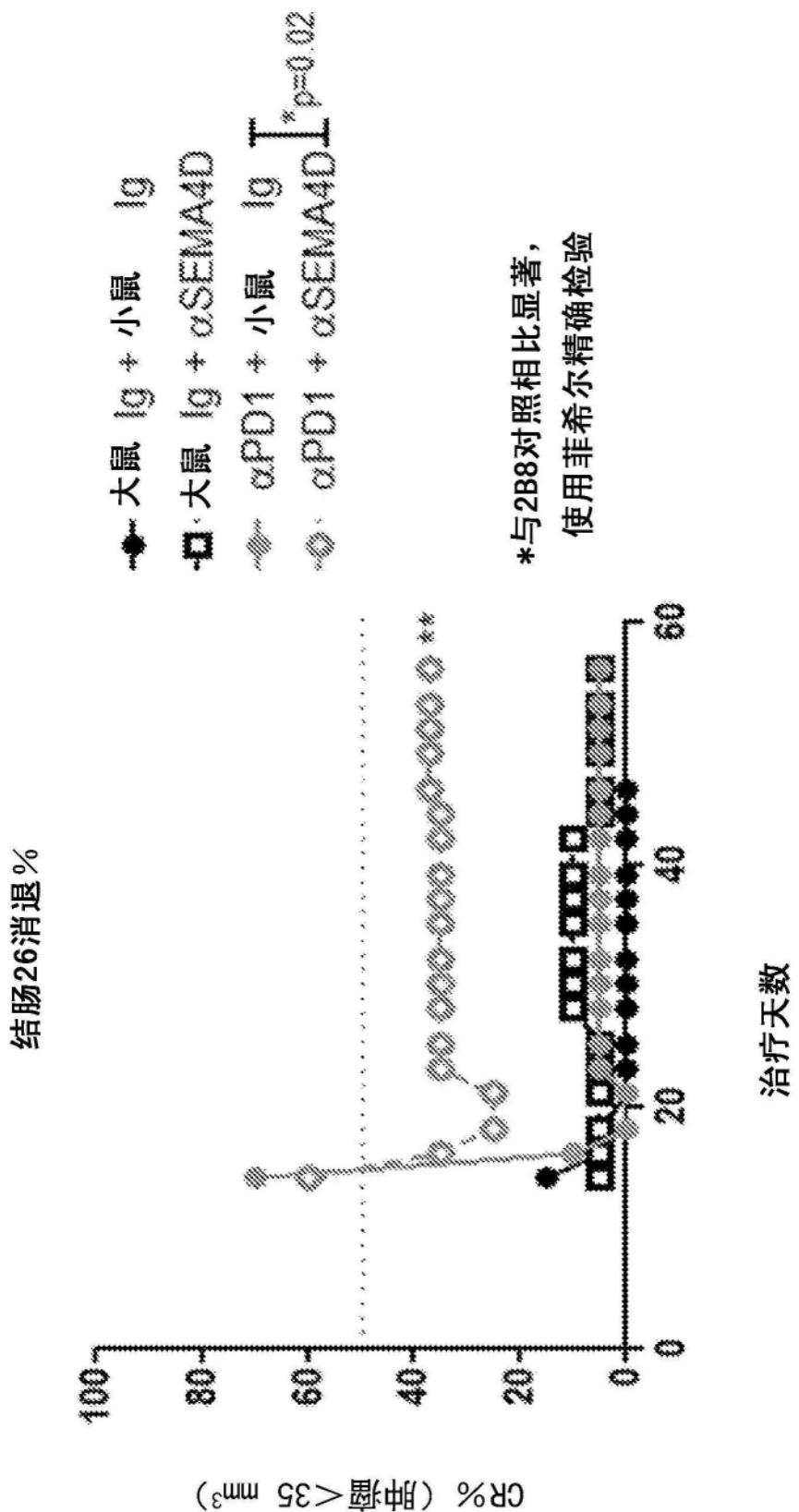


图7C

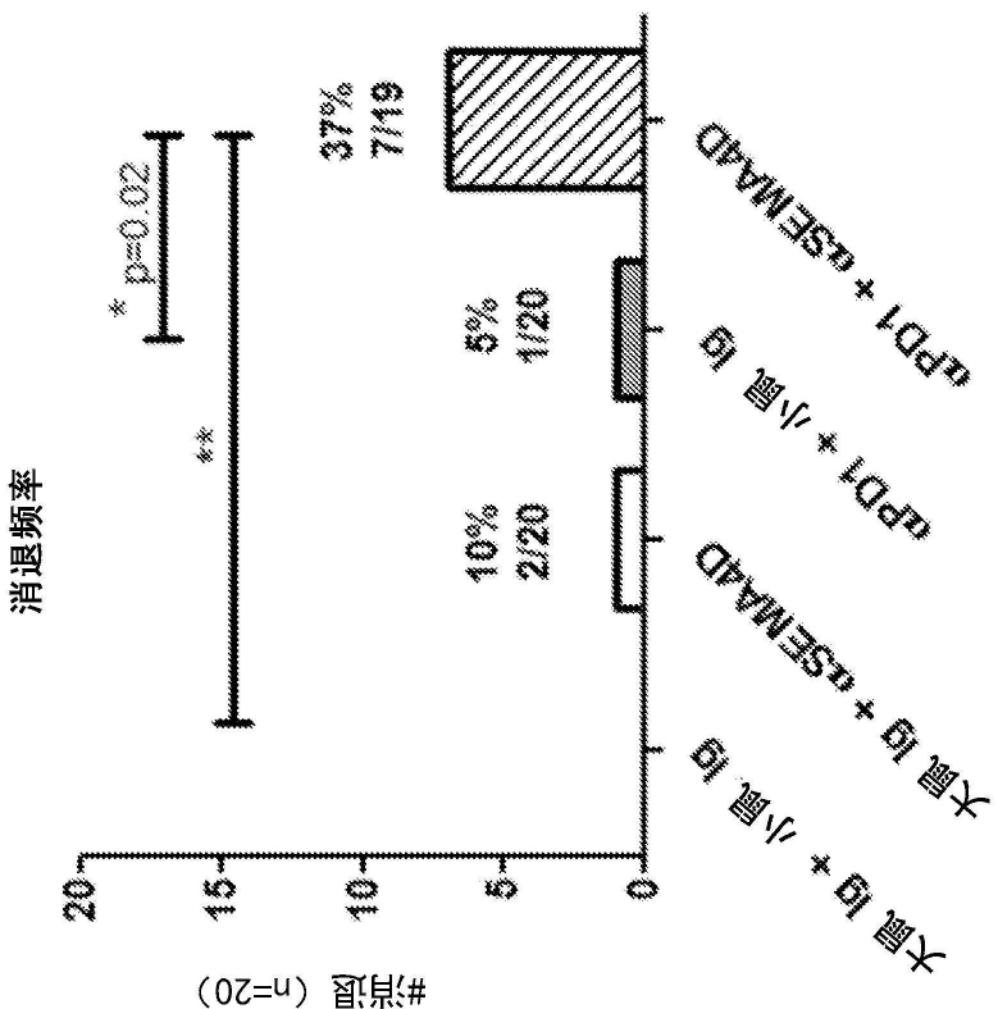


图7D

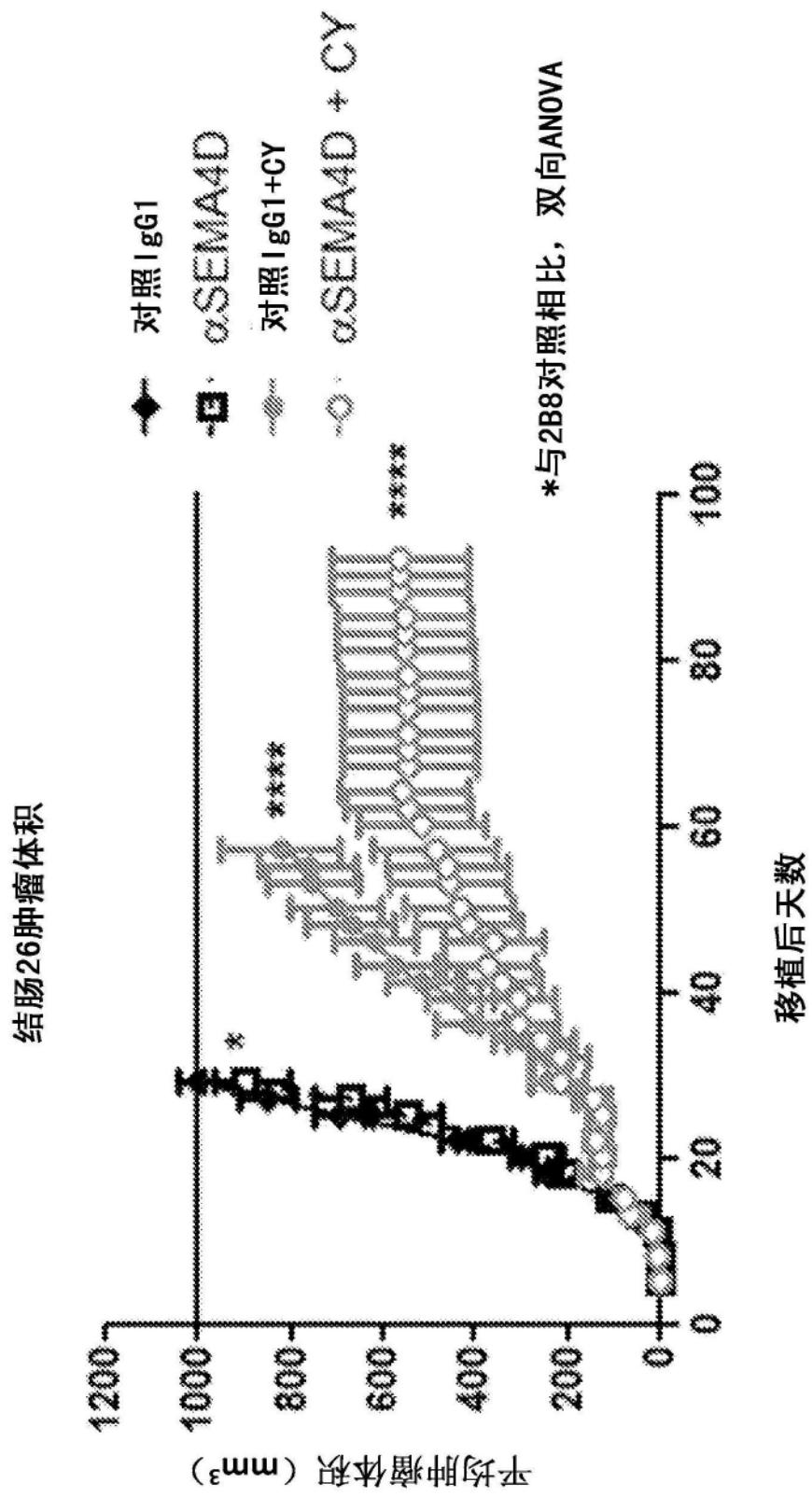


图8A

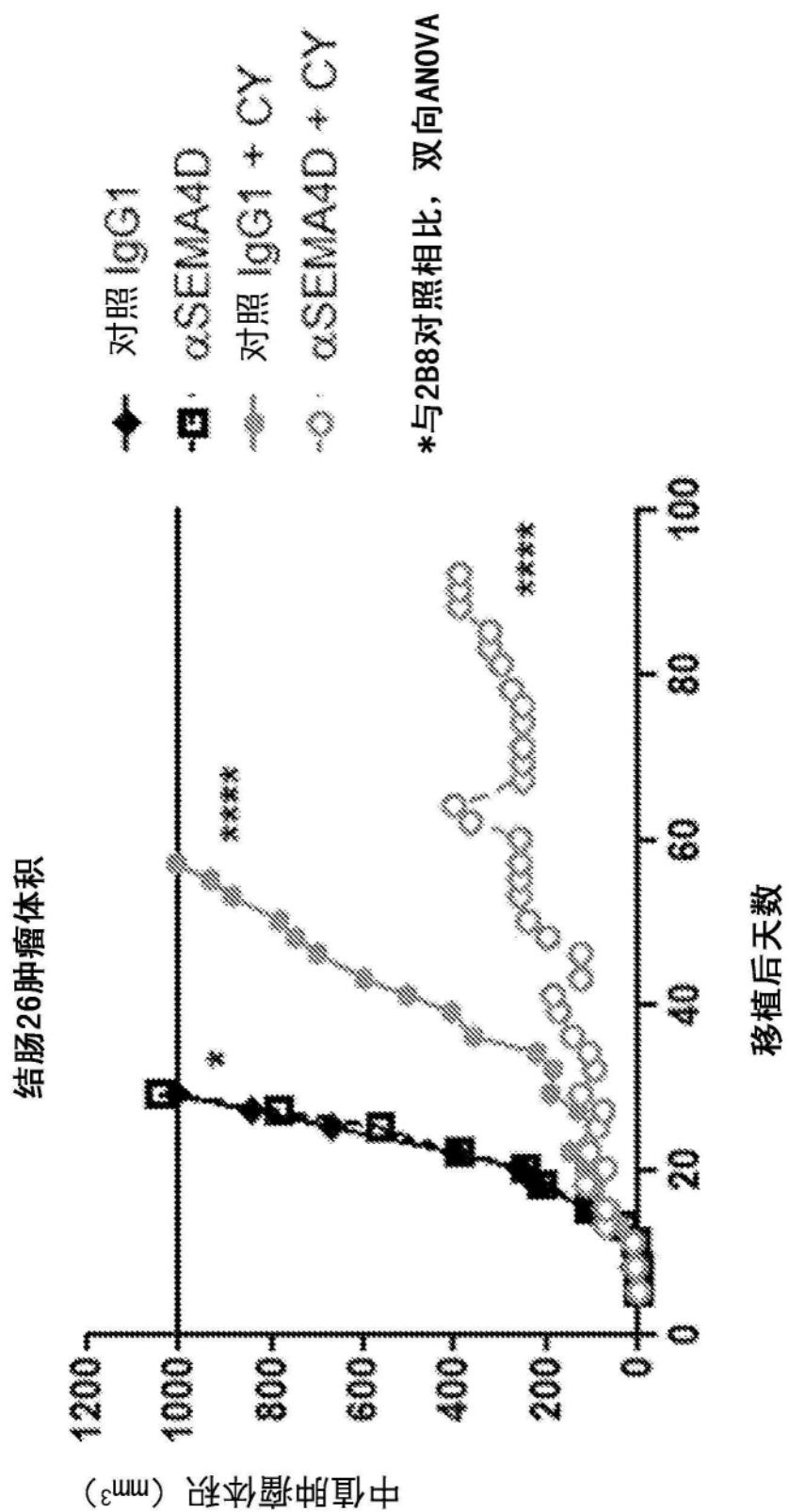


图8B

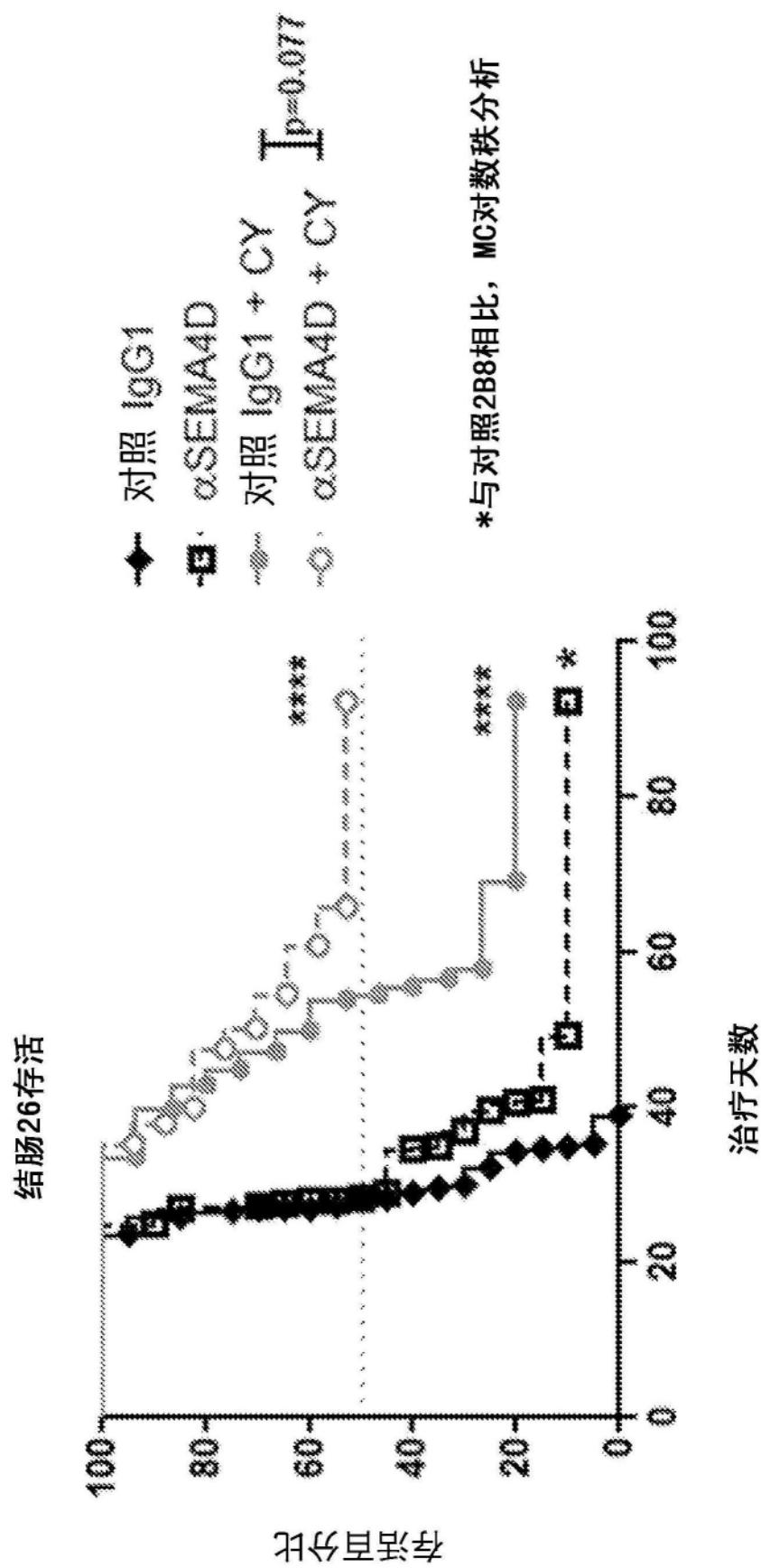


图8C

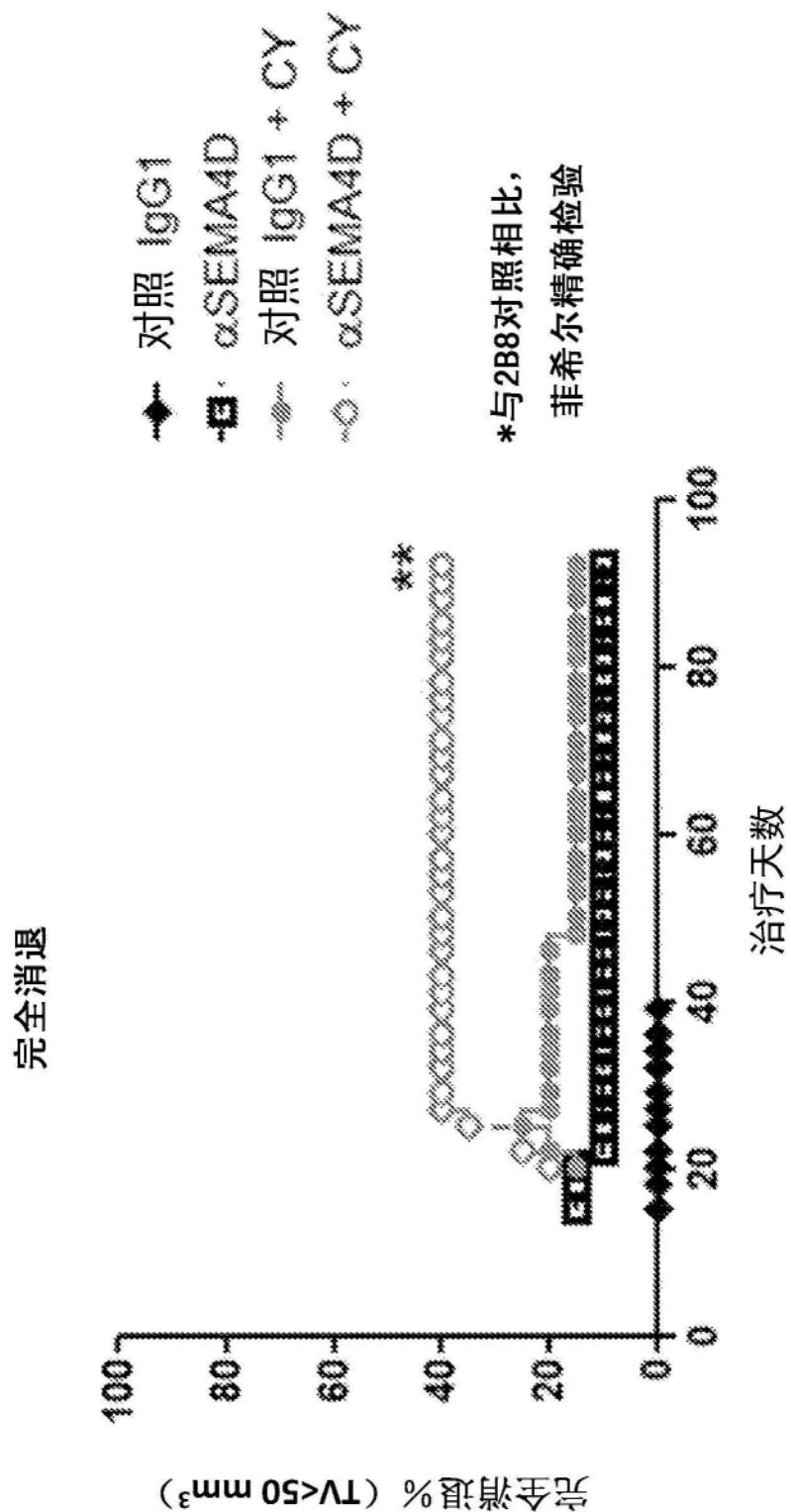


图8D

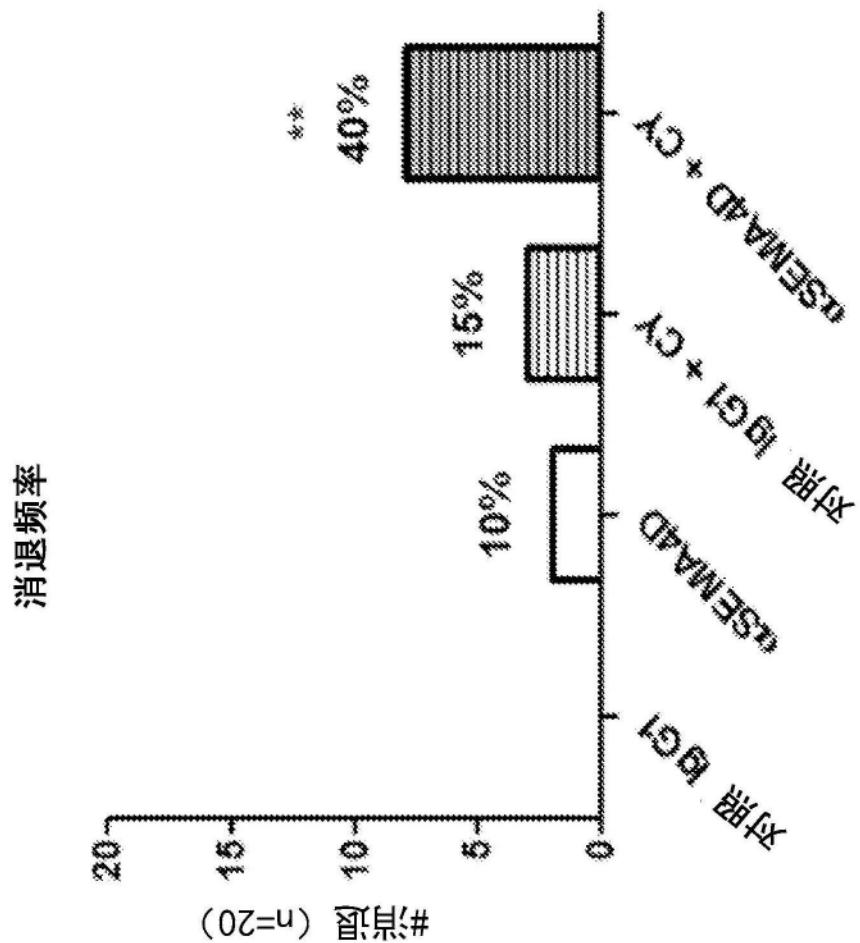


图8E

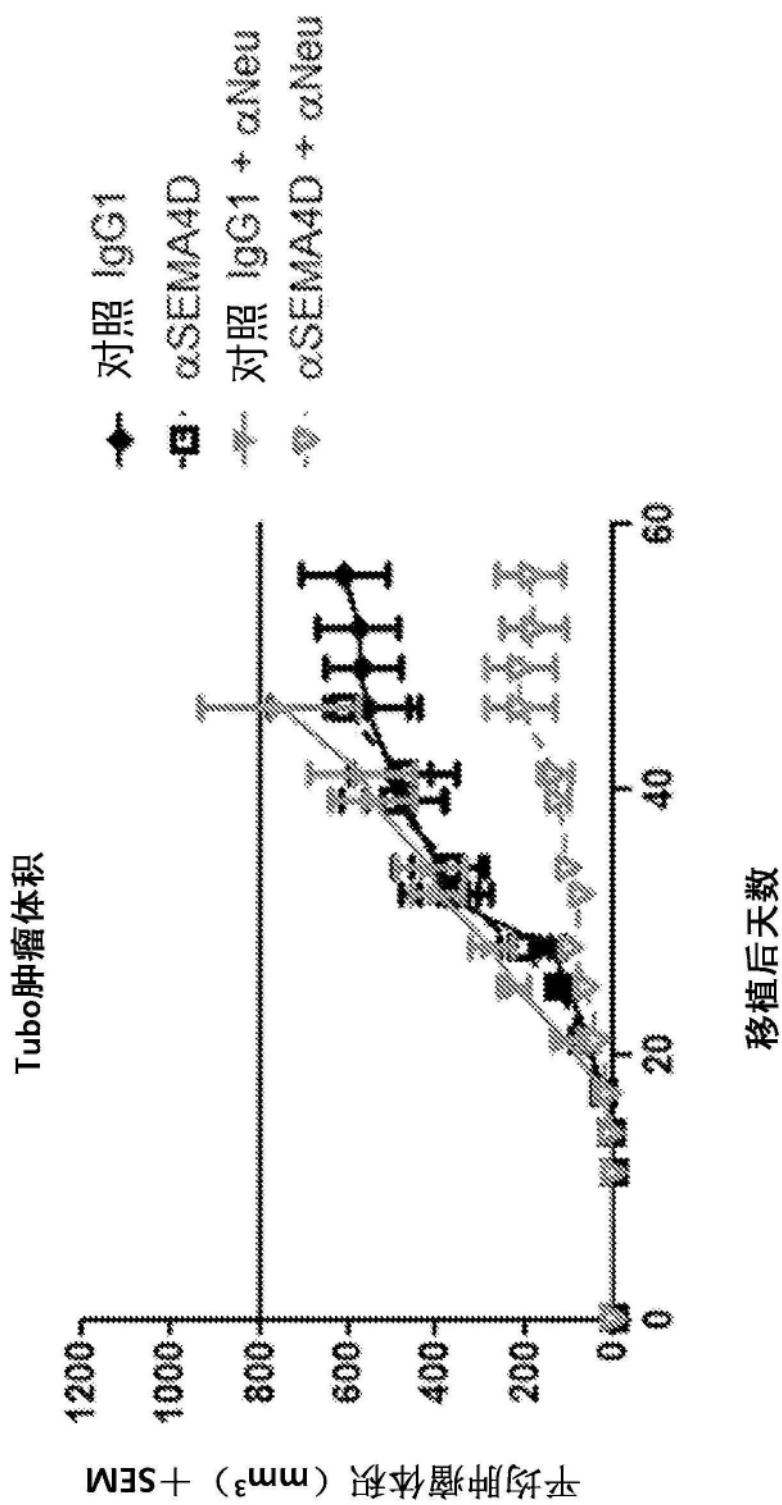


图9A

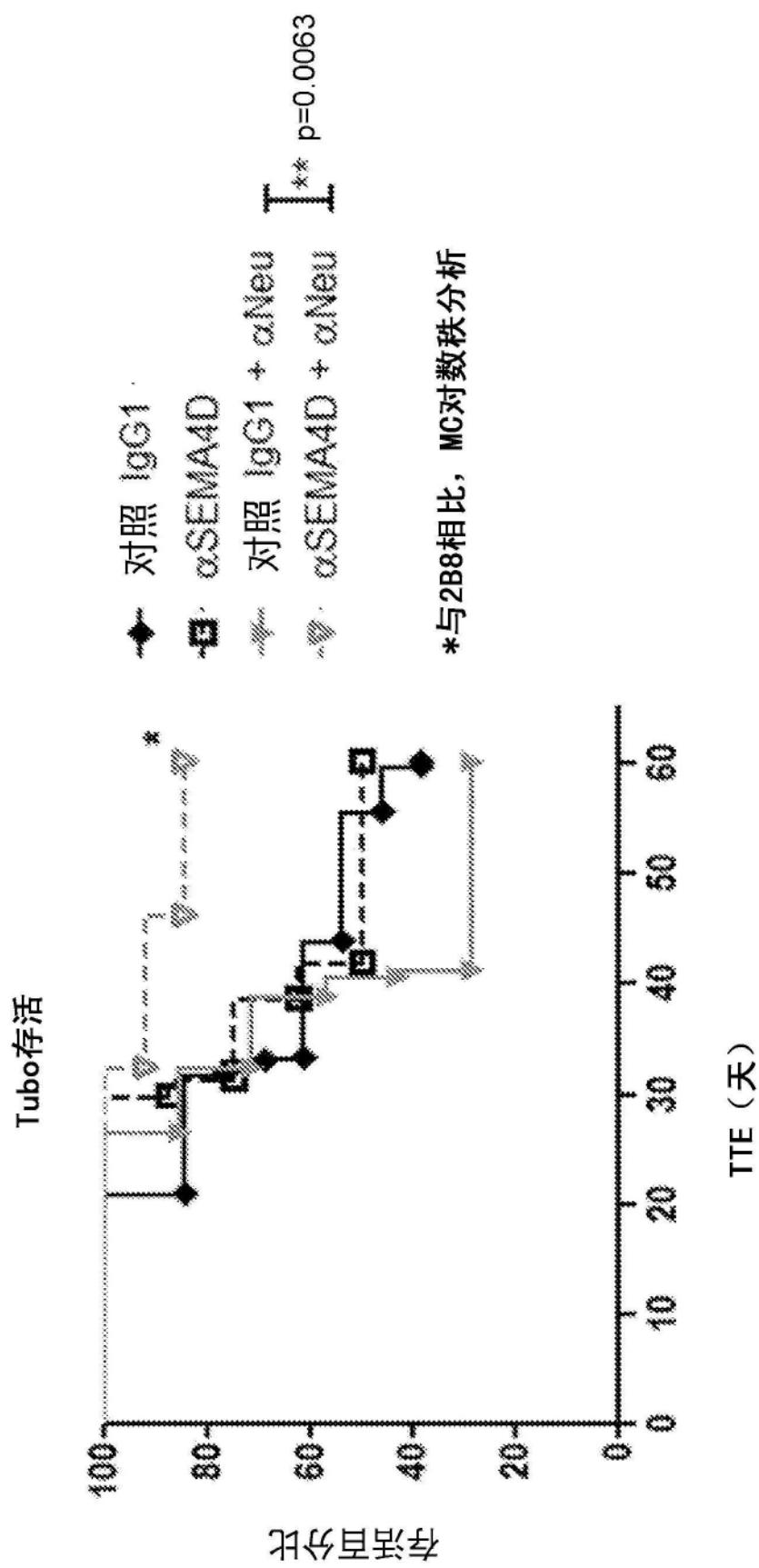


图9B

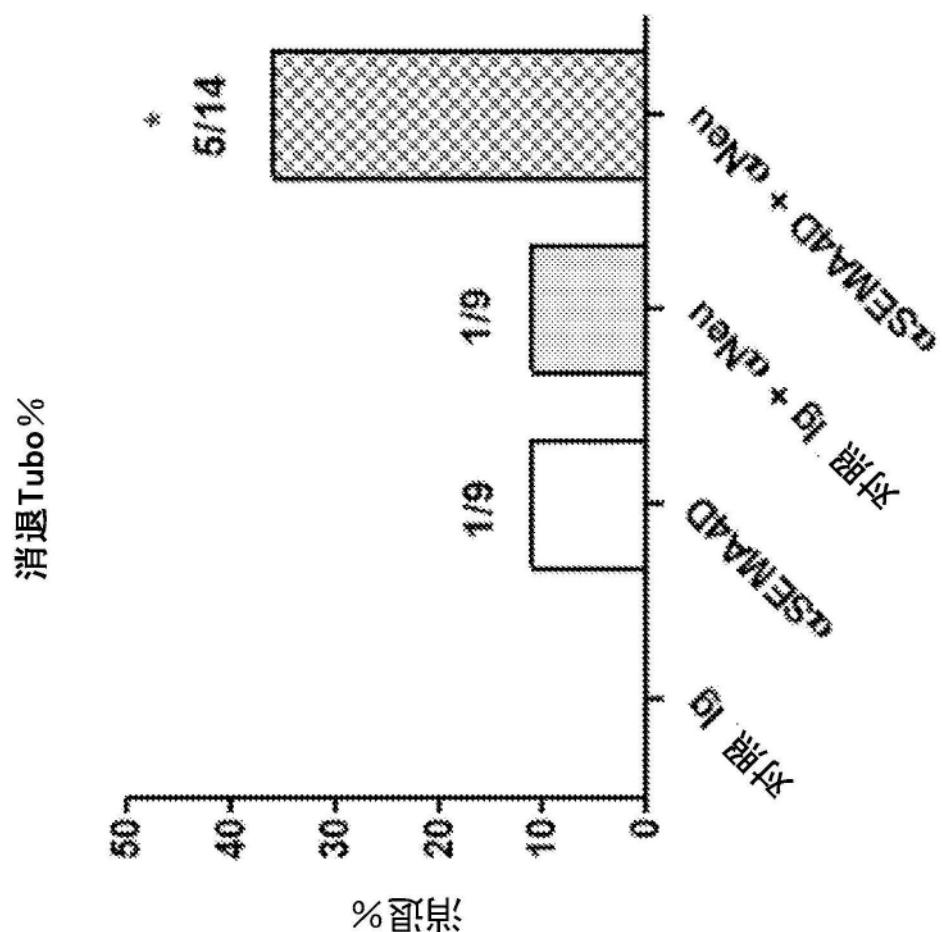


图9C

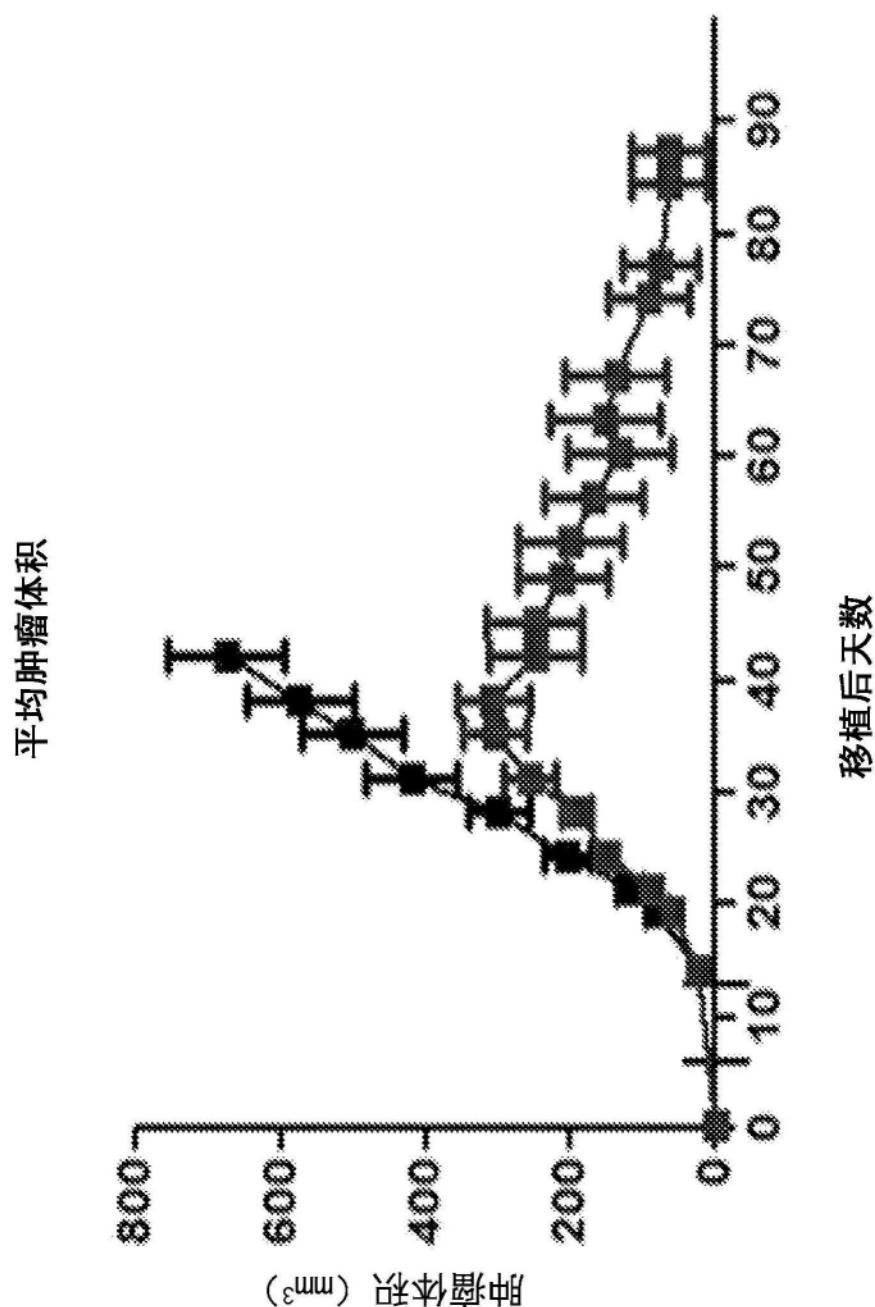


图10A

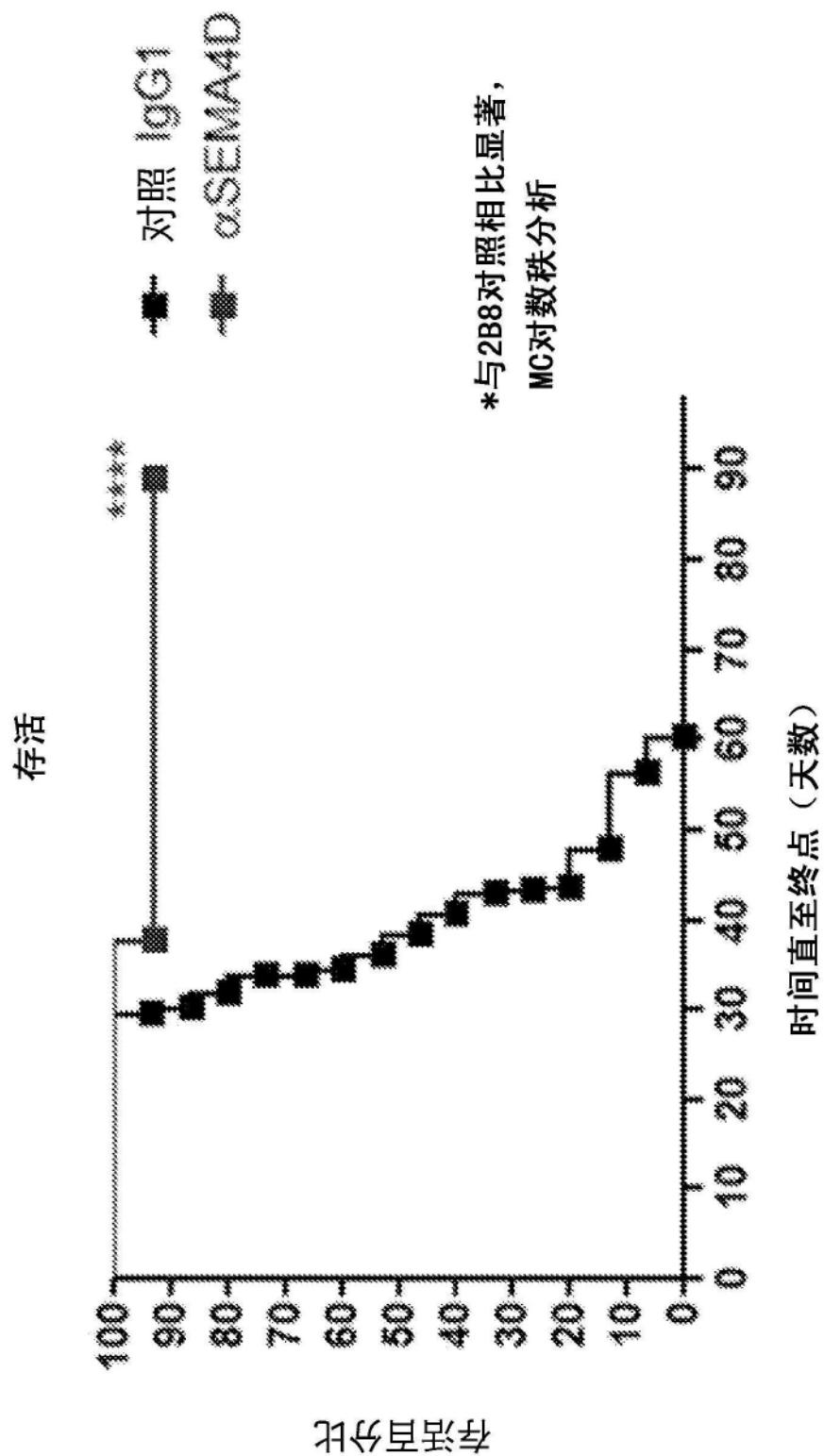


图10B

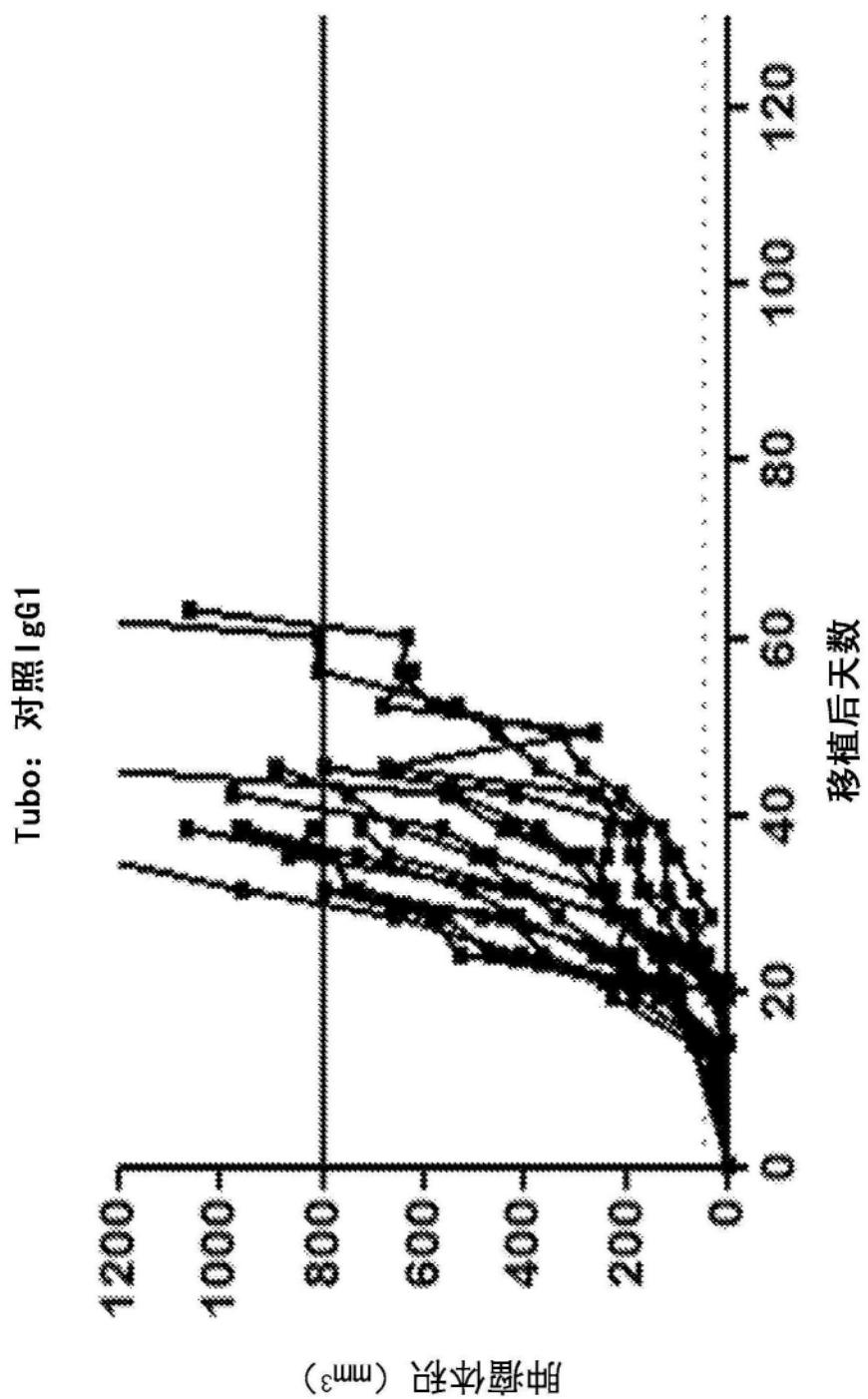
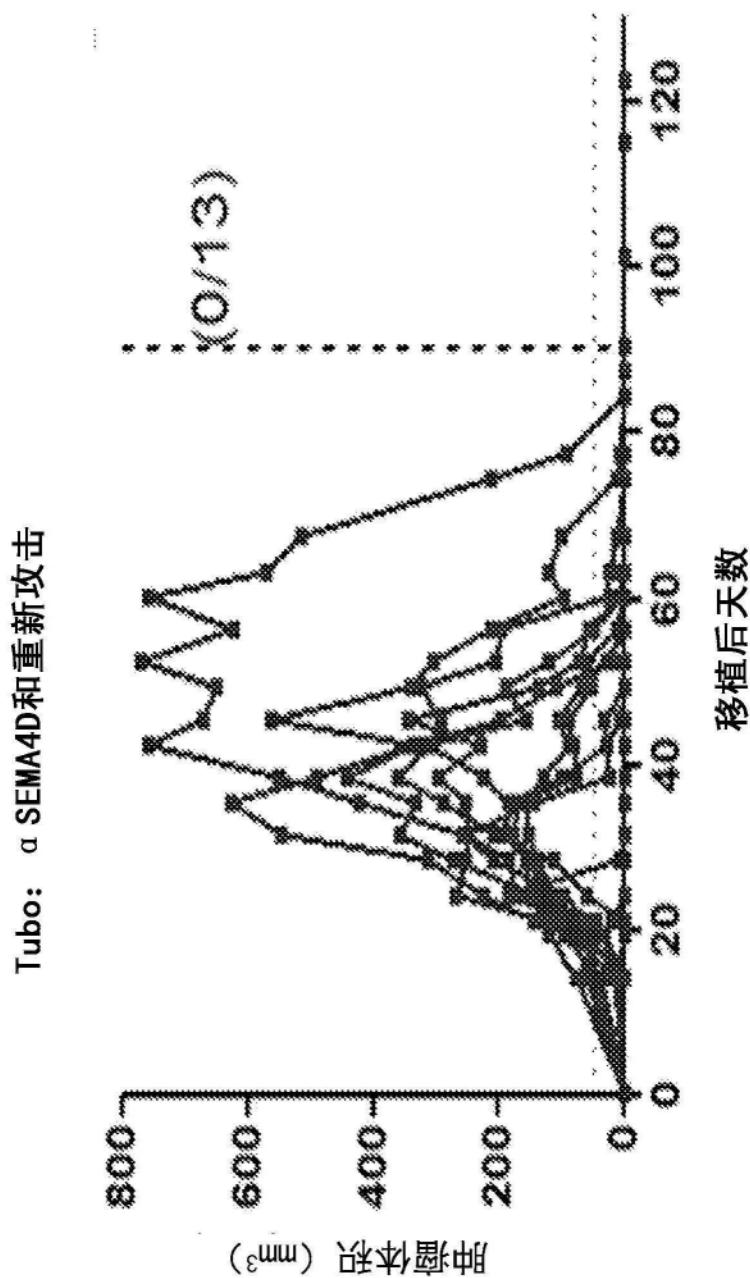


图10C



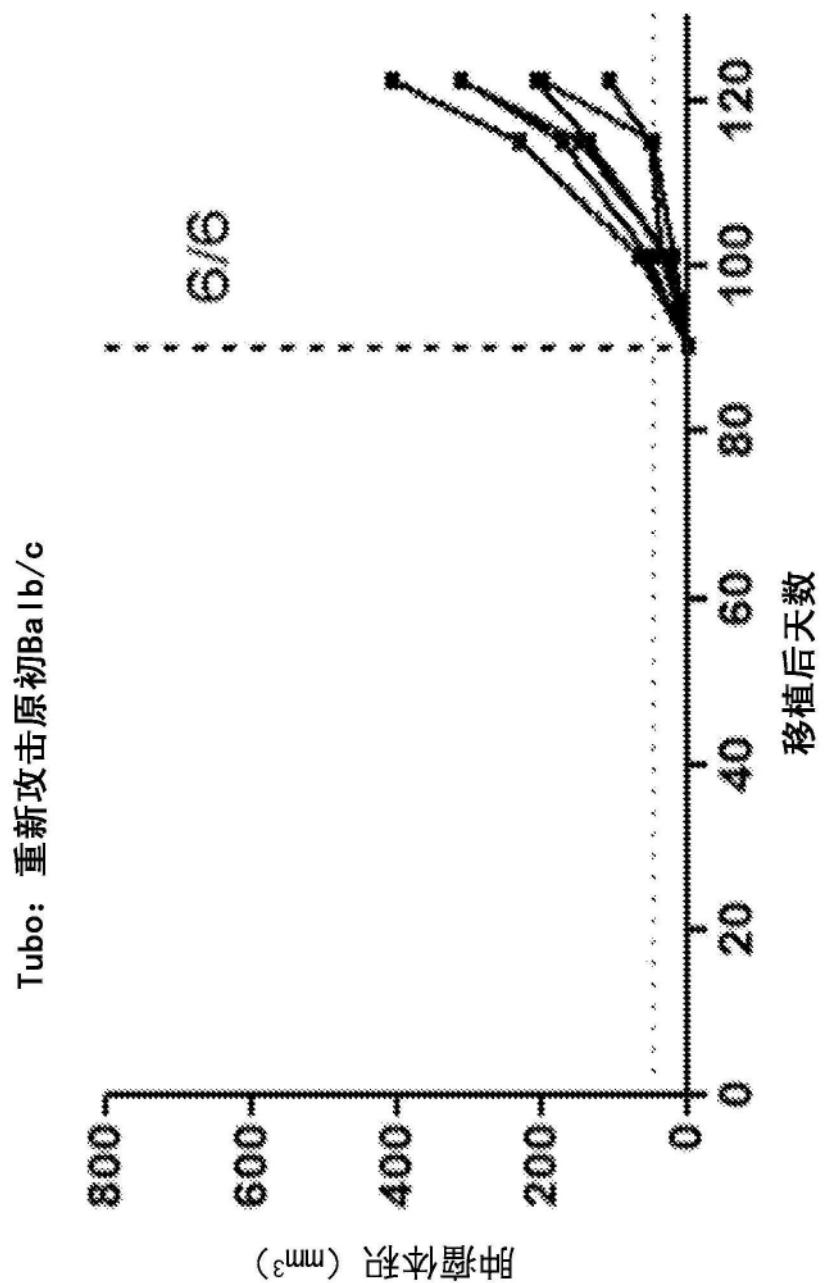


图10E

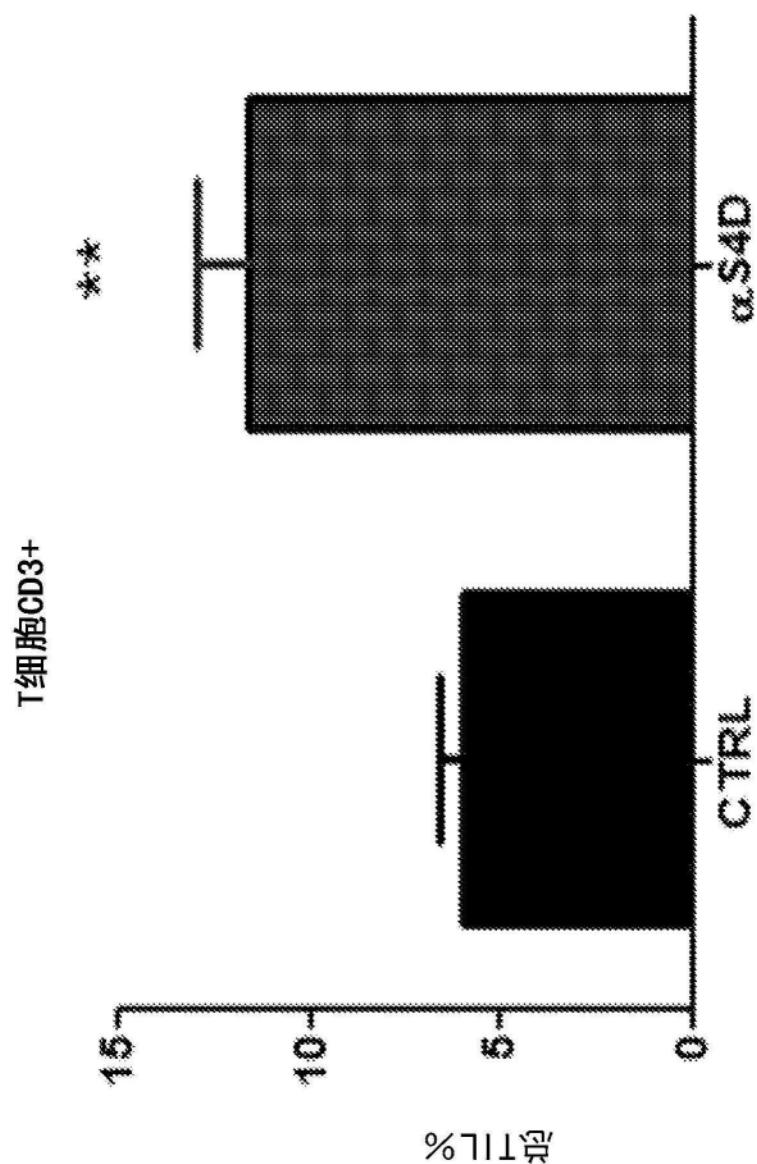


图11A

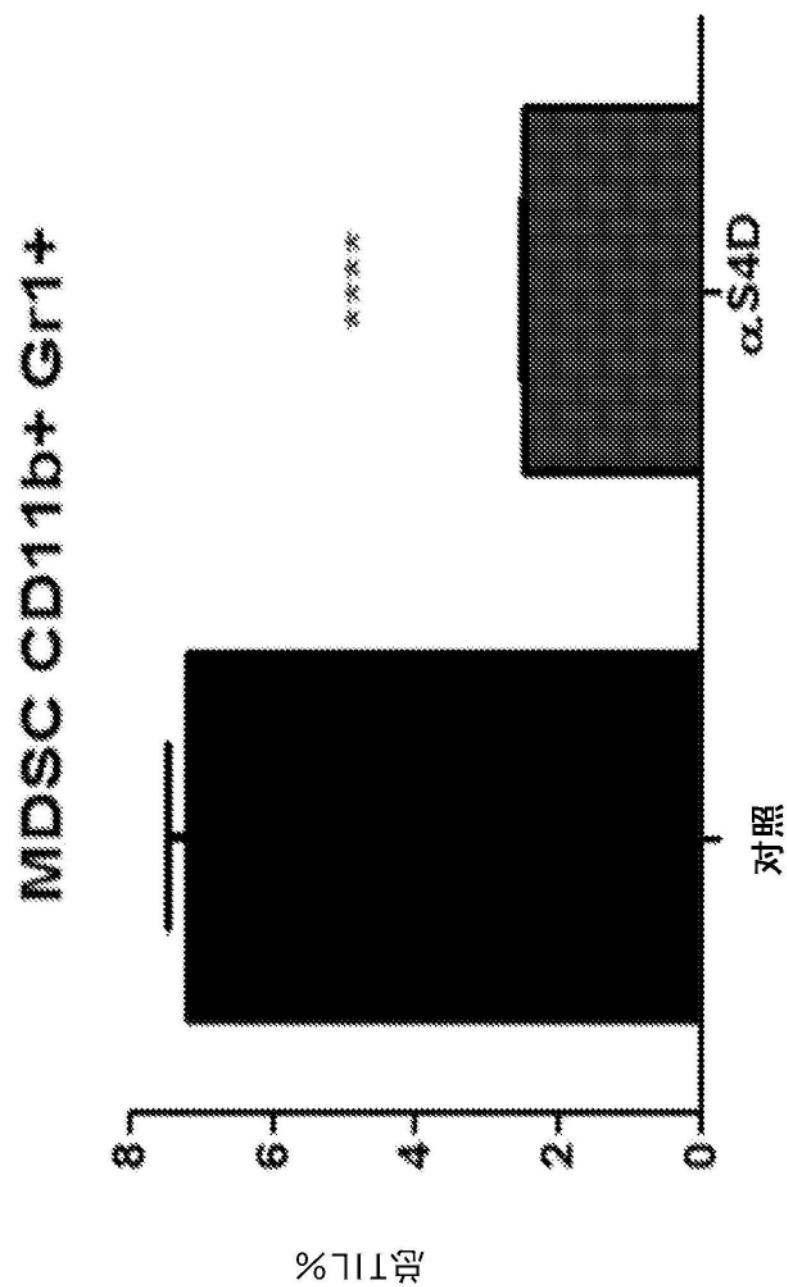


图11B

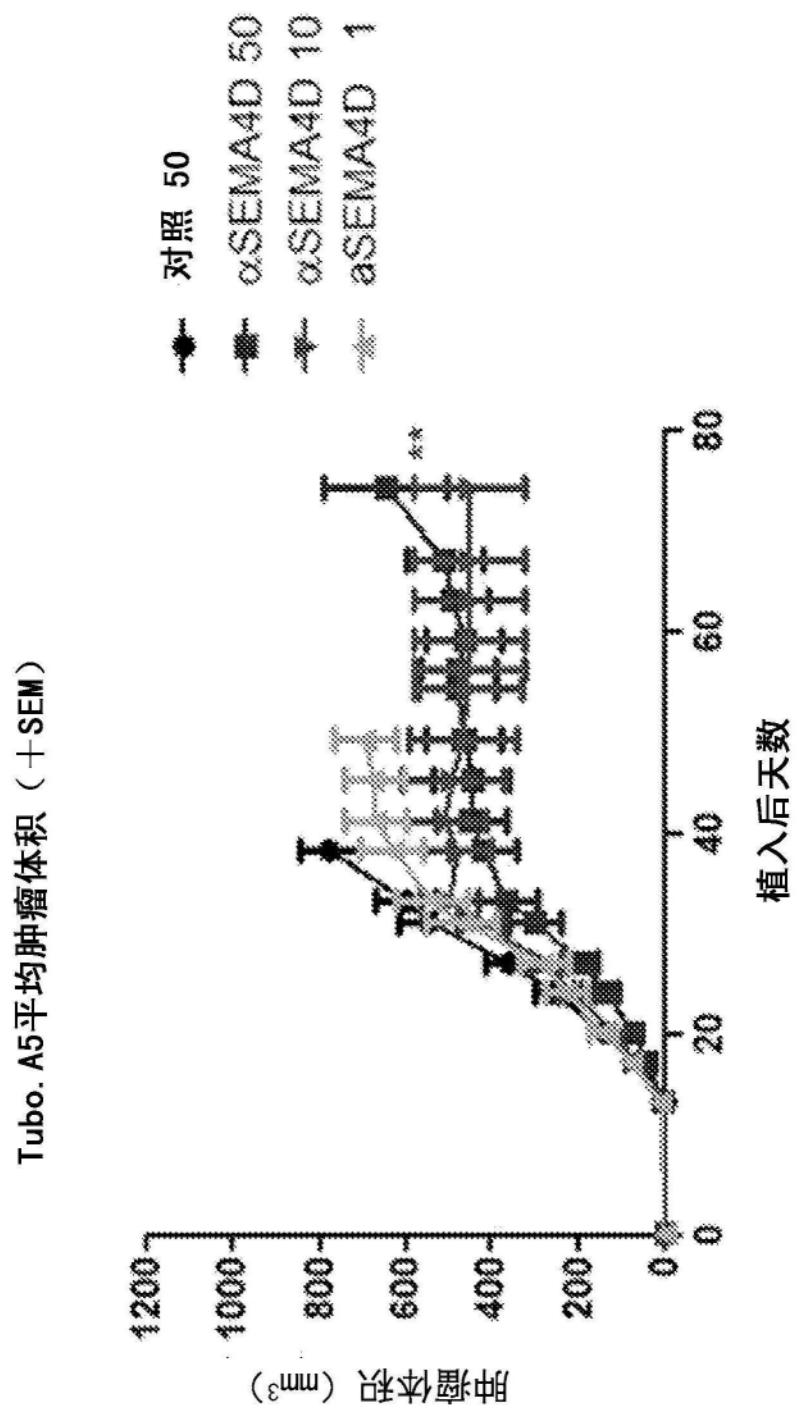


图12A

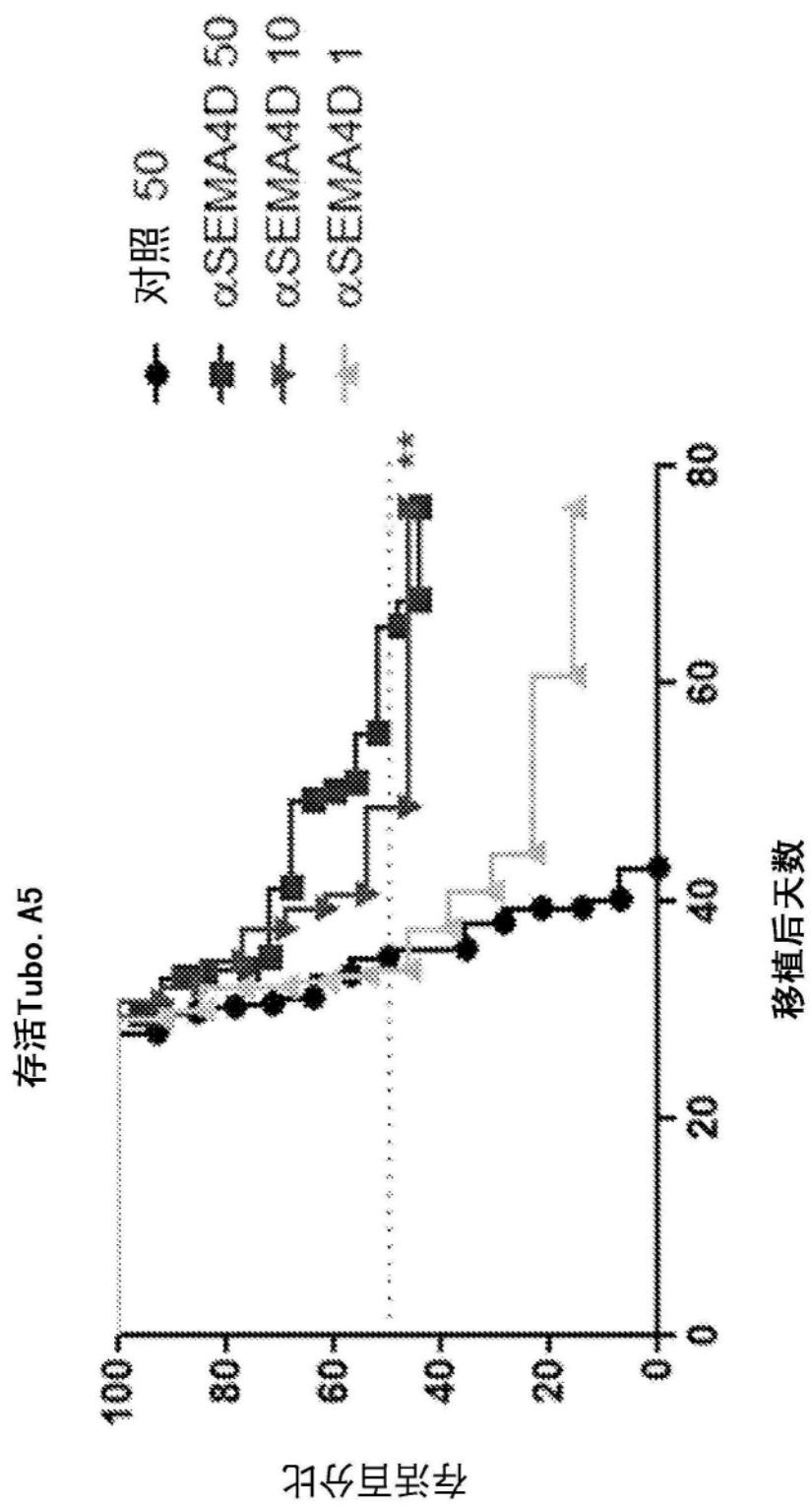


图12B

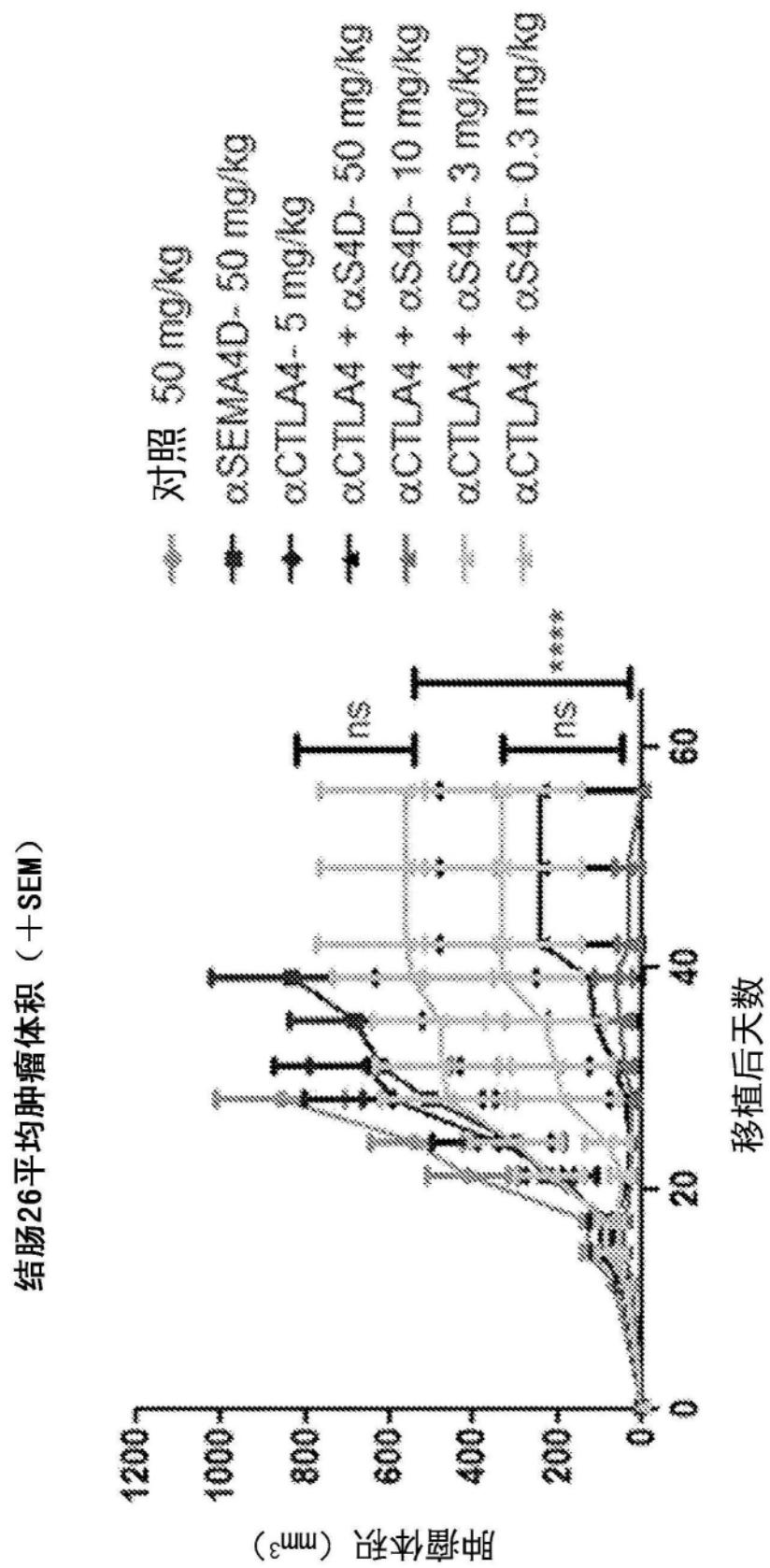


图12C

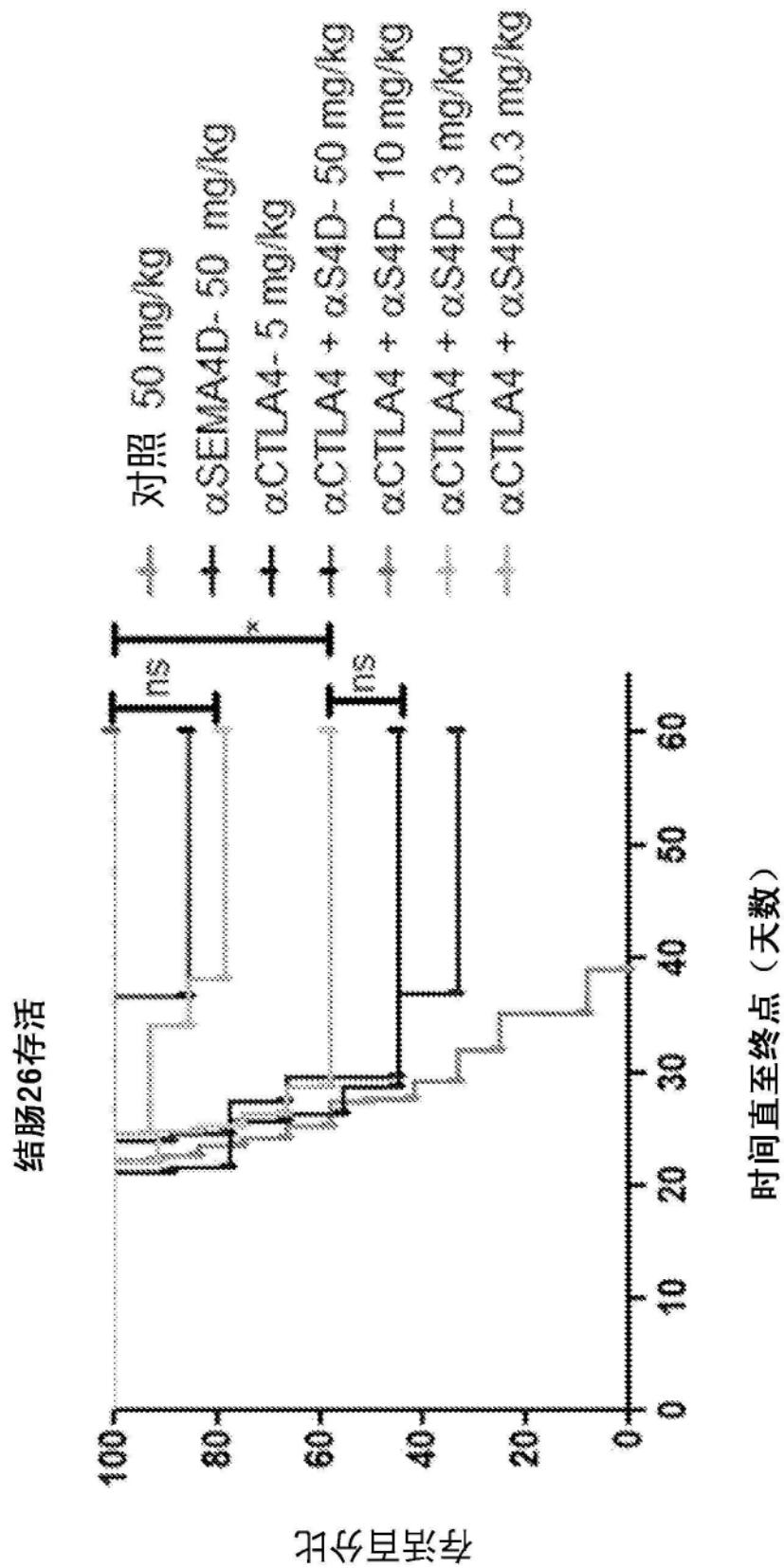


图12D

模型	治疗	完全肿瘤消退%			统计学 显著性*	肿瘤重新 攻击后的生长
		#小鼠	#研究	统计学 显著性*		
结肠26	对照	1%	(3/266)	18	--	ND
	$\alpha$ SEMA4D	7%	(21/289)	18	***	0/2
	$\alpha$ PD1	8%	(3/40)	2	p=0.065	ND
	$\alpha$ PD1 + $\alpha$ SEMA4D	28%	(11/40)	2	****	ND
	$\alpha$ CTLA4	20%	(14/69)	4	***	*
	$\alpha$ CTLA4 + $\alpha$ SEMA4D	74%	(43/58)	3	****	0/21
	$\alpha$ CTLA4 + aPD1	60%	(12/20)	1	****	**** ND
	环磷酰胺	10%	(3/30)	2	ns	0/3
Tubo乳腺癌	环磷酰胺 + $\alpha$ SEMA4D	40%	(8/20)	1	**	0/8
	对照	0	(0/27)	2	--	ND
	$\alpha$ SEMA4D	85%	(23/27)	2	****	0/13
	$\alpha$ CTLA4	23%	(3/13)	1	*	ND
	$\alpha$ PD1	0	(0/10)	1	ns	ND
	$\alpha$ CTLA4 + aPD1	14%	(2/14)	1	*	ND

\*统计学显著，菲希尔精确检验。棱镜报告结果， $P>0.05$ 时不显著 (ns) ,  $0.01 < P \leq 0.05$ 时显著 (标记为\*) ,  $0.001 < P \leq 0.01$ 时非常显著 (\*\*), 并且 $P \leq 0.001$ 时极显著 (\*\*\*) 。

图13