



República Federativa do Brasil  
Ministério da Economia  
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

**(21) BR 112019023138-2 A2**



\* B R 1 1 2 0 1 9 0 2 3 1 3 8 A 2 \*

**(22) Data do Depósito: 04/05/2018**

**(43) Data da Publicação Nacional: 28/07/2020**

**(54) Título: ANTICORPO 4D ANTI-SEMAFORINA HUMANO**

**(51) Int. Cl.: A61K 39/395; C07K 16/18; C07K 16/28.**

**(30) Prioridade Unionista: 05/05/2017 US 62/501,981.**

**(71) Depositante(es): VACCINEX, INC..**

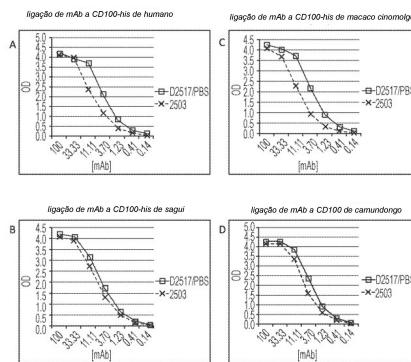
**(72) Inventor(es): ERNEST S. SMITH; ANGELICA CORNELISON; MARIA G.M. SCRIVENS; MARK PARIS; MAURICE ZAUDERER.**

**(86) Pedido PCT: PCT US2018031263 de 04/05/2018**

**(87) Publicação PCT: WO 2018/204895 de 08/11/2018**

**(85) Data da Fase Nacional: 04/11/2019**

**(57) Resumo:** São fornecidas composições e métodos para o tratamento de doenças associadas à patologia de semaforina-4D (SEMA4D), incluindo doenças autoimunes, doenças inflamatórias, cânceres, distúrbios neuroinflamatórios e doenças neurodegenerativas.



## "ANTICORPO 4D ANTI-SEMAFORINA HUMANO"

### REFERÊNCIA CRUZADA A PEDIDOS RELACIONADOS

[001] Este pedido reivindica o benefício do Pedido de Patente Provisória US Nº de Série 62/501.981, depositado em 5 de maio de 2017, que é incorporado ao presente documento por referência na sua totalidade.

### FUNDAMENTOS

[002] A Semaforina 4D (SEMA4D), também conhecida como CD100, é uma proteína transmembranar que pertence à família de genes semaforina. SEMA4D é expressa na superfície celular como um homodímero, mas após a ativação celular, o SEMA4D pode ser liberado da superfície celular por clivagem proteolítica para gerar sSEMA4D, uma forma solúvel da proteína, que também é biologicamente ativa. Ver Suzuki *et al.*, *Nature Rev. Immunol.* 3:159-167 (2003); Kikutani *et al.*, *Nature Immunol.* 9:17-23 (2008).

[003] A SEMA4D é expressa em altos níveis nos órgãos linfoides, incluindo o baço, o timo e os linfonodos, e em órgãos não linfoides, como o cérebro e os rins. Nos órgãos linfoides, o SEMA4D é abundantemente expresso em células T em repouso, mas apenas fracamente expresso em células B em repouso e nas células apresentadoras de antígeno (APCs), como as células dendríticas (DCs). Sua expressão, no entanto, é aumentada nessas células após a ativação por vários estímulos imunológicos. A liberação de SEMA4D solúvel a partir de células imunes também é aumentada pela ativação celular.

[004] SEMA4D foi implicado no desenvolvimento de certos tipos de câncer (Ch'ng *et al.*, *Cancer* 110:164-72 (2007); Campos *et al.*, *Oncology Letters* 5:1527-35 (2013); Kato *et al.*, *Cancer Sci.* 102:2029-37 (2011)) e vários relatórios sugerem que um mecanismo dessa influência é o papel da SEMA4D na promoção de angiogênese tumoral (Conrotto *et al.*, *Blood* 105:4321-4329 (2005). Basile *et al.*, *J Biol. Chem.* 282:34888-34895 (2007); Sierra *et al.*, *J. Exp. Med.* 205:1673 (2008); Zhou *et al.*,

*Angiogenesis* 15:391-407 (2012)). O crescimento e a metástase de um tumor envolvem um processo complexo de cross talk entre as células tumorais, o estroma e o infiltrado imunológico, bem como as células endoteliais e a vasculatura. A SEMA4D é superexpressa em uma ampla variedade de tipos de tumores e também é produzida por células inflamatórias recrutadas para o microambiente tumoral. Trabalhos recentes sugerem que a SEMA4D desempenha um papel na migração, sobrevivência, diferenciação e organização dos diferentes tipos de células que constituem o estroma do tumor (Evans *et al.*, *Cancer Immunol. Res.* 5:689-701 (2015)).

[005] A SEMA4D está implicada em distúrbios neurodegenerativos, doenças autoimunes, doenças desmielinizantes e câncer. No sistema nervoso central (CNS), a SEMA4D é expressa em, por exemplo, células imunes infiltrativas e células precursoras de oligodendrócitos e seus receptores são expressos em, por exemplo, neurônios, oligodendrócitos, astrócitos e células endoteliais (Okuno, T., *et al.*, *J. Immunol.* 184:1499-1506 (2010)). A SEMA4D pode servir como uma molécula de orientação axonal (Swiercz *et al.*, *Neuron* 35:51-63 (2002)) e pode mediar o desenvolvimento de sinapses GABAérgicas e glutamatérgicas (Paradis *et al.*, *Neuron* 53:217-232 (2007)) entre outras atividades.

[006] Também foi demonstrado que a SEMA4D desempenha um papel na migração e diferenciação de células precursoras de neurônios e oligodendrócitos, inflamação do SNC e neurodegeneração. Por exemplo, camundongos deficientes em SEMA4D são resistentes ao desenvolvimento de encefalomielite autoimune experimental (EAE) (Kumanogoh A *et al.*, *Immunity* 13:621-631 (2000)) e o bloqueio de SEMA4D pode inibir a ativação microglial e a neuroinflamação na EAE (Okuno, T., *et al.*, *J. Immunol.* 184:1499-1506 (2010)). Da mesma forma, a estimulação de SEMA4D das células endoteliais pode levar à produção da citocina pró-inflamatória IL-8 (Yang, YH *et al.*, *PLoS One* 6:e25826 (2011)).

[007] Publicações recentes demonstraram a eficácia de moléculas de ligação

anti-SEMA4D, por exemplo, anticorpos ou seus fragmentos de ligação a antígeno no tratamento de câncer e de doenças neuroinflamatórias/neurodegenerativas. Por exemplo, recentes ensaios clínicos de fase I com o anticorpo anti-SEMA4D VX15/2503 demonstraram segurança e eficácia no tratamento de tumores sólidos. Ver, por exemplo, Patnaik, A., *et al.* *Clin. Cancer Res.* 22:827-836 (2016) e Southwell AL, *et al.*, *Neurobiol. Dis* 76:46-56 (2015). Contudo, permanece a necessidade de anticorpos anti-SEMA4D adicionais com perfis modificados e/ou aprimorados, por exemplo, no que diz respeito às características de ligação, imunogenicidade e/ou potência.

## SUMÁRIO

[008] Esta divulgação fornece composições e métodos para o tratamento de doenças associadas à patologia de semaforina-4D (SEMA4D), como doenças autoimunes, doenças inflamatórias, cânceres, doenças neuroinflamatórias e distúrbios neurodegenerativos. De acordo com aspectos da divulgação ilustrada neste documento, são fornecidos anticorpos ou seus fragmentos de ligação a antígeno que se ligam especificamente a SEMA4D. De acordo com outros aspectos da divulgação ilustrada neste documento, é fornecido um método para o tratamento de um sujeito com uma doença autoimune, doença inflamatória, câncer, doença neuroinflamatória e distúrbio neurodegenerativo, incluindo a administração ao sujeito de uma quantidade eficaz de um anticorpo ou fragmento de ligação a antígeno que se liga especificamente à SEMA4D e neutraliza a atividade da SEMA4D.

[009] Em certos aspectos, o anticorpo ou seu fragmento de ligação ao antígeno que se liga especificamente ao SEMA4D inclui uma região variável de cadeia pesada (VH) e uma região variável de cadeia leve (VL); em que a VH inclui regiões determinantes de complementaridade (HCDRs) HCDR1, HCDR2 e HCDR3 que incluem sequências de aminoácidos idênticas ou idênticas, exceto por uma, duas, três ou quatro substituições de aminoácidos em uma, duas ou todas as três HCDRs para

SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 e SEQ ID NO: 4, respectivamente; e em que a VL inclui regiões determinantes de complementaridade (LCDRs) LCDR1, LCDR2 e LCDR3 que incluem sequências de aminoácidos idênticas ou idênticas, exceto por uma, duas, três ou quatro substituições de aminoácidos em uma, duas ou todas as três LCDRs para SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7 e SEQ ID NO: 8, respectivamente.

[010] Em certos aspectos, o anticorpo anti-SEMA4D ou seu fragmento de ligação ao antígeno inclui as regiões determinantes da complementaridade de VH HCDR1, HCDR2 e HCDR3 que incluem sequências de aminoácidos idênticas às SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 e SEQ ID NO: 4, respectivamente, e regiões determinantes de complementaridade de VL LCDR1, LCDR2 e LCDR3 que incluem sequências de aminoácidos idênticas às SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7 e SEQ ID NO: 8, respectivamente.

[011] Em certos aspectos, o anticorpo anti-SEMA4D ou seu fragmento de ligação ao antígeno inclui uma VH que inclui regiões de estrutura (HFWs) HFW1, HFW2, HFW3 e HFW4 e a VL que inclui regiões de estrutura (LFWs) LFW1, LFW2, LFW3 e LFW4. Em certos aspectos, as regiões framework podem ser derivadas de um anticorpo humano ou de um anticorpo não humano.

[012] Em certos aspectos, o anticorpo anti-SEMA4D ou seu fragmento de ligação ao antígeno inclui uma VH que inclui a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 1. Em certos aspectos, o anticorpo anti-SEMA4D ou seu fragmento de ligação ao antígeno inclui uma VL que inclui a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 5. Em certos aspectos, o anticorpo anti-SEMA4D ou seu fragmento de ligação ao antígeno inclui uma VH e VL que inclui a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 1 e SEQ ID NO: 5, respectivamente.

[013] Em certos aspectos, a VH do anticorpo anti-SEMA4D ou seu fragmento de ligação ao antígeno aqui fornecido inclui uma sequência de aminoácidos pelo menos 80%, 85%, 90%, 95% ou 100% idêntica à SEQ ID NO: 1. Em certos aspectos,

a VL do anticorpo anti-SEMA4D ou seu fragmento de ligação ao antígeno aqui fornecido inclui uma sequência de aminoácidos pelo menos 80%, 85%, 90%, 95% ou 100% idêntica à SEQ ID NO: 5. Em certos aspectos, a VH pode incluir uma sequência de aminoácidos pelo menos 80%, 85%, 90%, 95% ou 100% idêntica à SEQ ID NO: 1, e a VL pode incluir uma sequência de aminoácidos pelo menos 80%, 85%, 90%, 95% ou 100% idêntica à SEQ ID NO: 5.

[014] Em certos aspectos, o anticorpo anti-SEMA4D ou seu fragmento aqui fornecido inclui uma região constante de cadeia pesada ou seu fragmento fundido ao terminal C da VH. Em certos aspectos, a região constante de cadeia pesada ou seu fragmento é uma região constante de cadeia pesada humana. Em certos aspectos, a região constante de cadeia pesada ou seu fragmento pode ser uma região constante de IgG4 humana. Em certos aspectos, a região constante de cadeia pesada ou seu fragmento é uma região constante não humana. Em certos aspectos, a região constante de cadeia pesada ou seu fragmento é uma região constante de IgG1 murina. Em certos aspectos, o anticorpo anti-SEMA4D ou seu fragmento inclui uma VH e VL, em que a região constante de cadeia leve ou seu fragmento é fundido ao terminal C da VL. Em certos aspectos, o anticorpo anti-SEMA4D ou seu fragmento aqui fornecido inclui uma região constante de cadeia leve ou seu fragmento fundido ao terminal C da VL. Em certos aspectos, a região constante de cadeia leve é uma região constante de cadeia leve humana, por exemplo, uma região constante de cadeia leve lambda humana ou kappa humana. Em certos aspectos, a região constante de cadeia leve é uma região constante de cadeia leve não humana, por exemplo, uma região constante de cadeia leve lambda murina.

[015] Em certos aspectos, o anticorpo anti-SEMA4D ou seu fragmento aqui fornecido pode ser um fragmento Fab, um fragmento Fab', um fragmento F(ab')2, um fragmento Fd, um fragmento Fv de cadeia única (scFv), ou um fragmento Fv ligado a dissulfeto (sdFv). Em certos aspectos, o anticorpo anti-SEMA4D ou seu fragmento

podem ser multiespecíficos, por exemplo, biespecíficos.

[016] Em certos aspectos, o anticorpo anti-SEMA4D ou seu fragmento aqui fornecido pode se ligar especificamente ao SEMA4D humano, SEMA4D de camundongo, SEMA4D de rato e/ou SEMA4D de primata não humano, por exemplo, SEMA4D de macaco cinomolgo e/ou SEMA4D de sagui. Em certos aspectos, o anticorpo anti-SEMA4D ou seu fragmento aqui fornecido pode se ligar a SEMA4D, por exemplo, SEMA4D humano, SEMA4D de camundongo, SEMA4D de rato e/ou SEMA4D de primata não humano, por exemplo, SEMA4D de macaco cinomolgo e/ou SEMA4D de sagui, com uma afinidade caracterizada por uma constante de dissociação KD não superior a 500 nM, 100 nM, 50,0 nM, 40,0 nM, 30,0 nM, 20,0 nM, 10,0 nM, 9,0 nM, 8,0 nM, 7,0 nM, 6,0 nM, 5,0 nM, 4,0 nM, 3,0 nM, 2,0 nM, 1,0 nM, 0,50 nM, 0,10 nM, 0,050 nM, 0,01 nM, 0,005 nM ou 0,001 nM

[017] Em certos aspectos, o anticorpo anti-SEMA4D ou seu fragmento aqui fornecido pode inibir a ligação de SEMA4D a um receptor SEMA4D, por exemplo, Plexin-B1, Plexin-B2, CD72 ou qualquer combinação deles.

[018] Em certos aspectos, o anticorpo anti-SEMA4D ou seu fragmento provoca resposta imune mínima ou inexistente após a administração a um indivíduo.

[019] Em certos aspectos, o anticorpo anti-SEMA4D ou seu fragmento inclui uma fração heteróloga fundida ou conjugada a ele. Em certos aspectos, a fração heteróloga pode ser, por exemplo, um polipeptídeo, um agente citotóxico, um agente terapêutico, um pró-fármaco, um lipídio, um carboidrato, um ácido nucleico, um marcador detectável, um polímero ou qualquer combinação deles. Em certos aspectos, a fração heteróloga pode incluir uma molécula de ligação, uma enzima, uma citocina, uma linfocina, um peptídeo hormonal ou qualquer combinação dos mesmos. Em outro aspecto, a fração heteróloga pode incluir um radionuclídeo, uma toxina biológica, uma toxina enzimaticamente ativa ou qualquer combinação deles. Em outro aspecto, a fração heteróloga pode incluir uma enzima, um marcador fluorescente, um

marcador quimioluminescente, um rótulo bioluminescente, um rótulo radioativo ou qualquer combinação deles.

[020] Em certos aspectos, a divulgação fornece uma composição farmacêutica que inclui o anticorpo anti-SEMA4D ou seu fragmento aqui fornecido, e um carreador.

[021] Em certos aspectos, a divulgação fornece um polinucleotídeo isolado ou combinação de polinucleotídeos que inclui uma ou mais sequências de ácidos nucleicos que codificam o anticorpo anti-SEMA4D ou seu fragmento. Em outro aspecto, o polinucleotídeo ou combinação de polinucleotídeos inclui uma sequência de ácido nucleico que codifica a VH do anticorpo anti-SEMA4D ou seu fragmento. Em outro aspecto, o polinucleotídeo ou combinação de polinucleotídeos inclui uma sequência de ácido nucleico que codifica a VL do anticorpo anti-SEMA4D ou seu fragmento. Em outro aspecto, o polinucleotídeo ou combinação de polinucleotídeos inclui uma sequência de ácido nucleico que codifica a VH e VL do anticorpo anti-SEMA4D ou seu fragmento. Em ainda outro aspecto, a divulgação fornece um vetor que inclui o polinucleotídeo que inclui uma ou mais sequências de ácidos nucleicos que codificam o anticorpo anti-SEMA4D ou seu fragmento. Em outro aspecto, a divulgação fornece uma célula hospedeira que inclui o vetor. Em outro aspecto, a divulgação fornece um método para produzir o anticorpo anti-SEMA4D ou seu fragmento.

[022] Em um certo aspecto do método fornecido, o anticorpo anti-SEMA4D ou fragmento de ligação ao antígeno neutraliza a SEMA4D em um sujeito humano.

[023] De acordo com aspectos aqui ilustrados, a divulgação fornece um método para o tratamento de um sujeito com uma doença ou distúrbio autoimune, uma doença ou distúrbio inflamatório, câncer, uma doença ou distúrbio neuroinflamatório, uma doença ou distúrbio neurodegenerativo ou qualquer combinação dos mesmos, incluindo administrar ao sujeito uma quantidade eficaz de

um anticorpo ou fragmento de ligação a antígeno que se liga especificamente a SEMA4D e neutraliza a atividade de SEMA4D. Em certos aspectos, a doença ou distúrbio neuroinflamatório é esclerose múltipla. Em certos aspectos, a doença ou distúrbio neurodegenerativo é acidente vascular cerebral, doença de Alzheimer, doença de Parkinson, doença de Huntington, síndrome de Down, ataxia, esclerose lateral amiotrófica (ELA), demência frontotemporal (DFT), comprometimento cognitivo relacionado ao HIV, lúpus do SNC, comprometimento cognitivo leve ou uma combinação dos mesmos. Em certos aspectos, a doença autoimune ou inflamatória é artrite. Em certos aspectos, a doença autoimune ou inflamatória é artrite reumatoide.

#### BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS/FIGURAS

[024] A FIGURA 1A compara a ligação de MAbD2517 e MAbVX15/2503 (ambas formuladas em PBS) a SEMA4D humano, conforme medido por ELISA.

[025] A FIGURA 1B compara a ligação de MAbD2517 e MAbVX15/2503 (ambas formuladas em PBS) a SEMA4D de macaco cinomolgo conforme medido por ELISA.

[026] A FIGURA 1C compara a ligação de MAbD2517 e MAbVX15/2503 (ambas formuladas em PBS) a SEMA4D de sagui conforme medido por ELISA.

[027] A FIGURA 1D compara a ligação de MAbD2517 e MAbVX15/2503 (ambas formuladas em PBS) a SEMA4D de camundongo, conforme medido por ELISA.

[028] A FIGURA 2A mostra a capacidade do MAbD2517 de bloquear a SEMA4D humana da ligação às células 293PLXNB1 em comparação com o MAbVX 15/2503.

[029] A FIGURA 2B mostra a capacidade do MAbD2517 de bloquear a SEMA4D do macaco cinomolgo da ligação às células 293PLXNB1 em comparação com o MAbVX15/2503.

[030] A FIGURA 2C mostra a capacidade do MAbD2517 de bloquear a

SEMA4D de camundongo de se ligar a células 293PLXNB1 em comparação com o MAbVX 15/2503.

[031] A FIGURA 2D mostra a capacidade do MAbD2517 de bloquear a SEMA4D de rato de se ligar às células 293PLXNB1 em comparação com o MAbVX 15/2503.

[032] A FIGURA 3A mostra a medição do volume do tumor em camundongos Balb/c tratados com IgG1/2B8 de camundongo de controle ou com um anticorpo quimérico MAbD2585 (10 mg/kg, IP, X5 semanal).

[033] A FIGURA 3B mostra o tempo de sobrevivência de camundongos Balb/c tratados com IgG1/2B8 de camundongo de controle ou anticorpo quimérico MAbD2585.

[034] A FIGURA 3C mostra a frequência de regressões tumorais em camundongos Balb/c tratados com IgG1/2B8 de camundongo de controle ou anticorpo quimérico MAbD2585.

## DESCRÍÇÃO DETALHADA

### Definições

[035] Deve ser notado que o termo "um" ou "uma" entidade refere-se a uma ou mais dessa entidade; por exemplo, "uma molécula de ligação," é entendido como representando uma ou mais moléculas de ligação. Como tal, os termos "um" (ou "uma"), "um ou mais" e "pelo menos um" podem ser usados de forma intercambiável neste documento.

[036] Além disso, "e/ou", onde usado neste documento, deve ser tomado como divulgação específica de cada uma das duas características especificadas ou componentes com ou sem a outra. Assim, o termo "e/ou" como usado em uma frase tal como "A e/ou B" neste documento se destina a incluir "A e B", "A ou B", "A" (por si só) e "B" (por si só). Da mesma forma, o termo "e/ou", conforme usado em uma expressão tal como "A, B e/ou C" destina-se a abranger cada um das seguintes

modalidades: A, B e C; A, B ou C; A ou C; A ou B; B ou C; A e C; A e B; B e C; A (por si só); B (por si só); e C (por si só).

[037] A menos que definido de outra forma, termos técnicos e científicos utilizados neste documento têm o mesmo significado como comumente compreendido por alguém ordinariamente versado na técnica à qual é associada esta divulgação. Por exemplo, o Concise Dictionary of Biomedicine and Molecular Biology, Juo, Pei-Show, 2<sup>a</sup> ed., 2002, CRC Press; The Dictionary of Cell and Molecular Biology, 3<sup>a</sup> ed., 1999, Academic Press; e o Oxford Dictionary Of Biochemistry And Molecular Biology, Revisado, 2000, Oxford University Press, fornecem àquele versado na técnica um dicionário geral de muitos dos termos usados nesta divulgação.

[038] As unidades, prefixos e símbolos são indicados em sua forma aceita pelo Sistema Internacional de Unidades (SI). Os intervalos numéricos incluem os números que definem o intervalo. A menos que indicado de outra forma, sequências de aminoácidos são escritas da esquerda para a direita em orientação amino para carboxi. Os cabeçalhos fornecidos aqui não são limitações dos vários aspectos ou aspectos da divulgação, os quais podem ser obtidos por referência no relatório descritivo como um todo. Consequentemente, os termos definidos imediatamente abaixo são mais completamente definidos por referência ao relatório descritivo em sua totalidade.

[039] Sempre que modalidades são descritas com a linguagem "compreendendo", também são fornecidas modalidades análogas descritas em termos de "consistindo em" e/ou "consistindo essencialmente em".

[040] Os aminoácidos são referidos neste documento pelos seus símbolos de três letras comumente conhecidos ou pelos símbolos de uma letra recomendados pela Comissão de Nomenclatura Bioquímica IUPAC-IUB. Os nucleotídeos, da mesma forma, são referidos por seus códigos de uma letra comumente aceitos.

[041] Como usados neste documento, os termos "câncer" e "canceroso" se

referem ou descrevem a condição fisiológica nos mamíferos na qual a população de células é caracterizada pelo crescimento celular desregulado. Os cânceres podem ser categorizados, por exemplo, como tumores sólidos ou neoplasias, ou cânceres hematológicos ou neoplasias. Ambos os tipos podem migrar para locais remotos como metástases. Um tumor sólido pode ser categorizado, por exemplo, como um sarcoma, um carcinoma, um melanoma ou uma metástase deles.

[042] 'Tumor" e "neoplasia", conforme usados neste documento, se referem a qualquer massa de tecido que resulta de crescimento ou proliferação excessiva de células, benignas (não cancerígenas) ou malignas (cancerígenas), incluindo lesões pré-cancerígenas. Em certas modalidades, os tumores aqui descritos expressam um receptor de SEMA4D, por exemplo , Plexin-B1, Plexin-B2 e/ou CD72, e/ou podem expressar SEMA4D.

[043] Conforme usado neste documento, o termo "polipeptídeo" destina-se a abranger um único "polipeptídeo" bem como vários "polipeptídeos", e refere-se a uma molécula composta de monômeros (aminoácidos) linearmente ligados por ligações amida (também conhecidas como ligações peptídicas). O termo "polipeptídeo" refere-se a qualquer cadeia ou cadeias de dois ou mais aminoácidos e não se refere a um comprimento específico do produto. Assim, peptídeos, dipeptídeos, tripeptídeos, oligopeptídeos, "proteína", "cadeia de aminoácido", ou qualquer outro termo usado para se referir a uma cadeia ou cadeias de dois ou mais aminoácidos, estão incluídos dentro da definição de "polipeptídeo", e o termo "polipeptídeo" pode ser usado em vez de, ou de forma permutável, com qualquer um desses termos. O termo "polipeptídeo" destina-se também a se referir aos produtos das modificações pós-expressão do polipeptídeo, incluindo, sem limitação, glicosilação, acetilação, fosforilação, amidação, e derivatização pelos grupos de proteção/bloqueio conhecidos, clivagem proteolítica ou modificação por aminoácidos de ocorrência não natural. Um polipeptídeo pode ser derivado de uma fonte biológica ou produzido por tecnologia recombinante, mas não

é necessariamente traduzido a partir de uma sequência de ácido nucleico designada. Ele pode ser gerado de qualquer forma, incluindo por síntese química.

[044] Um polipeptídeo como divulgado neste documento pode ser de um tamanho de cerca de 3 ou mais, 5 ou mais, 10 ou mais, 20 ou mais, 25 ou mais, 50 ou mais, 75 ou mais, 100 ou mais, 200 ou mais, 500 ou mais, 1.000 ou mais, ou 2.000 ou mais aminoácidos. Polipeptídeos podem ter uma estrutura tridimensional definida, embora não tenham necessariamente essa estrutura. Polipeptídeos com uma estrutura tridimensional definida são referidos como dobrados, e os polipeptídeos que não possuem uma estrutura tridimensional definida, mas, em vez disso, podem adotar um grande número de diferentes conformações e são referidos como não dobrados. Conforme usado neste documento, o termo glicoproteína refere-se a uma proteína acoplada a pelo menos uma fração de carboidrato que está anexada à proteína através de uma cadeia lateral contendo oxigênio ou contendo nitrogênio de um aminoácido, por exemplo, uma serina ou uma asparagina.

[045] Por polipeptídeo "isolado" ou fragmento, variante ou derivado deste, entende-se um polipeptídeo que não está em seu meio natural. Nenhum nível específico de purificação é necessário. Por exemplo, um polipeptídeo isolado pode ser removido de seu ambiente nativo ou natural. Os polipeptídeos produzidos de forma recombinante e as proteínas expressas em células hospedeiras são considerados isolados como divulgado neste documento, assim como os polipeptídeos nativos ou recombinantes que foram separados, fracionados ou, parcialmente ou substancialmente, purificados por qualquer técnica adequada.

[046] Como utilizado neste documento, o termo "um polipeptídeo de ocorrência não natural" ou quaisquer variantes gramaticais dele é uma definição condicional que exclui explicitamente, mas apenas exclui, as formas do polipeptídeo que são, ou podem ser, determinadas ou interpretadas por um juiz, ou um órgão administrativo ou judicial, como "ocorridas naturalmente".

[047] Outros polipeptídeos aqui divulgados são fragmentos, derivados, análogos ou variantes dos polipeptídeos anteriores e qualquer combinação dos mesmos. Os termos "fragmento", "variante", "derivado" e "análogo", como aqui divulgados, incluem quaisquer polipeptídeos que retêm pelo menos algumas das propriedades do anticorpo ou polipeptídeo nativo correspondente, por exemplo, especificamente se ligando a um antígeno. Os fragmentos dos polipeptídeos incluem, por exemplo, fragmentos proteolíticos, bem como fragmentos de deleção, além de fragmentos de anticorpo específicos discutidos em outro lugar neste documento. Variantes de, por exemplo, um polipeptídio incluem fragmentos como descrito acima, e também polipeptídio com sequências de aminoácidos alteradas devido a substituições, deleções ou inserções de aminoácidos. Em certos aspectos, variantes podem ocorrer de forma não natural. Variantes de ocorrência não natural podem ser produzidas usando técnicas de mutagênese conhecidas na técnica. Os polipeptídeos variantes podem compreender substituições, deleções ou adições de aminoácidos conservativas ou não conservativas. Derivados são polipeptídeos que foram alterados de modo a exibir características adicionais não encontradas no polipeptídeo original. Exemplos incluem as proteínas de fusão. Polipeptídeos variantes também são referidos neste documento como "análogos de polipeptídeo". Como aqui utilizado, um "derivado" de um polipeptídio também pode se referir a um polipeptídeo que possui um ou mais aminoácidos derivados quimicamente por reação de um grupo lateral funcional. Também incluído como "derivado" são aqueles peptídeos que contêm um ou mais derivados dos vinte aminoácidos padrões. Por exemplo, a 4-hidroxiprolina pode ser substituída pela prolina; a 5-hidroxilisina pode ser substituída pela lisina; a 3-metilhistidina pode ser substituída pela histidina; a homosserina pode ser substituída pela serina; e a ornitina pode ser substituída pela lisina.

[048] Uma "substituição conservativa de aminoácido" é aquela em que um aminoácido é substituído por outro aminoácido com uma cadeia lateral semelhante.

As famílias de aminoácidos tendo cadeias laterais semelhantes foram definidas na técnica, incluindo cadeias laterais básicas (por exemplo, lisina, arginina, histidina), cadeias laterais ácidas (por exemplo, ácido aspártico, ácido glutâmico), cadeias laterais polares não carregadas (por exemplo, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína), cadeias laterais apolares (por exemplo, glicina, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptofano), cadeias laterais betaramificadas (por exemplo, treonina, valina, isoleucina) e cadeias laterais aromáticas (por exemplo, tirosina, fenilalanina, triptofano, histidina). Por exemplo, a substituição de uma fenilalanina por uma tirosina é uma substituição conservativa. Em certas modalidades, as substituições conservativas nas sequências dos polipeptídeos e anticorpos da presente divulgação não revogam a ligação do polipeptídeo ou anticorpo contendo a sequência de aminoácidos ao antígeno ao qual a molécula de ligação se liga. Métodos de identificação de nucleotídeos e substituições conservativas de aminoácido que não eliminam ligação de antígeno são bem conhecidos na técnica (veja, por exemplo, Brummell *et al.*, *Biochem.* 32: 1180-1 187 (1993); Kobayashi *et al.*, *Protein Eng.* 12(10):879-884 (1999); e Burks *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. EUA* 94 :412-417 (1997)).

[049] O termo "polinucleotídeo" destina-se a abranger um único ácido nucleico, bem como vários ácidos nucleicos, e se refere a uma molécula de ácido nucleico isolada ou construto, por exemplo, RNA mensageiro (mRNA), cDNA, ou DNA plasmidial (pDNA). Um polinucleotídeo pode compreender uma ligação fosfodiéster convencional ou uma ligação não convencional (por exemplo, uma ligação amida, como a encontrada em ácidos nucleicos de peptídeo (PNA)). Os termos "ácido nucleico" ou "sequência de ácido nucleico" se referem a qualquer um ou mais segmentos de ácido nucleico, por exemplo, fragmentos de DNA ou RNA, presentes em um polinucleotídeo.

[050] Por um ácido nucleico ou polinucleotídeo "isolado" entende-se qualquer

forma do ácido nucleico ou polinucleotídeo que é separada de seu ambiente nativo. Por exemplo, um polinucleotídeo purificado em gel ou um polinucleotídeo recombinante que codifica um polipeptídeo contido em um vetor seria considerado "isolado". Além disso, um segmento polinucleotídico, por exemplo, um produto de PCR, que foi projetado para ter locais de restrição para clonagem, é considerado "isolado". Outros exemplos de um polinucleotídeo isolado incluem polinucleotídeos recombinantes mantidos em células hospedeiras heterólogas ou polinucleotídeos purificados (parcialmente ou substancialmente) em uma solução não nativa, como um tampão ou solução salina. Moléculas de RNA isoladas incluem transcritos de RNA de polinucleotídeos *in vivo* ou *in vitro*, onde o transcrito não é um que seria encontrado na natureza. Os polinucleotídeos ou ácidos nucleicos isolados descritos neste documento incluem ainda essas moléculas produzidas sinteticamente. Além disso, um polinucleotídeo ou um ácido nucleico pode ser ou pode incluir um elemento regulatório, como um promotor, sítio de ligação ao ribossomo, ou um terminador de transcrição.

[051] Como utilizado neste documento, o termo "um polipeptídeo de ocorrência não natural" ou quaisquer variantes gramaticais do mesmo é uma definição condicional que exclui explicitamente, mas apenas exclui, as formas do ácido nucleico ou polipeptídeo que são, ou podem ser, determinadas ou interpretadas por um juiz, ou um órgão administrativo ou judicial, como "ocorridas naturalmente".

[052] Conforme usado neste documento, uma "região de codificação" é uma porção de ácido nucleico que consiste em códons traduzidos em aminoácidos. Embora um "códon de parada" (TAG, TGA ou TAA) não seja traduzido em um aminoácido, ele pode ser considerado como sendo parte de uma região de codificação, mas quaisquer sequências flanqueadoras, por exemplo, promotores, sítios de ligação ao ribossomo, terminadores transpcionais, íntrons e similares, não são parte de uma região de codificação. Duas ou mais regiões de codificação podem

estar presentes em um único construto de polinucleotídeo, por exemplo, em um único vetor, ou em construtos de polinucleotídeos separados, por exemplo, em vetores separados (diferentes). Além disso, qualquer vetor pode conter uma única região de codificação, ou compreender duas ou mais regiões de codificação, por exemplo, um único vetor pode separadamente codificar uma região variável de cadeia pesada de imunoglobulina e uma região variável de cadeia leve de imunoglobulina. Além disso, um vetor, polinucleotídeo ou ácido nucleico podem incluir regiões codificadoras heterólogas, fundidas ou não fundidas a outra região codificadora. As regiões de codificação heterólogas incluem, sem limitação, elementos ou motivos especializados de codificação, tais como um peptídeo sinal secretor ou um domínio funcional heterólogo.

[053] Em determinadas modalidades, o polinucleotídeo ou ácido nucleico é o DNA. No caso do DNA, um polinucleotídeo compreendendo um ácido nucleico o qual codifica um polipeptídeo normalmente pode incluir um promotor e/ou outros elementos de controle de transcrição ou de tradução operacionalmente associados a uma ou mais regiões de codificação. Uma associação operável é quando uma região de codificação para um produto de gene, por exemplo, um polipeptídeo, está associada a uma ou mais sequências regulatórias de tal forma a colocar a expressão do produto de gene sob a influência ou controle das sequências regulatórias. Dois fragmentos de DNA (como uma região de codificação de polipeptídeo e um promotor associados a esta) estão "operacionalmente associados" se a indução da função do promotor resulta na transcrição do mRNA que codifica o produto do gene desejado e se a natureza da ligação entre os dois fragmentos de DNA não interfere com a capacidade das sequências regulatórias de expressão de direcionar a expressão do produto do gene ou interferir com a capacidade do modelo de DNA de ser transcrita. Assim, uma região promotora estaria operacionalmente associada a um ácido nucleico que codificasse um polipeptídeo, se o promotor fosse capaz de efetuar a transcrição

daquele ácido nucleico. O promotor pode ser um promotor de célula específico que direciona a transcrição substancial do DNA nas células predeterminadas. Outros elementos de controle de transcrição, além de um promotor, por exemplo, potenciadores, operadores, repressores e sinais de terminação da transcrição, podem ser operacionalmente associados ao polinucleotídeo para direcionar a transcrição célula-específica.

[054] Uma variedade de regiões de controle de transcrição é conhecida por aqueles versados na técnica. Estas incluem, sem limitação, regiões de controle de transcrição que funcionam nas células de vertebrados, tais como, mas não limitadas a, promotor e segmentos potenciadores de citomegalovírus (o primeiro promotor imediato, em conjunto com o íntron-A), vírus símio 40 (o primeiro promotor) e retrovírus (como o vírus do sarcoma de Rous). Outras regiões de controle de transcrição incluem aquelas derivadas de genes de vertebrados, tais como a actina, proteínas de choque térmico, hormônio de crescimento bovino e  $\beta$ -globina de coelho, bem como outras sequências capazes de controlar a expressão gênica em células eucarióticas. As regiões de controle de transcrição adicionais adequadas incluem promotores específicos de tecido e potenciadores, bem como promotores induzíveis por linfocinas (*por exemplo*, promotores induzíveis por interferons ou interleucinas).

[055] De forma semelhante, uma variedade de elementos de controle de tradução é conhecida por aqueles versados na técnica de forma ordinária. Estes incluem, mas não estão limitados aos sítios de ligação ao ribossomo, códons de iniciação e de terminação da tradução e elementos derivados de picornavírus (particularmente um local interno de entrada do ribossomo, ou IRES, também referido como uma sequência CITE).

[056] Em outras modalidades, um polinucleotídeo pode ser RNA, por exemplo, na forma de RNA mensageiro (mRNA), RNA transportador ou RNA ribossômico.

[057] As regiões codificadoras de polinucleotídeo e ácido nucleico podem ser

associadas a regiões codificadoras adicionais que codificam peptídeos secretores ou de sinal, os quais direcionam a secreção de um polipeptídeo codificado por um polinucleotídeo, como aqui divulgado. De acordo com a hipótese do sinal, as proteínas secretadas por células de mamíferos têm um peptídeo sinal ou sequência líder secretora que é clivada a partir da proteína madura, uma vez que a exportação de cadeia da proteína em crescimento pelo retículo endoplasmático rugoso foi iniciada. Aqueles versados na técnica de forma ordinária estão cientes que os polipeptídeos secretados por células de vertebrados geralmente têm um peptídeo sinal fundido ao terminal N do polipeptídeo, o qual é clivado a partir do polipeptídeo de "comprimento total" ou completo para produzir uma forma secretada ou "madura" do polipeptídeo. Em determinadas modalidades, o peptídeo sinal nativo, por exemplo, uma cadeia pesada de imunoglobulina ou peptídeo sinal de cadeia leve é usado, ou um derivado funcional dessa sequência que mantém a capacidade de direcionar a secreção do polipeptídeo que está operacionalmente associado a ele. Alternativamente, um peptídeo sinal heterólogo de mamífero, ou um derivado funcional deste, pode ser usado. Por exemplo, a sequência líder do tipo selvagem pode ser substituída pela sequência líder ativador de plasminogênio tecidual humano (TPA) ou  $\beta$ -glucuronidase de camundongo.

[058] São aqui divulgadas certas moléculas de ligação ou fragmentos, variantes ou derivados de ligação a antígeno. A menos que se refira especificamente a anticorpos em tamanho real, o termo "molécula de ligação" abrange anticorpos em tamanho real, bem como subunidades, fragmentos, variantes, análogos ou derivados de ligação a antígeno de tais anticorpos, por exemplo, moléculas de anticorpo manipuladas ou fragmentos que ligam antígeno de maneira semelhante às moléculas de anticorpo, mas que usam uma estrutura em andamento diferente.

[059] Como usado aqui, o termo "molécula de ligação" refere-se em seu sentido mais amplo a uma molécula que se liga especificamente a um receptor, por

exemplo, um epítopo ou um determinante antigênico. Como aqui descrito mais adiante, uma molécula de ligação pode compreender um dos mais "domínios de ligação ao antígeno" aqui descritos. Um exemplo não limitativo de uma molécula de ligação é um anticorpo ou seu fragmento que retém a ligação específica ao antígeno.

[060] Como usado aqui, os termos "domínio de ligação" ou "domínio de ligação ao antígeno" se referem a uma região de uma molécula de ligação que é necessária e suficiente para se ligar especificamente a um epítopo. Por exemplo, um "Fv", por exemplo, uma cadeia pesada variável e uma cadeia leve variável de um anticorpo, como duas subunidades polipeptídicas separadas ou como uma cadeia única, é considerado um "domínio de ligação". Outros domínios de ligação incluem, sem limitação, a cadeia pesada variável (VHH) de um anticorpo derivado de uma espécie de camelídeo ou seis regiões determinantes de complementaridade de imunoglobulina (CDRs) expressas em uma estrutura em andaime de fibronectina. Uma "molécula de ligação", como aqui descrita, pode incluir um, dois, três, quatro, cinco, seis, sete, oito, nove, dez, onze, doze ou mais "domínios de ligação ao antígeno".

[061] Os termos "anticorpo" e "imunoglobulina" podem ser usados aqui de forma intercambiável. Um anticorpo (ou um fragmento, variante ou derivado do mesmo, conforme divulgado aqui) inclui pelo menos a região variável de uma cadeia pesada (para espécies de camelídeos) ou pelo menos a região variável de uma cadeia pesada e uma cadeia leve. As estruturas básicas de imunoglobulina nos sistemas vertebrados são relativamente bem compreendidas. Ver, por exemplo, Harlow *et al.*, *Antibodies: A Laboratory Manual*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2<sup>a</sup> ed. 1988). Salvo quando indicado o contrário, o termo "anticorpo" abrange qualquer coisa que varia de um pequeno fragmento de ligação a antígeno de um anticorpo a um anticorpo de tamanho completo, por exemplo, um anticorpo IgG que inclui duas cadeias pesadas completas e duas cadeias leves completas, um anticorpo IgA que inclui

quatro cadeias pesadas e quatro cadeias leves completas e, opcionalmente, inclui uma cadeia J e/ou um componente secretório, ou um anticorpo IgM que inclui dez ou doze cadeias pesadas completas e dez ou doze cadeias leves completas e, opcionalmente, inclui uma cadeia J.

[062] Como será discutido em mais detalhes abaixo, o termo "imunoglobulina" comprehende várias classes amplas de polipeptídeos que podem ser distinguidos bioquimicamente. As pessoas versadas na técnica apreciarão que as cadeias pesadas são classificadas como gama, mu, alfa, delta ou épsilon ( $\gamma$ ,  $\mu$ ,  $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ) com algumas subclasses entre elas (por exemplo,  $\gamma_1$ - $\gamma_4$  ou  $\alpha_1$ - $\alpha_2$ ). É a natureza desta cadeia que determina a "classe" do anticorpo como IgG, IgM, IgA, IgG ou IgE, respectivamente. As subclasses de imunoglobulinas (isotipos), por exemplo, IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub>, IgG<sub>4</sub>, IgA<sub>1</sub>, IgA<sub>2</sub>, etc. são bem **CARACTERIZADAS** e são conhecidas por conferirem especialização funcional. As versões modificadas de cada uma dessas classes e isotipos são facilmente discerníveis para a pessoa versada na técnica, em vista da divulgação do momento e, nesse sentido, estão dentro do escopo desta divulgação.

[063] As cadeias leves são classificadas como kappa ou lambda ( $\kappa$ ,  $\lambda$ ). Cada classe de cadeia pesada pode estar ligada a uma cadeia leve kappa ou lambda. Em geral, as cadeias leves e pesadas estão ligadas umas às outras de forma covalente, e as porções da "cauda" das duas cadeias pesadas estão ligadas entre si por ligações dissulfeto covalentes ou ligações não covalentes, quando as imunoglobulinas são geradas por hibridomas, células B ou células hospedeiras projetadas geneticamente. Na cadeia pesada, as sequências de aminoácidos correm de um terminal N nas extremidades em forquilha da configuração em Y para o terminal C na parte inferior de cada cadeia. A estrutura básica de certos anticorpos, por exemplo, anticorpos IgG, inclui duas subunidades de cadeia pesada e duas subunidades de cadeia leve conectadas de forma covalente por meio de ligações dissulfeto para formar uma

estrutura "Y", também aqui referida como uma estrutura "H2L2".

[064] Ambas as cadeias leves e pesadas são divididas em regiões de homologia estrutural e funcional. Os termos "constante" e "variável" são usados funcionalmente. A este respeito, será apreciado que as regiões variáveis das porções de cadeias leves (VL) e pesadas (VH) variáveis determinam o reconhecimento e a especificidade do antígeno. Por outro lado, as regiões constantes de cadeia leve (CL) e de cadeia pesada (CH1, CH2 ou CH3) conferem propriedades biológicas importantes, como secreção, mobilidade transplacentária, ligação ao receptor Fc, ligação do complemento e similares. Por convenção, a numeração das regiões constantes aumenta à medida que se tornam mais distais do sítio de ligação ao antígeno ou do amino-terminal do anticorpo. A porção terminal N é uma região variável e na porção Terminal C está uma região constante; as regiões CH3 (ou CH4 no caso do IgM) e CL compreendem, na verdade, o carboxi-terminal das cadeias pesada e leve, respectivamente.

[065] Como indicado acima, uma região variável (isto é, o "domínio de ligação") permite que a molécula de ligação reconheça seletivamente e se ligue especificamente a epítopos em antígenos. Ou seja, a região VL e a região VH, ou subconjunto das regiões determinantes da complementaridade (CDRs), de uma molécula de ligação, por exemplo, um anticorpo se combina para formar a região variável que define um local de ligação ao antígeno tridimensional. Mais especificamente, o local de ligação ao antígeno é definido por três CDRs em cada uma das cadeias VH e VL. Certos anticorpos formam estruturas maiores. Por exemplo, o IgA pode formar uma molécula que inclui duas unidades de H2L2, uma cadeia J e um componente secretório, todos conectados de forma covalente por meio de ligações dissulfeto, e o IgM pode formar uma molécula pentamérica ou hexamérica que inclui cinco ou seis unidades de H2L2 e, opcionalmente, uma cadeia J conectada de forma covalente via ligações dissulfeto.

[066] As seis "regiões determinantes de complementaridade" ou "CDRs" presentes em uma região de ligação a antígeno de anticorpo são sequências curtas e não contíguas de aminoácidos que são posicionadas especificamente para formar o domínio de ligação, pois o anticorpo assume sua configuração tridimensional em um ambiente aquoso. O restante dos aminoácidos no domínio de ligação, referido como regiões de "framework", mostra menor variabilidade intermolecular. As regiões framework adotam largamente uma conformação de folha  $\beta$  e as CDRs formam alças que se conectam, e, em alguns casos, formam parte da estrutura de folha  $\beta$ . Assim, as regiões framework agem para formar uma estrutura em andaime que proporciona o posicionamento das CDRs na orientação correta por interações intercadeias, não covalentes. O domínio de ligação formado pelas CDRs posicionadas define uma superfície complementar ao epítopo no antígeno imunorreativo. Esta superfície complementar promove a ligação não covalente de um anticorpo ao seu epítopo cognato. Os aminoácidos que compõem as CDRs e as regiões framework, respectivamente, podem ser facilmente identificados para qualquer região variável de cadeia pesada ou leve por uma pessoa versada na técnica de forma ordinária, uma vez que foram definidos de várias maneiras diferentes (consulte "Sequences of Proteins of Immunological Interest", Kabat, E., et al., Departamento de Saúde e Serviços Humanos dos EUA, (1983); e Chothia e Lesk, *J. Mol. Biol.*, 196:901-917 (1987), que estão incorporados em sua totalidade neste documento para referência).

[067] No caso em que já duas ou mais definições de um termo usado e/ou aceito dentro da técnica, a definição do termo como usada neste documento destina-se a incluir todos tais significados a não ser que explicitamente dito em contrário. Um exemplo específico é o uso do termo "região determinante de complementaridade" ("CDR") para descrever os sítios de combinação de antígeno não contíguos encontrados dentro da região variável de ambos os polipeptídeos de cadeia leve e pesada. Essas regiões particulares foram descritas, por exemplo, por Kabat et al., US

Dept. of Health and Human Services, "Sequences of Proteins of Immunological Interest" (1983) e por Chotia *et al.*, J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987), os quais estão incorporados neste documento por referência. As definições de Kabat e Chothia incluem sobreposições ou subconjuntos de aminoácidos quando comparados um com o outro. De qualquer forma, a aplicação de qualquer das definições (ou outras definições conhecidas daquele versado na técnica) para se referir a uma CDR de um anticorpo ou variante dele destina-se a recair dentro do escopo do termo como definido e usado neste documento, a não ser que indicado em contrário. Os aminoácidos apropriados que engloba as CDRs como definidas por cada uma das referência citadas acima são estabelecidos abaixo na Tabela 1 como uma comparação. Os números de aminoácido exatos que abrangem uma CDR específica irão variar dependendo da sequência e do tamanho da CDR. Aqueles versados na técnica determinam rotineiramente quais aminoácidos compreendem uma CDR específica, dada a sequência de aminoácidos da região variável do anticorpo.

Tabela 1: Definições de CDRs<sup>1</sup>


<sup>1</sup>A numeração de todas as definições de CDR na Tabela 1 está de acordo com as convenções de numeração estabelecidas por Rabat *et al.* (ver abaixo).

[068] As regiões variáveis de imunoglobulina também podem ser analisadas usando o sistema de informações IMGT ([www://imgt.cines.fr/](http://imgt.cines.fr/)) (IMGT®/V-Quest) para identificar segmentos de região variáveis, incluindo CDRs. Ver, *por exemplo*, Brochet, X. *et al.*, *Nucl. Acids Res.* 36:W503-508 (2008).

[069] Rabat *et al.* também definiu um sistema de numeração para sequências de regiões variáveis que é aplicável a qualquer anticorpo. Aquele versado na técnica pode atribuir sem ambiguidade este sistema de "numeração de Rabat" a qualquer

sequência de região variável, sem dependência de quaisquer dados experimentais além da sequência em si. Conforme usado neste documento, a "numeração de Rabat" refere-se ao sistema de numeração apresentado por Rabat *et al.*, US Dept, of Health and Human Services, "Sequence of Proteins of Immunological Interest" (1983). A menos que o uso do sistema de numeração de Rabat seja explicitamente observado, no entanto, a numeração consecutiva é usada para todas as sequências de aminoácidos nesta divulgação.

[070] Moléculas de ligação, *por exemplo*, anticorpos ou fragmentos de ligação ao antígeno, variantes ou derivados deles incluem, mas não estão limitados a, anticorpos policlonais, monoclonais, humanos, humanizados ou quiméricos, anticorpos de cadeia única, fragmentos de ligação ao epítopo *por exemplo* Fab, Fab' e F(ab')<sub>2</sub>, Fd, Fvs, Fvs de cadeia única (scFv), anticorpos de cadeia única, Fvs ligados a dissulfeto (sdFv), fragmentos compreendendo uma região VL ou VH, fragmentos produzidos por uma biblioteca de expressão de Fab. As moléculas de ScFv são conhecidas na técnica e são descritas, *por exemplo*, na patente US 5.892.019. As moléculas de imunoglobulina ou anticorpo englobadas por esta divulgação podem ser de qualquer tipo (*por exemplo*, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA e IgY), classe (*por exemplo*, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2) ou subclasse de molécula de imunoglobulina.

[071] Por "liga-se especificamente", entende-se geralmente que uma molécula de ligação, *por exemplo*, um anticorpo ou fragmento, variante ou derivado dele, se liga a um epítopo via seu domínio de ligação ao antígeno, e que a ligação implica alguma complementaridade entre o domínio de ligação ao antígeno e o epítopo. De acordo com esta definição, uma molécula de ligação é dita "se ligar especificamente" a um epítopo quando este se liga a esse epítopo, através de seu domínio de ligação ao antígeno, mais facilmente do que se ligaria a um epítopo aleatório, não relacionado. O termo "especificidade" é usado neste documento para qualificar a afinidade relativa pela qual uma determinada molécula de ligação se liga

a um determinado epítopo. Por exemplo, a molécula de ligação "A" pode ser considerada como tendo uma especificidade mais alta para um dado epítopo do que a molécula de ligação "B", ou a molécula de ligação "A" pode ser dita como se ligando ao epítopo "C" com uma especificidade mais alta do que com o epítopo relacionado "D."

[072] Uma molécula de ligação, *por exemplo*, um anticorpo ou fragmento, variante ou derivado dele divulgado neste documento, pode ser dita como se ligando a um antígeno alvo com uma taxa de dissociação ( $k$  (off)) menor ou igual a  $5 \times 10^{-2} \text{ seg}^{-1}$ ,  $10^{-2} \text{ seg}^{-1}$ ,  $5 \times 10^{-3} \text{ seg}^{-1}$ ,  $10^{-3} \text{ seg}^{-1}$ ,  $5 \times 10^{-4} \text{ seg}^{-1}$ ,  $10^{-4} \text{ seg}^{-1}$ ,  $5 \times 10^{-5} \text{ seg}^{-1}$ , ou  $10^{-5} \text{ seg}^{-1}$   $5 \times 10^{-6} \text{ seg}^{-1}$ ,  $10^{-6} \text{ seg}^{-1}$ ,  $5 \times 10^{-7} \text{ seg}^{-1}$ , ou  $10^{-7} \text{ seg}^{-1}$ .

[073] Uma molécula de ligação, *por exemplo*, um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno, variante ou derivado divulgado neste documento, pode ser dita como se ligando a um antígeno alvo com uma taxa de associação ( $k$ (on)) maior ou igual a  $10^3 \text{ M}^{-1} \text{ seg}^{-1}$ ,  $5 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ seg}^{-1}$ ,  $10^4 \text{ M}^{-1} \text{ seg}^{-1}$ ,  $5 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ seg}^{-1}$ ,  $10^5 \text{ M}^{-1} \text{ seg}^{-1}$ ,  $5 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ seg}^{-1}$ ,  $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ seg}^{-1}$ , ou  $5 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ seg}^{-1}$ , ou  $10^7 \text{ M}^{-1} \text{ seg}^{-1}$ .

[074] Uma molécula de ligação, *por exemplo*, um anticorpo ou fragmento, variante ou derivado dele, é dito que inibe competitivamente a ligação de um anticorpo de referência ou fragmento de ligação a antígeno a um dado epítopo se preferencialmente se liga a esse epítopo na medida em que bloqueia, até certo ponto, a ligação do anticorpo de referência ou fragmento de ligação ao antígeno ao epítopo. A inibição competitiva pode ser determinada por qualquer método conhecido na técnica, por exemplo, ensaios de ELISA de competição. Pode-se dizer que uma molécula de ligação inibe competitivamente a ligação do anticorpo de referência ou fragmento de ligação ao antígeno a um dado epítopo em pelo menos 90%, pelo menos 80%, pelo menos 70%, pelo menos 60% ou pelo menos 50%.

[075] Como utilizado neste documento, o termo "afinidade" refere-se a uma medida da força da ligação de um epítopo individual com um ou mais domínios de

ligação, *por exemplo*, de uma molécula de imunoglobulina. Ver, *por exemplo*, Harlow *et al.*, Antibodies: A Laboratory Manual, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2<sup>a</sup> ed. (1988) nas páginas 27-28. Como utilizado neste documento, o termo "avidez" refere-se à estabilidade geral do complexo entre uma população de domínios de ligação e um antígeno. Ver, *por exemplo*, Harlow nas páginas 29-34. A avidez está relacionada à afinidade dos domínios de ligação individuais na população com epítopos específicos, e também as valências das imunoglobulinas, e ao antígeno. Por exemplo, a interação entre um anticorpo monoclonal bivalente e um antígeno com uma estrutura de epítopo altamente repetitiva, tal como um polímero, seria uma de alta avidez. Uma interação entre um anticorpo monoclonal bivalente e um receptor presente em alta densidade na superfície celular também seria de alta avidez.

[076] Moléculas de ligação ou fragmentos de ligação a antígeno, variantes ou derivados deles, conforme divulgados neste documento, também podem ser descritos ou especificados em termos de sua reatividade cruzada. Como utilizado neste documento, o termo "reatividade cruzada" refere-se à capacidade de uma molécula de ligação, *por exemplo*, um anticorpo ou fragmento, variante ou derivado dele, específico para um antígeno, reagir com um segundo antígeno; uma medida de relação entre duas substâncias antigênicas diferentes. Assim, uma molécula de ligação é reativa de forma cruzada se esta se liga a um epítopo diferente daquele que induziu sua formação. O epítopo reativo de forma cruzada geralmente contém muitas das mesmas características estruturais complementares, como o epítopo de indução e, em alguns casos, pode realmente se adaptar melhor que o original.

[077] Uma molécula de ligação, *por exemplo*, um anticorpo ou fragmento, variante ou derivado dele, também pode ser descrita ou especificada em termos de sua afinidade de ligação a um antígeno. Por exemplo, uma molécula de ligação pode se ligar a um antígeno com uma constante de dissociação ou  $K_D$  não superior a  $5 \times 10^{-2}M$ ,  $10^{-2}M$ ,  $5 \times 10^{-3}M$ ,  $10^{-3}M$ ,  $5 \times 10^{-4}M$ ,  $10^{-4}M$ ,  $5 \times 10^{-5}M$ ,  $10^{-5}M$ ,  $5 \times 10^{-6}M$ ,  $10^{-6}M$ ,

$5 \times 10^{-7} M$ ,  $10^{-7} M$ ,  $5 \times 10^{-8} M$ ,  $10^{-8} M$ ,  $5 \times 10^{-9} M$ ,  $10^{-9} M$ ,  $5 \times 10^{-10} M$ ,  $10^{-10} M$ ,  $5 \times 10^{-11} M$ ,  $10^{-11} M$ ,  $5 \times 10^{-12} M$ ,  $10^{-12} M$ ,  $5 \times 10^{-13} M$ ,  $10^{-13} M$ ,  $5 \times 10^{-14} M$ ,  $10^{-14} M$ ,  $5 \times 10^{-15} M$  ou  $10^{-15} M$ .

[078] Os fragmentos de anticorpo, incluindo anticorpos de cadeia única ou outros domínios de ligação, podem existir sozinhos ou em combinação com um ou mais dos seguintes: região de dobradiça, domínios CH1, CH2, CH3 ou CH4, cadeia J ou componente secretório. Também estão incluídos fragmentos de ligação a antígeno que podem incluir qualquer combinação de região(ões) variável(is) com um ou mais de uma região de dobradiça, domínios CH1, CH2, CH3 ou CH4, uma cadeia J ou um componente secretório. As moléculas de ligação, *por exemplo*, anticorpos ou fragmentos de ligação ao antígeno deles, podem ser de qualquer origem animal, incluindo aves e mamíferos. Os anticorpos podem ser anticorpos humanos, murinos, de burro, de coelho, de cabra, de porquinho-da-índia, de camelo, de lhama, de cavalo ou de frango. Em outra modalidade, a região variável pode ser condicte na origem (*por exemplo*, de tubarões). Como usado neste documento, anticorpos "humanos" incluem anticorpos que possuem a sequência de aminoácidos de uma imunoglobulina humana e incluem anticorpos isolados de bibliotecas de imunoglobulina humana ou de animais transgênicos para obter uma ou mais imunoglobulinas humanas e que em alguns casos expressam imunoglobulinas endógenas e em alguns casos não, como descrito *infra* e, por exemplo na, Pat. US Nº 5.939.598 por Kucherlapati *et al.*

[079] Como utilizado neste documento, o termo "subunidade de cadeia pesada" inclui sequências de aminoácidos derivadas de uma cadeia pesada de imunoglobulina, uma molécula de ligação, *por exemplo*, um anticorpo compreendendo uma subunidade de cadeia pesada inclui pelo menos um dentre: uma região VH, um domínio CH1, um domínio de dobradiça (*por exemplo*, região de dobradiça superior, média e/ou inferior), um domínio CH2, um domínio CH3, um domínio CH4 ou uma variante ou fragmento deles. Por exemplo, uma molécula de ligação, *por exemplo*, um

anticorpo ou fragmento, variante ou derivado dele pode incluir, além de uma região VH, um domínio CH1; domínio CH1, uma dobradiça e um domínio CH2; um domínio CH1 e um domínio CH3; um domínio CH1, uma dobradiça e um domínio CH3; ou um domínio CH1, um domínio de dobradiça, um domínio CH2 e um domínio CH3. Em certos aspectos, uma molécula de ligação, *por exemplo* um anticorpo ou fragmento, variante ou derivado dele pode incluir, além de uma região VH, um domínio CH3 e um domínio CH4; ou um domínio CH3, um domínio CH4 e uma cadeia J. Além disso, uma molécula de ligação para uso na divulgação pode não ter certas porções constantes da região, *por exemplo*, todo ou parte de um domínio CH2. Será entendido por aquele versado na técnica que esses domínios (*por exemplo*, a subunidade da cadeia pesada) podem ser modificados de modo que variem na sequência de aminoácidos da molécula original de imunoglobulina.

[080] As subunidades da cadeia pesada de uma molécula de ligação, *por exemplo*, um anticorpo ou fragmento dele, podem incluir domínios derivados de diferentes moléculas de imunoglobulina. Por exemplo, uma subunidade de cadeia pesada de um polipeptídeo pode incluir um domínio CH1 derivado de uma molécula de IgG1 e uma região de dobradiça derivada de uma molécula de IgG3. Em outro exemplo, uma subunidade da cadeia pesada pode incluir uma região de dobradiça derivada, em parte, de uma molécula de IgG1 e, em parte, de uma molécula de IgG3. Em outro exemplo, uma subunidade da cadeia pesada pode compreender uma dobradiça químérica derivada, em parte, de uma molécula de IgG1 e, em parte, de uma molécula de IgG4.

[081] Como usado neste documento, o termo "subunidade de cadeia leve" inclui sequências de aminoácidos derivadas de uma cadeia leve de imunoglobulina. A subunidade da cadeia leve inclui pelo menos um dos domínios VL ou CL (*por exemplo*, Cκ ou Cλ).

[082] Moléculas de ligação, *por exemplo*, anticorpos ou fragmentos de ligação

ao antígeno, variantes ou derivados do mesmo podem ser descritas ou especificadas em termos de epítopo(s) ou porção(ões) de um antígeno que elas reconhecem ou a que se ligam especificamente. A porção de um antígeno alvo que interage especificamente com o domínio de ligação ao antígeno de um anticorpo é um "epítopo" ou um "determinante antigênico". Um antígeno alvo pode compreender um único epítopo ou pelo menos dois epítopos e pode incluir qualquer número de epítopos, dependendo do tamanho, conformação e tipo de antígeno.

[083] Conforme indicado anteriormente, as estruturas de subunidade e a configuração tridimensional das regiões constantes das diversas classes de imunoglobulinas são bem conhecidas. Como utilizado neste documento, o termo "região VH" inclui a região variável amino terminal de uma cadeia pesada de imunoglobulina e o termo "domínio CH1" inclui o primeiro domínio da região constante (mais amino terminal) de uma cadeia pesada de imunoglobulina. O domínio CH1 é adjacente ao domínio VH e é amino terminal para a região de dobradiça de uma molécula típica da cadeia pesada de imunoglobulina.

[084] Como utilizado neste documento, o termo "domínio CH2" inclui a porção de uma molécula de cadeia pesada que se estende, *por exemplo*, do aminoácido 244 ao aminoácido 360 de um anticorpo IgG usando esquemas de numeração convencionais (aminoácidos 244 a 360, sistema de numeração de Kabat e aminoácidos 231-340), sistema de numeração da EU; ver Kabat EA *et al. op. cit.* O domínio CH3 se estende do domínio CH2 ao terminal C da molécula de IgG e comprehende aproximadamente 108 aminoácidos. Certas classes de imunoglobulinas, *por exemplo*, IgM, incluem ainda uma região CH4.

[085] Como usado neste documento, o termo "região de dobradiça" inclui a porção de uma molécula de cadeia pesada que une o domínio CH1 ao domínio CH2. Esta região de dobradiça comprehende aproximadamente 25 aminoácidos e é flexível, permitindo, assim, que as duas regiões de ligação ao antígeno de terminal N se

movam independentemente.

[086] Como utilizado neste documento, o termo "ligação dissulfeto" inclui a ligação covalente formada entre dois átomos de enxofre. O aminoácido cisteína compreende um grupo tiol que pode formar uma ligação ou ponte dissulfeto com um segundo grupo tiol. Em determinadas moléculas de IgG, as regiões CH1 e CL estão ligadas por uma ligação dissulfeto e as duas cadeias pesadas estão ligadas por duas ligações dissulfeto nas posições correspondentes a 239 e 242, usando o sistema de numeração de Kabat (posição 226 ou 229, sistema de numeração da EU).

[087] Como utilizado neste documento, o termo "anticorpo quimérico" refere-se a um anticorpo no qual a região ou o sítio imunorreativo é obtido ou derivado de uma primeira espécie e a região constante (que pode estar intacta, parcial ou modificada) é obtida de uma segunda espécie. Em algumas modalidades, a região ou o sítio de ligação ao alvo será de uma fonte não humana (*por exemplo*, camundongo ou primata) e a região constante é humana.

[088] Os termos "anticorpo multiespecífico, ou" anticorpo biespecífico "referem-se a um anticorpo que possui domínios de ligação para dois ou mais epítopos diferentes dentro de uma única molécula de anticorpo. Outras moléculas de ligação em adição à estrutura de anticorpo canônico podem ser construídas com duas especificidades de ligação. A ligação do epítopo por anticorpos biespecíficos ou multiespecíficos pode ser simultânea ou sequencial. Triomas e hibridomas híbridos são dois exemplos de linhas celulares que podem secretar anticorpos biespecíficos. Os anticorpos biespecíficos também podem ser construídos por meios recombinantes. (Strohlein e Heiss, *Future Oncol.* 6:1387-94 (2010); Mabry e Snavely, *IDrugs.* 13:543-9 (2010)). Um anticorpo biespecífico também pode ser um diacorpo.

[089] Como usado neste documento, o termo "anticorpo manipulado" refere-se a um anticorpo no qual a região variável na cadeia pesada e leve ou em ambas é alterada pela substituição pelo menos parcial de um ou mais aminoácidos nas regiões

CDR ou de framework. Em certos aspectos, CDRs inteiras de um anticorpo de especificidade conhecida podem ser enxertadas nas regiões framework de um anticorpo heterólogo. Embora CDRs alternativas possam ser derivadas de um anticorpo da mesma classe ou mesmo subclasse que o anticorpo do qual as regiões framework são derivadas, as CDRs também podem ser derivadas de um anticorpo de classe diferente, *por exemplo*, de um anticorpo de uma espécie diferente. Um anticorpo manipulado no qual uma ou mais CDRs "doadoras" de um anticorpo não humano de especificidade conhecida são enxertadas em uma framework da cadeia pesada ou leve humana é referida neste documento como um "anticorpo humanizado". Em certos aspectos, nem todas as CDRs são substituídas pelas CDRs completas da região variável doadora e, no entanto, a capacidade de ligação ao antígeno do doador ainda pode ser transferida para as regiões variáveis receptoras. Dadas as explicações estabelecidas em, *por exemplo*, Pat. US Nºs. 5.585.089, 5.693.761, 5.693.762 e 6.180.370, recairá bastante dentro da competência daqueles versados na técnica, por meio da realização de experimentos de rotina ou por teste de tentativa e erro, para obter um anticorpo funcional manipulado ou humanizado.

[090] Como utilizado neste documento, o termo "manipulado" inclui manipulação de moléculas de ácido nucleico ou polipeptídeo por meios sintéticos (*por exemplo* por técnicas recombinantes, síntese peptídica *in vitro* por acoplamento enzimático ou químico de peptídeos ou alguma combinação dessas técnicas).

[091] Como usado neste documento, os termos "ligado", "fundido" ou "fusão" ou outros equivalentes gramaticais podem ser usados de forma intercambiável. Esses termos se referem à junção de dois ou mais elementos ou componentes, por quaisquer meios, incluindo conjugação química ou meios recombinantes. Uma "fusão in-frame" refere-se à junção de dois ou mais quadros de leitura aberta de polinucleotídeo (ORFs) para formar um ORF maior contínuo, de forma que mantém o quadro de leitura tradicional dos ORFs originais. Assim, uma proteína de fusão recombinante é uma

única proteína que contém dois ou mais segmentos que correspondem aos polipeptídeos codificados pelos ORFs originais (cujos segmentos não são normalmente tão unidos na natureza). Embora o quadro de leitura seja assim feito contínuo por todos os segmentos fundidos, os segmentos podem ser fisicamente ou espacialmente separados, por exemplo, por uma sequência ligante in-frame. Por exemplo, os polinucleotídeos que codificam as CDRs de uma região variável de imunoglobulina podem ser fundidos, in-frame, mas ser separados por um polinucleotídeo que codifica pelo menos uma região framework de imunoglobulina ou regiões CDR adicionais, desde que as CDRs "fundidas" sejam cotraduzidas como parte de um polipeptídeo contínuo.

[092] No contexto de polipeptídeos, uma "sequência linear" ou uma "sequência" é uma ordem de aminoácidos em um polipeptídeo em uma direção de lado amino a carboxi terminal na qual aminoácidos vizinhos um ao outro na sequência são contíguos na estrutura primária do polipeptídeo. Uma porção de um polipeptídeo que é "terminal amino" ou "terminal N" para outra porção de um polipeptídeo é aquela porção que vem mais cedo na cadeia polipeptídica sequencial. Da mesma forma, uma porção de um polipeptídeo que é "terminal carboxi" ou "terminal C" para outra porção de um polipeptídeo é aquela porção que vem posteriormente na cadeia sequencial de polipeptídeo. Por exemplo, em um anticorpo típico, a região variável é "terminal N" para a região constante e a região constante é "terminal C" para a região variável.

[093] O termo "expressão", conforme utilizado neste documento, refere-se a um processo pelo qual um gene produz um produto bioquímico, por exemplo, um polipeptídeo. O processo inclui qualquer manifestação da presença funcional do gene dentro da célula, incluindo, sem limitação, knockdown do gene, bem como a expressão transitória e expressão estável. Inclui, sem limitação, a transcrição do gene no RNA mensageiro (mRNA) e a tradução desse mRNA no (s) polipeptídeo (s). Se o produto desejado final for um produto bioquímico, a expressão inclui a criação desse

produto bioquímicos e quaisquer precursores. A expressão de um gene produz um "produto de gene". Conforme usado neste documento, um produto de gene pode ser tanto um ácido nucleico, *por exemplo*, um RNA mensageiro produzido pela transcrição de um gene ou um polipeptídeo que é traduzido a partir de um transcrito. Os produtos de gene descritos neste documento incluem ainda ácidos nucleicos com modificações pós transpcionais, *por exemplo*, poliadenilação, ou polipeptídeos com modificações pós traducionais, *por exemplo*, metilação, glicosilação, a adição de lipídios, associação com outras subunidades de proteína, clivagem proteolítica e similares.

[094] Como utilizado neste documento, o termo "molécula de ligação anti-SEMA4D" refere-se a uma molécula que se liga especificamente a SEMA4D, *por exemplo*, um anticorpo ou fragmento de ligação a antígeno, variante ou derivado dele. A menos que se refira especificamente a *anticorpos* de tamanho completo, como anticorpos de ocorrência natural, o termo "anticorpo anti-SEMA4D" abrange anticorpos de tamanho completo, bem como fragmentos de ligação a antígeno, bem como fragmentos de ligação a antígeno, variantes, análogos ou derivados de tais anticorpos, *por exemplo*, moléculas de anticorpo ou imunoglobulina de ocorrência natural ou moléculas ou fragmentos de anticorpo manipulados que se ligam ao antígeno de maneira semelhante às moléculas de anticorpo.

[095] Os termos como "tratando" ou "tratamento" ou "para tratar" ou "aliviando" ou "para aliviar" referem-se às medidas terapêuticas que curam, reduzem, diminuem os sintomas de, e/ou interrompem a progressão de uma condição ou distúrbio patológico diagnosticado. Termos como "prevenir", "prevenção", "evitar", "impedimento" e similares referem-se a medidas profiláticas ou preventivas que impedem o desenvolvimento de uma condição ou distúrbio patológico alvo não diagnosticado. Assim, "aqueles em necessidade de tratamento" podem incluir os que já têm o distúrbio; aqueles mais propensos a terem o distúrbio; e aqueles em quem a doença deve ser prevenida. Conforme usado neste documento, frases como "um

sujeito que se beneficiaria com a terapia" e "um animal que precisa de tratamento" inclui sujeitos, como sujeitos mamíferos, que se beneficiariam com a administração de uma terapia conforme descrito neste documento.

[096] O termo "quantidade terapeuticamente eficaz" refere-se a uma quantidade de um anticorpo, polipeptídeo, polinucleotídeo, pequena molécula orgânica ou outro medicamento eficaz para "tratar" uma doença ou distúrbio em um sujeito ou mamífero.

[097] Por "sujeito" ou "indivíduo" ou "animal" ou "paciente" ou "mamífero" é compreendido qualquer sujeito, particularmente um sujeito mamífero, para o qual é desejado diagnóstico, prognóstico ou terapia. Os mamíferos incluem seres humanos, animais domésticos, animais de fazenda e zoológico, esportes ou animais de estimação, como cães, gatos, porquinhos-da-índia, coelhos, ratos, camundongos, cavalos, suínos, vacas, ursos e assim por diante.

#### Descrição do polipeptídeo alvo - SEMA4D

[098] Como utilizado neste documento, os termos "semaforina-4D", "SEMA4D" e "polipeptídeo SEMA4D" são usados de forma intercambiável, assim como "SEMA4D" e "Sema4D". Em certas modalidades, a SEMA4D é expresso na superfície ou secretado por uma célula. Noutra modalidade, a SEMA4D é ligado à membrana. Em outra modalidade, a SEMA4D é solúvel, *por exemplo*, sSEMA4D. Em outra modalidade, a SEMA4D pode incluir um SEMA4D de tamanho completo ou um fragmento do mesmo, ou um polipeptídeo variante SEMA4D, em que o fragmento do polipeptídeo variante SEMA4D ou SEMA4D retém algumas ou todas as propriedades funcionais da SEMA4D de tamanho completo.

[099] A proteína SEMA4D humana de tamanho completo é uma proteína transmembranar homodimérica que consiste em duas cadeias polipeptídicas de 150 kDa. SEMA4D pertence à família de semaforina dos receptores da superfície celular e também é conhecido como CD 100. SEMA4D/Sema4D humano e de camundongo

podem ser proteoliticamente clivados de sua forma transmembranar para gerar formas solúveis em 120 kDa, dando origem a duas isoformas Sema4D (Kumanogoh *et al.*, *J. Cell Science* 116:3464 (2003)). As semaforinas consistem em proteínas solúveis e ligadas à membrana que foram originalmente definidas como fatores de orientação axonal que desempenham um papel importante no estabelecimento de conexões precisas entre os neurônios e seu alvo apropriado. Estruturalmente considerada uma semaforina classe IV, a SEMA4D consiste em uma sequência de sinal amino-terminal seguida de um domínio característico 'Serna', que contém 17 resíduos de cisteína conservados, um domínio semelhante a Ig, um trecho rico em lisina, uma região transmembrana hidrofóbica e uma cauda citoplasmática.

[0100] O polipeptídeo SEMA4D inclui uma sequência de sinal de cerca de 13 aminoácidos, seguida por um domínio de semaforina de cerca de 512 aminoácidos, um domínio semelhante a imunoglobulina (semelhante a Ig) de cerca de 65 aminoácidos, um trecho rico em lisina de 104 aminoácidos, uma região transmembrana hidrofóbica de cerca de 19 aminoácidos e uma cauda citoplasmática de 110 aminoácidos. Um sítio de consenso para a fosforilação da tirosina na cauda citoplasmática suporta a associação prevista de SEMA4D com uma tirosina quinase (Schlossman *et al.*, Eds. (1995) *Leucocyte Typing V* (Oxford University Press, Oxford).

[0101] Sabe-se que a SEMA4D possui pelo menos três receptores funcionais, Plexin-B1, Plexin-B2 e CD72. Plexin-B1 é expressa em tecidos não linfoides e demonstrou ser um receptor de alta afinidade (1 nM) para SEMA4D (Tamagnone *et al.*, *Cell* 99: 71-80 (1999)). Foi demonstrado que a estimulação de SEMA4D da sinalização de Plexin-B1 induz o colapso do cone de crescimento dos neurônios e induz o colapso da extensão do processo e a apoptose dos oligodendrócitos (Giraudon *et al.*, *J. Immunol.* 172:1246-1255 (2004); Giraudon *et al.*, *NeuroMolecular Med.* 7:207-216 (2005)). Após a ligação à SEMA4D, a sinalização de Plexin-B1 medeia a inativação de R-Ras, levando a uma diminuição na ligação mediada pela

integrina à matriz extracelular, bem como à ativação de RhoA, levando ao colapso celular por reorganização do citoesqueleto (Kruger *et al.*, *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 6:789-800 (2005); Pasterkamp, *TRENDS in Cell Biology* 15:61-64 (2005)). Plexin-B2 tem uma afinidade intermediária pela SEMA4D e um relatório recente indica que plexin-B2 é expressa nos queratinócitos e ativa as células T  $\gamma\delta$  positivas para SEMA4D para contribuir para o reparo epitelial (Witherden *et al.*, *Immunity* 37:314-25 (2012)).

[0102] Nos tecidos linfoides, o CD72 é utilizado como um receptor de SEMA4D de baixa afinidade (300 nM) (Kumanogoh *et al.*, *Immunity* 13:621-631 (2000)). As células B e as células apresentadoras de antígeno (APC) expressam anticorpos CD72 e anti-CD72 têm muitos deles efeitos que o sSEMA4D, como o aprimoramento das respostas das células B induzidas por CD40 e a liberação de CD23 pelas células B. Pensa-se que o CD72 atua como um regulador negativo das respostas das células B recrutando a tirosina fosfatase SHP-1, que pode se associar a muitos receptores inibitórios. A interação de SEMA4D com CD72 resulta na dissociação de SHP-1 e na perda desse sinal de ativação negativo. Demonstrou-se que a SEMA4D promove a estimulação de células T e a agregação e sobrevivência de células B *in vitro*. A adição de células que expressam SEMA4D ou sSEMA4D aumenta a proliferação de células B induzida por CD40 e a produção de imunoglobulina *in vitro*, e acelera as respostas de anticorpos *in vivo* (Ishida *et al.*, *Inter. Immunol.* 15:1027-1034 (2003); Kumanogoh e H. Kukutani, *Trends in Immunol.* 22:670-676 (2001)). O sSEMA4D intensifica a maturação induzida por CD40 de DCs, incluindo regulação positiva de moléculas co-estimulatórias e aumento da secreção de IL-12. Além disso, o sSEMA4D pode inibir a migração de células imunes, que pode ser revertida pela adição de anticorpos anti-SEMA4D bloqueadores de camundongo (Elhabazi *et al.*, *J. Immunol.* 166:4341-4347 (2001); Delaire *et al.*, *J. Immunol.* 166:4348-4354 (2001)).

[0103] A Sema4D é expressa em altos níveis nos órgãos linfoides, incluindo o baço, o timo e os linfonodos, e em órgãos não linfoides, como o cérebro, coração e os rins. Nos órgãos linfoides, a Sema4D é abundantemente expresso em células T em repouso, mas apenas fracamente expresso em células B em repouso e nas células apresentadoras de antígeno (APCs), como as células dendríticas (DCs).

[0104] A ativação celular aumenta a expressão da superfície de SEMA4D, bem como a geração de SEMA4D solúvel (sSEMA4D). O padrão de expressão da SEMA4D sugere que ele desempenha um papel fisiológico e patológico importante no sistema imunológico. Demonstrou-se que a SEMA4D promove a ativação, agregação e sobrevivência de células B; aumenta a proliferação induzida por CD40 e produção de anticorpos; melhora a resposta de anticorpos a antígenos dependentes de células T; aumenta a proliferação de células T; melhora a maturação das células dendríticas e capacidade de estimular células T; e está diretamente implicado na desmielinização e degeneração axonal (Shi *et al.*, *Immunity* 13: 633-642 (2000); Kumanogoh *et al.*, *J. Immunol.* 169:1175-1181 (2002); e Watanabe *et al.*, *J. Immunol.* 167:4321-4328 (2001)).

#### Anticorpo Anti-SEMA4D humano

[0105] Esta divulgação fornece uma molécula de ligação anti-SEMA4D, *por exemplo*, uma molécula de ligação anti-SEMA4D, *por exemplo*, fragmento de anticorpo ou de ligação a antígeno, variante ou derivado do mesmo com uma região variável da cadeia pesada (VH) e uma região variável da cadeia leve (VL) relacionada a, ou idêntica à VH e VL compreendendo as sequências de aminoácidos SEQ ID NO: 1 e SEQ ID NO: 5, respectivamente. Em certos aspectos, a molécula de ligação fornecida, *por exemplo*, fragmento de ligação a anticorpo ou antígeno, variante ou derivado do mesmo é totalmente humana.

[0106] Em certos aspectos, a molécula de ligação a anti-SEMA4D, *por exemplo*, fragmento de ligação ao anticorpo ou antígeno, variante ou derivado da

mesma fornecido neste documento tem regiões VH e VL compreendendo sequências de aminoácidos que tem pelo menos cerca de 80%, cerca de 85%, cerca de 88%, cerca de 89%, cerca de 90%, cerca de 91%, cerca de 92%, cerca de 93%, cerca de 94%, cerca de 95%, cerca de 96%, cerca de 97%, cerca de 98%, cerca de 99% ou 100% idêntica às regiões VH e VL de uma molécula de anticorpo anti-SEMA4D de referência com regiões VH e VL compreendendo as sequências de aminoácidos SEQ ID NO: 1 e SEQ ID NO: 5, respectivamente.

[0107] Em certos aspectos, a molécula de ligação ao anti-SEMA4D, *por exemplo*, fragmento de ligação ao anticorpo ou ao antígeno, variante ou derivado, pode inibir a interação da SEMA4D com seu receptor, *por exemplo*, Plexin-B1, Plexin-B2 ou CD72. Em certos aspectos, a molécula de ligação ao anti-SEMA4D, *por exemplo*, fragmento de ligação ao anticorpo ou ao antígeno, variante ou derivado da mesma pode inibir a transdução de sinal de Plexin-B1 mediada por SEMA4D.

[0108] Em certos aspectos, a molécula de ligação ao anti-SEMA4D, *por exemplo*, anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno, variante ou derivado do mesmo inibe competitivamente um anticorpo de referência compreendendo uma região variável da cadeia pesada (VH) compreendendo a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 1 e uma região variável da cadeia leve (VL) compreendendo a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 5 da ligação a SEMA4D. Em certos aspectos, a molécula de ligação ao anti-SEMA4D, *por exemplo*, anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno, variante ou derivado do mesmo, se liga ao mesmo epítopo SEMA4D que um anticorpo de referência compreendendo uma VH compreendendo a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 1 e uma VL compreendendo a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 5. Em certos aspectos, a VH da molécula de ligação ao anti-SEMA4D, *por exemplo*, fragmento de ligação ao anticorpo ou antígeno, variante ou derivado da mesma compreende três regiões determinantes de complementaridade (CDRs) HCDR1, HCDR2 e HCDR3, e a VL compreende três CDRs LCDR1, LCDR2 e LCDR3,

as CDRs compreendendo as sequências de aminoácidos SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7 e SEQ ID NO: 8, respectivamente exceto pelo menos uma, duas, três, quatro, cinco ou seis substituições simples de aminoácidos conservadoras em uma ou mais das CDRs. Em certos aspectos, as CDRs compreendem as sequências de aminoácidos SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7 e SEQ ID NO: 8, respectivamente.

[0109] Em certos aspectos, a VH da molécula de ligação anti-SEMA4D, *por exemplo*, fragmento de ligação a anticorpo ou antígeno, variante ou derivado do mesmo compreende uma sequência de aminoácidos pelo menos 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% ou 100% idêntica à SEQ ID NO: 1 e a VL da molécula de ligação anti-SEMA4D, *por exemplo*, fragmento de ligação ao anticorpo ou antígeno, variante ou derivado do mesmo compreende uma sequência de aminoácidos pelo menos 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% ou 100% idêntica à SEQ ID NO: 5. Em certos aspectos, a VH compreende a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 1 e a VL compreende a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 5.

[0110] Também são fornecidos neste documento polipeptídeos que codificam anticorpos anti-SEMA4D, ou fragmentos de ligação ao antígeno, variantes ou derivados deles, como descrito neste documento, polinucleotídeos que codificam esses polipeptídeos, vetores que compreendem esses polinucleotídeos e células hospedeiras que compreendem esses vetores ou polinucleotídeos, para uso, *por exemplo*, na produção de uma molécula de ligação anti-SEMA4D, *por exemplo*, fragmento de ligação ao anticorpo ou antígeno, variante ou derivado da mesma, conforme fornecido neste documento.

[0111] Variantes biologicamente ativas adequadas de uma molécula de ligação a anti-SEMA4D, *por exemplo*, fragmento de ligação a anticorpo ou antígeno, variante ou derivado do mesmo são fornecidas por esta divulgação, e podem ser produzidas e utilizadas de acordo com os métodos fornecidos neste documento ou de

acordo com os métodos bem conhecidos pelos versados na técnica. Tais variantes retêm certas propriedades de ligação desejadas do anticorpo anti-SEMA4D de referência fornecido neste documento. Os métodos para produzir variantes de anticorpos estão geralmente disponíveis na técnica.

[0112] Os métodos para mutagênese e alterações na sequência de nucleotídeos são bem conhecidos na técnica. Ver, por exemplo, Walker e Gaastra, eds. (1983) *Techniques in Molecular Biology* (MacMillan Publishing Company, New York); Kunkel, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:488-492 (1985); Kunkel *et al.*, *Methods Enzymol.* 154:367-382 (1987); Sambrook *et al.* (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor, NY); Pat. US Nº 4.873.192; e as referências aí citadas; incorporado neste documento por referência. Orientação quanto às substituições de aminoácidos apropriadas que não afetam a atividade biológica do polipeptídeo de interesse pode ser encontrada no modelo de Dayhoff *et al.* (1978) *Atlas of Protein Sequence and Structure* (Natl. Biomed. Res. Found., Washington, DC), pp. 345-352, incorporado neste documento por referência na sua totalidade. O modelo de Dayhoff *et al.* usa a matriz de similaridade de aminoácidos de ponto aceito de mutação (PAM) (matriz PAM 250) para determinar substituições de aminoácidos conservativas adequadas. Em certos aspectos, substituições conservativas, tais como a troca de um aminoácido por outro tendo propriedades semelhantes, são usadas. Exemplos de substituições de aminoácidos conservativas, como ensinado pela matriz PAM 250 de Dayhoff *et al.* O modelo inclui, mas não está limitado a Gly↔Ala, Val↔Ile↔Leu, Asp↔Glu, Lys↔Arg, Asn↔Gln, e Phe↔Trp↔Tyr.

[0113] Na construção de variantes da molécula de ligação a anti-SEMA4D, *por exemplo*, um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, polipeptídeos de interesse, são feitas modificações para que as variantes continuem a possuir as propriedades desejadas, *por exemplo*, sendo capazes de se ligar especificamente a SEMA4D, *por exemplo*, SEMA4D humano, SEMA4D de primata

não humano (*por exemplo*, SEMA4D de macaco cinomolgo, sagui e/ou macaco rhesus) e/ou roedor SEMA4D (*por exemplo*, SEMA4D de camundongo e/ou rato), *por exemplo*, expressa na superfície de ou secretada por uma célula, em que a molécula de ligação, *por exemplo*, anticorpo ou fragmento, variante ou derivado deles possui atividade de ligação, bloqueio de receptor ou neutralização de SEMA4D, como descrito neste documento. Em certos aspectos, as mutações feitas no DNA que codifica o polipeptídeo variante mantêm o quadro de leitura e não criam regiões complementares que poderiam produzir estrutura secundária de mRNA. Ver a publicação do pedido de patente EP Nº 75.444.

[0114] Métodos para medir a especificidade de ligação e/ou atividade de uma molécula de ligação a anti-SEMA4D, *por exemplo*, um anticorpo ou fragmento de ligação a antígeno, variante ou derivado do mesmo incluem, mas não estão limitados a, ensaios de ligação padrão, incluindo ensaios competitivos de ligação, ensaios para monitorizar a secreção de imunoglobulina por células T ou células B, ensaios de proliferação de células T, ensaios de apoptose, ensaios ELISA e similares. Ver, por exemplo, tais ensaios divulgados no documento WO 93/14125; Shi *et al.*, *Immunity* 13:633-642 (2000); Kumanogoh *et al.*, *J. Immunol.* 169:1175-1181 (2002); Watanabe *et al.*, *J. Immunol.* 167:4321-4328 (2001); Wang *et al.*, *Blood* 97:3498-3504 (2001); e Giraudon *et al.*, *J. Immunol.* 172:1246-1255 (2004), todos incorporados neste documento por referência.

[0115] Quando discutido neste documento se algum polipeptídeo específico, incluindo as regiões constantes, CDRs, regiões VH ou regiões VL divulgadas neste documento, é pelo menos cerca de 65%, cerca de 70%, cerca de 75%, cerca de 80%, cerca de 85%, cerca de 90%, cerca de 91%, cerca de 92%, cerca de 93%, cerca de 94%, cerca de 95%, cerca de 96%, cerca de 97%, cerca de 98%, cerca de 99% ou mesmo cerca de 100% idêntica a outro polipeptídeo, a % de identidade pode ser determinada usando métodos e programas/software de computador conhecidos na

técnica. O alinhamento ideal de sequências para a comparação pode ser realizado, por exemplo, pelo algoritmo de homologia local de (Smith & Waterman, *Adv. Appl. Math.* 2:482-489 (1981), por um algoritmo de alinhamento global (Needleman & Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48: 443 (1970), por pesquisa de métodos de similaridade (Pearson & Lipman, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85:2444 (1988); Altschul *et al.*, *Nucl. Acids Res.* 25:3389-402 (1997), por implementações computadorizadas desses algoritmos (*por exemplo*, GAP, BESTFIT, FASTA e BLAST no Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, Wis.), normalmente usando as configurações padrão, ou por alinhamento manual e inspeção visual (*ver, por exemplo*, Current Protocols in Molecular Biology, Ausubel *et al.* (eds.), 1994).

[0116] Para os fins da presente divulgação, a percentagem de identidade de sequência pode ser determinada usando o algoritmo de pesquisa de homologia de Smith-Waterman usando uma pesquisa com uma penalidade de abertura de abertura de 12 e uma penalidade de extensão de abertura de 2, matriz BLOSUM de 62. Uma variante pode, por exemplo, diferir de um anticorpo anti-SEMA4D de referência (*por exemplo*, MAb 2517 fornecido neste documento) em apenas 1 a 15 resíduos de aminoácidos, em apenas 1 a 10 resíduos de aminoácidos, como 6-10, em apenas 5, em apenas 4, 3, 2 ou até mesmo 1 resíduo de aminoácido.

[0117] Em certos aspectos, a divulgação fornece um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno, variante ou derivado do mesmo que se liga especificamente a SEMA4D, em que o anticorpo ou fragmento dele compreende uma VH e uma VL. Em certos aspectos, a VH compreende regiões determinantes de complementaridade (HCDRs) HCDR1, HCDR2 e HCDR3 compreendendo sequências de aminoácidos idênticas ou idênticas, exceto por uma, duas, três, quatro, cinco ou seis substituições de aminoácidos em uma, duas ou todas as três das HCDRs para SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 e SEQ ID NO: 4, respectivamente. Em certos aspectos, as HCDR1, HCDR2

e HCDR3 compreendem sequências de aminoácidos idênticas às SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 e SEQ ID NO: 4, respectivamente. Em certos aspectos, a VL compreende regiões determinantes de complementaridade (LCDRs) LCDR1, LCDR2 e LCDR3 compreendendo sequências de aminoácidos idênticas ou idênticas, exceto por uma, duas, três, quatro, cinco ou seis substituições de aminoácidos em uma, duas ou todas as três das LCDRs para SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7 e SEQ ID NO: 8, respectivamente. Em certos aspectos, a LCDR1, a LCDR2 e a LCDR3 compreendem sequências de aminoácidos idênticas às SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7 e SEQ ID NO: 8, respectivamente. Em certos aspectos, a VH compreende ainda regiões framework (HFWs) HFW1, HFW2, HFW3 e HFW4, e a VL compreende ainda regiões framework (LFWs) LFW1, LFW2, LFW3 e LFW4. Em certos aspectos, as regiões framework são derivadas de um anticorpo humano. Em certos aspectos, *por exemplo*, onde o anticorpo deve ser usado em um sistema modelo não humano, as regiões framework são derivadas de um anticorpo não humano, *por exemplo*, um anticorpo de camundongo. Em certos aspectos, a VH compreende a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 1. Em certos aspectos, a VL compreende a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 5.

[0118] Em certos aspectos, a divulgação fornece um anticorpo, *por exemplo*, um anticorpo completamente humano, ou um fragmento de ligação ao antígeno, variante ou derivado do mesmo que se liga especificamente à semaforina-4D (SEMA4D) compreendendo VH e uma VL. Em certos aspectos, a VH compreende uma sequência de aminoácidos pelo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou 100% idêntica à SEQ ID NO: 1. Em certos aspectos, a VL compreende uma sequência de aminoácidos pelo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou 100% idêntica à SEQ ID NO: 5. Em certos aspectos, a VH compreende uma sequência de aminoácidos pelo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou 100% idêntica à SEQ ID NO: 1; e a VL compreende uma sequência de aminoácidos

pelo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou 100% idêntica à SEQ ID NO: 5. Em certos aspectos, a VH compreende a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 1 e a VL compreende a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 5. Em certos aspectos, a VH e a VL são completamente humanos.

[0119] Em certos aspectos, o anticorpo anti-SEMA4D ou fragmento de ligação ao antígeno, variante ou derivado do mesmo como fornecido neste documento pode se ligar especificamente à SEMA4D humano, SEMA4D de roedor, *por exemplo*, SEMA4D de camundongo e/ou SEMA4D de rato, e/ou SEMA4D de primata não humano, *por exemplo*, SEMA4D de macaco cinomolgo e/ou SEMA4D de sagui.

[0120] Em certos aspectos, o anticorpo ou fragmento, variante ou derivado dele compreende ainda uma região constante da cadeia pesada ou fragmento, variante ou derivado dele fundido ao terminal C da VH. A região constante da cadeia pesada ou fragmento da mesma pode ser derivada de qualquer espécie, mas em certos aspectos a região constante da cadeia pesada ou fragmento, variante ou derivado dele é derivada de uma região constante da cadeia pesada humana ou é uma região constante da cadeia pesada humana, *por exemplo*, uma região constante de IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgE ou IgM humana. Em certos aspectos, a região constante da cadeia pesada é uma região constante de IgG4 humana, ou fragmento, variante ou derivado dela. Em certos aspectos, *por exemplo*, onde o anticorpo anti-SEMA4D ou fragmento dele fornecido deve ser usado em um sistema não humano, a região constante da cadeia pesada ou fragmento da mesma pode ser uma região constante da cadeia pesada não humana, *por exemplo*, um região constante da cadeia pesada murina, tal como uma região constante IgG1 murina.

[0121] Em certos aspectos, o anticorpo ou fragmento, variante ou derivado dele compreende ainda uma região constante da cadeia leve ou fragmento, variante ou derivado dela fundida ao terminal C da VL. A região constante da cadeia leve ou fragmento dela pode ser derivada de qualquer espécie, mas em certos aspectos a

região constante da cadeia leve ou fragmento da mesma é derivada de uma região constante da cadeia leve humana, *por exemplo*, uma região constante kappa ou lambda humana. Em certos aspectos, a região constante da cadeia leve ou fragmento, variante ou derivado dela ou é derivada de uma região constante da cadeia leve lambda humana. Em certos aspectos, a região constante da cadeia leve é uma região constante lambda humana. Em certos aspectos, *por exemplo*, onde o anticorpo anti-SEMA4D ou fragmento dos mesmos fornecido deve ser usado em um sistema modelo não humano, a região constante da cadeia leve ou fragmento da mesma pode ser uma região constante da cadeia leve não humana, *por exemplo*, um região constante da cadeia leve murina, tal como uma região constante lambda murina.

[0122] Em certos aspectos, a divulgação fornece um fragmento de anticorpo anti-SEMA4D compreendendo regiões VH e VL como descrito acima. Em certos aspectos, o fragmento pode ser, *por exemplo*, um fragmento Fab, um fragmento Fab', um fragmento F(ab')2, um fragmento Fd, um fragmento Fv de cadeia simples (scFv) ou um fragmento Fv ligado a dissulfeto (sdFv).

[0123] Em certos aspectos, o anticorpo anti-SEMA4D ou fragmento, variante ou derivado deles fornecido por esta divulgação pode ser multiespecífico, *por exemplo*, biespecífico. Além das propriedades de ligação de um anticorpo de SEMA4D, conforme fornecido neste documento, um anticorpo multiespecífico ou fragmento deles, conforme fornecido neste documento, pode se ligar a epítopos de SEMA4D adicionais ou pode se ligar a outros epítopos não relacionados.

[0124] Em certos aspectos, um anticorpo anti-SEMA4D ou fragmento dele, conforme fornecido neste documento, pode se ligar especificamente a SEMA4D, *por exemplo*, SEMA4D humano, SEMA4D de camundongo, SEMA4D de macaco cinomolgo, SEMA4D de sagui ou qualquer combinação deles, com uma afinidade de ligação **CARACTERIZADA** por uma constante de dissociação  $K_D$  não superior a 500 nM, 100 nM, 50,0 nM, 40,0 nM, 30,0 nM, 20,0 nM, 10,0 nM, 9,0 nM, 8,0 nM, 7,0 nM,

6,0 nM, 5,0 nM, 4,0 nM, 3,0 nM, 2,0 nM, 1,0 nM, 0,50 nM, 0,10 nM, 0,050 nM, 0,01 nM 0,005 nM, ou 0,001 nM. Métodos e dispositivos para medir o  $K_D$  de um anticorpo ou fragmento dele para SEMA 4D, tal como BIACORE, são bem conhecidos daqueles versados na técnica.

[0125] Em certos aspectos, o anticorpo anti-SEMA4D ou fragmento dele fornecido por esta divulgação pode inibir a ligação de SEMA4D a um receptor de SEMA4D, *por exemplo*, Plexin-B1, Plexin-B2 e/ou CD72.

[0126] Em certos aspectos, o anticorpo anti-SEMA4D ou fragmento de ligação ao antígeno, variante ou derivado dele fornecido neste documento é totalmente humano e provoca resposta imune mínima ou inexistente ao ser administrado a um sujeito humano. Os métodos para medir as respostas imunes ao anticorpo em um sujeito são bem conhecidos na técnica. Ver, *por exemplo*, Darwish, IA, *Int. J. Biomed. Sci.* 2:217-235 (2006).

[0127] A região constante de um anticorpo anti-SEMA4D pode ser mutada para alterar a função efetora de várias maneiras. Por exemplo, ver Patente US Nº 6.737.056 B1 e Publicação de Pedido de Patente US Nº 2004/0132101 A1, que descrevem mutações Fc que otimizam a ligação de anticorpos a receptores Fc.

[0128] Em certas moléculas de ligação a anti-SEMA4D, *por exemplo*, anticorpos ou fragmentos, variantes ou derivados deles fornecidos neste documento, a porção Fc pode ser mutada para modular, *por exemplo*, aumentar ou diminuir a função efetiva usando técnicas conhecidas na técnica. Por exemplo, a exclusão ou desativação (através de mutações pontuais ou outros meios) de um domínio de região constante pode reduzir a ligação ao receptor Fc do anticorpo modificado circulante, aumentando a localização tumoral. Noutros casos, modificações constantes da região consistentes com a presente divulgação modulam a ligação do complemento e, portanto, podem aumentar ou reduzir a meia-vida sérica. Ainda outras modificações da região constante podem ser usadas para modificar as ligações dissulfeto ou

frações de oligossacarídeo que permitem a localização melhorada, devido à especificidade antigênica aumentada ou à flexibilidade do anticorpo. O perfil fisiológico resultante, biodisponibilidade e outros efeitos bioquímicos das modificações, tais como a localização tumoral, biodistribuição e meia-vida sérica, podem ser facilmente medidos e quantificados, usando técnicas imunológicas bem conhecidas sem experimentação indevida.

[0129] Moléculas de ligação anti-SEMA4D, *por exemplo*, anticorpos ou fragmentos deles fornecidos neste documento incluem derivados que são modificados, *por exemplo*, pela ligação covalente de qualquer tipo de molécula ao anticorpo, de modo que a ligação covalente não impeça que o anticorpo se ligue especificamente a seu epítopo cognato. Por exemplo, mas não à título de limitação, os derivados do anticorpo incluem anticorpos que foram modificados, *por exemplo*, por glicosilação, acetilação, peguilação, fosforilação, amidação, derivatização por grupos de proteção/bloqueio conhecidos, clivagem proteolítica, ligação a um ligante celular ou outra proteína, etc. Qualquer uma das inúmeras modificações químicas pode ser realizada por técnicas conhecidas, incluindo, mas não se limitando a clivagem química específica, acetilação, formilação, etc. Adicionalmente, o derivado pode conter um ou mais aminoácidos não clássicos.

[0130] Uma "substituição de aminoácido conservativa" é aquela na qual o resíduo de aminoácido é substituído por um resíduo de aminoácido tendo uma cadeia lateral com uma carga semelhante. As famílias de resíduos de aminoácidos com cadeias laterais com cargas semelhantes foram definidas na técnica. Estas famílias incluem aminoácidos com cadeias laterais básicas (*por exemplo*, lisina, arginina, histidina), cadeias laterais ácidas (*por exemplo*, ácido aspártico, ácido glutâmico), cadeias laterais polares não carregadas (*por exemplo*, glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína, triptofano), cadeias laterais não polares (*por exemplo*, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina,

triptofano), cadeias laterais beta-ramificadas (*por exemplo*, treonina, valina, isoleucina) e cadeias laterais aromáticas (*por exemplo*, tirosina, fenilalanina, triptofano, histidina). Alternativamente, as mutações podem ser introduzidas aleatoriamente ao longo de toda ou parte da sequência de codificação, como por mutagênese por saturação, e os mutantes resultantes podem ser triados quanto à atividade biológica para identificar mutantes que retêm atividade (*por exemplo*, a capacidade de ligar um polipeptídeo anti-SEMA4D, para bloquear a interação de SEMA4D com seu receptor ou para inibir, atrasar ou reduzir as metástases em um sujeito, *por exemplo*, um paciente com câncer).

[0131] Por exemplo, é possível introduzir mutações apenas em regiões framework ou apenas em regiões CDR de uma molécula de anticorpo. As mutações introduzidas podem ser mutações missense silenciosas ou neutras, *ou seja*, não têm, ou têm pouco, efeito sobre a capacidade de um anticorpo se ligar ao antígeno. Esses tipos de mutações podem ser úteis para otimizar o uso do códon, ou melhorar a produção de anticorpos de um hibridoma. Alternativamente, as mutações missense não neutras podem alterar a capacidade de um anticorpo de se ligar ao antígeno. Uma pessoa versada na técnica seria capaz de projetar e testar moléculas mutantes com as propriedades desejadas, tais como nenhuma alteração na atividade de ligação ao antígeno ou alteração na atividade de ligação (*por exemplo*, melhorias na atividade de ligação ao antígeno ou mudança na especificidade do anticorpo). Seguindo à mutagênese, a proteína codificada pode ser expressa rotineiramente e a atividade funcional e/ou biológica da proteína codificada, (*por exemplo*, capacidade de se ligar imunoespecificamente pelo menos a um epítopo de um polipeptídeo SEMA4D) podem ser determinadas usando as técnicas descritas neste documento ou modificando rotineiramente as práticas conhecidas na técnica.

[0132] Em certos aspectos, uma molécula de ligação a anti-SEMA4D, *por exemplo*, anticorpo ou fragmento dele fornecido neste documento pode compreender

pelo menos uma região determinante de complementaridade otimizada (CDR). Por "CDR otimizada" entende-se que a CDR tenha sido modificada e otimizada para melhorar a afinidade de ligação e/ou atividade anti-SEMA4D que é transmitida a uma molécula de ligação anti-SEMA4D compreendendo a CDR otimizada. "Atividade anti-SEMA4D" ou "atividade de bloqueio da SEMA4D" podem incluir atividades que modulam *por exemplo*, reduzem, eliminam, diminuem ou impedem uma ou mais atividades da SEMA4D. As atividades de SEMA4D não limitativas incluem: ativação, agregação e sobrevivência de células B; proliferação induzida por CD40 e produção de anticorpos; resposta de anticorpo a antígenos dependentes de células T; proliferação de células T ou outras células imunes; maturação celular dendrítica; desmielinização e degeneração axonal; apoptose de precursores neurais pluripotentes e/ou oligodendrócitos; indução da migração celular endotelial; inibição da migração espontânea de monócitos; promoção de crescimento ou metástase de células tumorais, ligação à plexin-B1 da superfície celular ou outro receptor ou qualquer outra associação de atividade com SEMA4D ou SEMA4D solúvel que é expressa na superfície das células SEMA4D+. Em uma modalidade específica, a atividade anti-SEMA4D inclui a capacidade de inibir, atrasar ou reduzir as metástases tumorais, em combinação com inibição, atraso ou redução do crescimento celular primário de células tumorais e metástases tumorais, ou independentemente do crescimento celular primário e metástases tumorais. A atividade anti-SEMA4D também pode ser atribuída a uma diminuição na incidência ou gravidade de doenças associadas à expressão de SEMA4D, incluindo, mas não limitados, certos tipos de câncer, incluindo tumores sólidos e linfomas, doenças autoimunes, doenças inflamatórias, incluindo o sistema nervoso central (CNS) e doenças inflamatórias do sistema nervoso periférico (PNS), doenças neurodegenerativas, rejeições de transplantes e angiogênese invasiva.

Polinucleotídeos que codificam anticorpos anti-SEMA4D

[0133] Esta divulgação também fornece um polinucleotídeo isolado, ou dois ou mais polinucleotídeos compreendendo uma ou mais sequências de ácidos nucleicos que codificam uma molécula de ligação anti-SEMA4D, *por exemplo*, um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno, variante ou derivado dele, conforme fornecido neste documento.

[0134] Em um aspecto, a divulgação fornece um polinucleotídeo isolado ou combinação de polinucleotídeos compreendendo uma ou mais sequências de ácidos nucleicos que codificam uma molécula de ligação anti-SEMA4D, *por exemplo*, anticorpo ou fragmento, variante ou derivado dele como fornecido neste documento, ou uma subunidade do mesmo, *por exemplo*, uma subunidade da cadeia pesada ou fragmento da mesma ou uma subunidade da cadeia leve ou fragmento da mesma.

[0135] Em certos aspectos, um polinucleotídeo ou combinação de polinucleotídeos conforme fornecido neste documento compreende uma sequência de ácido nucleico que codifica a VH da molécula de ligação anti-SEMA4D, *por exemplo*, anticorpo ou fragmento, variante ou derivado dele. Em certos aspectos, um polinucleotídeo ou combinação de polinucleotídeos, conforme fornecido neste documento, compreende uma sequência de ácido nucleico que codifica a VL da molécula de ligação *anti-SEMA4D*, *por exemplo*, anticorpo ou fragmento, variante ou derivado dele. Em certos aspectos, um polinucleotídeo ou combinação de polinucleotídeos conforme fornecido neste documento compreende uma sequência de ácido nucleico que codifica a VH e uma sequência de ácido nucleico que codifica a VL da molécula de ligação anti-SEMA4D, *por exemplo*, anticorpo ou fragmento, variante ou derivado dele. Em certos aspectos, a sequência de ácido nucleico que codifica VH e a sequência de ácido nucleico que codifica VL estão situadas no mesmo vetor. Esse vetor é fornecido pela divulgação. Em certos aspectos, a sequência de ácido nucleico que codifica VH e a sequência de ácido nucleico que codifica VL estão situadas em vetores separados. Tais vetores também são fornecidos pela divulgação.

Os vetores fornecidos pela divulgação podem ainda compreender elementos genéticos para permitir a expressão do anticorpo ou fragmento dele. Tais elementos genéticos, tais como promotores, sequências de poliadenilação e potenciadores, são descritos em outras partes neste documento. A divulgação fornece ainda uma célula hospedeira compreendendo o polinucleotídeo ou combinação de polinucleotídeos fornecidos neste documento e/ou o vetor ou vetores fornecidos neste documento.

[0136] Também é fornecido um método para a produção do anticorpo anti-SEMA4D ou fragmento, variante ou derivado dele, conforme fornecido neste documento, em que o método compreende a cultura de uma célula hospedeira conforme fornecida neste documento e a recuperação do anticorpo ou fragmento dele.

[0137] Em certos aspectos, a divulgação fornece um polinucleotídeo isolado, ou dois ou mais polinucleotídeos compreendendo uma ou mais sequências de ácidos nucleicos que codificam um anticorpo anti-SEMA4D ou um fragmento de ligação ao antígeno ou fragmento de ligação ao antígeno, variante ou derivado do mesmo, ou uma subunidade deles, onde o anticorpo compreende uma VH e uma VL, a VH compreendendo regiões determinantes da complementaridade (HCDRs) HCDR1, HCDR2 e HCDR3 compreendendo sequências de aminoácidos idênticas ou idênticas, exceto por uma, duas, três ou quatro substituições de aminoácidos em uma, duas ou todas três das HCDRs para a SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 e SEQ ID NO: 4, respectivamente; e a VL compreendendo regiões determinantes de complementaridade (LCDRs) LCDR1, LCDR2 e LCDR3 compreendendo sequências de aminoácidos idênticas ou idênticas, exceto por uma, duas, três ou quatro substituições de aminoácidos em uma, duas ou todas as três LCDRs para SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7 e SEQ ID NO: 8, respectivamente.

[0138] Em certos aspectos, a divulgação fornece um polinucleotídeo isolado, ou dois ou mais polinucleotídeos compreendendo uma ou mais sequências de ácidos nucleicos que codificam um anticorpo anti-SEMA4D ou um fragmento de ligação ao

antígeno, variante ou derivado dele, ou uma subunidade dele, onde o anticorpo comprehende uma VH e uma VL, a VH comprehendendo uma sequência de aminoácidos pelo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou 100% idêntica à SEQ ID NO: 1 e a VL comprehendendo uma sequência de aminoácidos pelo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou 100% idêntica à SEQ ID NO: 5.

[0139] Qualquer um dos polinucleotídeos descritos acima pode ainda incluir sequências adicionais de ácidos nucleicos, codificando, *por exemplo*, regiões constantes de cadeias pesadas ou leves ou fragmentos das mesmas, como descrito em outras partes deste documento, um peptídeo sinal para direcionar a secreção do polipeptídeo codificado ou outros polipeptídeos heterólogos como descrito neste documento. Além disso, como descrito em mais detalhes em outra parte deste documento, esta divulgação inclui composições compreendendo um ou mais dos polinucleotídeos descritos acima.

[0140] Em uma modalidade, esta divulgação inclui composições compreendendo um primeiro polinucleotídeo e um segundo polinucleotídeo, o primeiro polinucleotídeo comprehendendo uma sequência de ácido nucleico que codifica uma VH como descrito neste documento e o segundo polinucleotídeo que codifica uma VL como descrito neste documento.

[0141] Esta divulgação também inclui fragmentos dos polinucleotídeos fornecidos neste documento, como descrito em outro lugar. Além disso, são fornecidos polinucleotídeos que codificam polipeptídeos de fusão, fragmentos Fab e outros derivados, como descrito neste documento.

[0142] Os polinucleotídeos fornecidos por esta divulgação podem ser produzidos ou fabricados por qualquer método conhecido na técnica. Por exemplo, se a sequência nucleotídica do anticorpo é conhecida, um polinucleotídeo que codifica o anticorpo pode ser montado a partir de oligonucleotídeos quimicamente sintetizados

(*por exemplo*, conforme descrito em Kutmeier *et al.*, *Bio Techniques* 17:242 (1994)), que, resumidamente, envolve a síntese de oligonucleotídeos de sobreposição contendo porções da sequência que codifica o anticorpo, anelamento e ligação desses oligonucleotídeos, e, em seguida, a amplificação dos oligonucleotídeos ligados por PCR.

[0143] Alternativamente, um polinucleotídeo que codifica uma molécula de ligação anti-SEMA4D, *por exemplo*, um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno, variante ou derivado do mesmo, conforme fornecido neste documento, pode ser gerado a partir de sequências de ácidos nucleicos derivadas de uma fonte adequada. Se um clone contendo um polinucleotídeo que codifica um anticorpo particular não estiver disponível, mas a sequência da molécula de anticorpo for conhecida, um ácido nucleico que codifica o anticorpo pode ser quimicamente sintetizado ou obtido a partir de uma fonte adequada (*por exemplo*, uma biblioteca de cDNA de anticorpos ou uma biblioteca de cDNA gerada a partir de, ou ácido nucleico , *por exemplo*, RNA poli A<sup>+</sup> , isolado de qualquer tecido ou célula que expressa o anticorpo ou outro anticorpo anti-SEMA4D, como células de hibridoma selecionadas para expressar um anticorpo) por amplificação por PCR usando primers sintéticos hibridáveis para as extremidades 3' e 5' da sequência ou por clonagem usando uma sonda oligonucleotídica específica para a sequência genética particular para identificar, *por exemplo*, um clone de cDNA de uma biblioteca de cDNA que codifica o anticorpo ou outro anticorpo anti-SEMA4D. Os ácidos nucleicos amplificados gerados por PCR podem, então, ser clonados em vetores de clonagem replicáveis, usando qualquer método bem conhecido na técnica.

[0144] Depois que a sequência nucleotídica e a sequência de aminoácidos correspondente do anticorpo anti-SEMA4D, ou fragmento de ligação ao antígeno, variante ou derivado do mesmo é determinada, sua sequência nucleotídica pode ser manipulada usando métodos bem conhecidos na técnica para a manipulação de

sequências nucleotídicas, *por exemplo*, técnicas de DNA recombinante, mutagênese dirigida ao sítio, PCR, etc. (ver, por exemplo, as técnicas descritas em Sambrook *et al.* (1990) Molecular Cloning, A Laboratory Manual (2<sup>a</sup> ed.; Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.) e Ausubel *et al.*, eds. (1998) Current Protocols in Molecular Biology (John Wiley & Sons, NY), que são ambos incorporados por referência neste documento em sua totalidade), para gerar anticorpos com uma sequência de aminoácidos diferente, por exemplo, para criar substituições, deleções e/ou inserções de aminoácidos.

[0145] Um polinucleotídeo ou combinação de polinucleotídeos que codificam uma molécula de ligação ao anti-SEMA4D, *por exemplo*, um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno, variante ou derivado do mesmo, pode ser composto de qualquer polirribonucleotídeo ou polideoxirribonucleotídeo, que pode ser RNA ou DNA não modificado, ou RNA ou DNA modificado. Por exemplo, um polinucleotídeo ou combinação de polinucleotídeos que codifica um anticorpo anti-SEMA4D ou fragmento de ligação ao antígeno, variante, ou derivado deles pode ser composto de um DNA de fita única e dupla, DNA que é uma mistura de regiões de fita única e dupla, RNA de fita única e dupla, e RNA que é mistura de regiões de fita única e dupla, moléculas híbridas compreendendo DNA e RNA que podem ser de fita única ou, mais normalmente, de fita dupla ou uma mistura de regiões de fita única e dupla. Além disso, um polinucleotídeo ou combinação de polinucleotídeos que codificam uma molécula de ligação a anti-SEMA4D, *por exemplo*, um anticorpo ou fragmento de ligação a antígeno, variante ou derivado deles pode ser composto de regiões de fita tripla compreendendo RNA ou DNA ou RNA e DNA. Um polinucleotídeo ou combinação de polinucleotídeos que codificam uma molécula de ligação a anti-SEMA4D, *por exemplo*, anticorpo ou fragmento de ligação a antígeno, variante ou derivado do mesmo, também pode conter uma ou mais bases modificadas ou estruturas principais de DNA ou RNA modificados por estabilidade ou por outros

motivos. As bases "modificadas" incluem, por exemplo, bases trilitadas e bases incomuns, como inosina. Uma variedade de modificações pode ser feita ao DNA e RNA; assim, o "polinucleotídeo" envolve quimicamente, enzimaticamente ou metabolicamente as formas modificadas.

[0146] Um polinucleotídeo isolado ou combinação de polinucleotídeos que codificam uma variante não natural de um polipeptídeo derivado de uma imunoglobulina (*por exemplo*, uma porção de cadeia pesada ou porção de cadeia leve de imunoglobulina) pode ser criado introduzindo uma ou mais substituições, adições ou deleções de nucleotídeos sequência nucleotídica da imunoglobulina de modo que uma ou mais substituições, adições ou deleções de aminoácidos sejam introduzidas na proteína codificada. As mutações podem ser introduzidas por técnicas padrão, tais como a mutagênese dirigida ao sítio e mutagênese mediada por PCR. Em certos aspectos, as substituições de aminoácidos conservativas podem ser feitas em um ou mais resíduos de aminoácidos não essenciais.

#### Proteínas de Fusão e Conjugados de Anticorpo

[0147] Como discutido em mais detalhes em outra parte deste documento, uma molécula de ligação a anti-SEMA4D, *por exemplo*, um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno, variante ou derivado do mesmo, conforme fornecido neste documento, pode ainda ser fundida de forma recombinante a um polipeptídeo heterólogo no terminal C ou N ou conjugado quimicamente (incluindo conjugações covalentes e não covalentes) a polipeptídeos ou outras frações heterólogas. Por exemplo, anticorpos anti-SEMA4D podem ser recombinantemente fundidos ou conjugados a moléculas úteis como marcadores em ensaios de detecção e moléculas efetoras como polipeptídeos heterólogos, drogas, radionuclídeos ou toxinas. Ver, *por exemplo*, publicações PCT WO 92/08495; WO 91/14438; WO 89/12624; Pat. US Nº 5.314.995; e EP 396.387. Em certos aspectos, a fração heteróloga pode ser, por exemplo, um polipeptídeo, um agente citotóxico, um agente terapêutico, uma pró-

droga, um lipídio, um carboidrato, um ácido nucleico, um marcador detectável, um polímero ou qualquer combinação do mesmo. Polipeptídeos heterólogos exemplificativas incluem, sem limitação, uma molécula de ligação, uma enzima, uma citocina, uma linfocina, um peptídeo hormonal ou qualquer combinação do mesmo. Agentes citotóxicos exemplificativos incluem, sem limitação, um radionuclídeo, uma toxina biológica, uma toxina enzimaticamente ativa ou qualquer combinação do mesmo. Marcadores detectáveis exemplificativas incluem, sem limitação, uma enzima, um marcador fluorescente, um marcador quimioluminescente, um marcador bioluminescente, um marcador radioativo ou qualquer combinação do mesmo.

[0148] Uma molécula de ligação a anti-SEMA4D, *por exemplo*, um anticorpo ou fragmento de ligação a antígeno, variante ou derivado do mesmo, conforme fornecido neste documento pode incluir derivados que são modificados, *por exemplo*, pela ligação covalente de qualquer tipo de fração ao anticorpo, essa ligação covalente não previne que a molécula de ligação se ligue a SEMA4D. Por exemplo, mas não à título de limitação, um derivado de anticorpo pode ser modificado, *por exemplo*, por glicosilação, acetilação, peguilação, fosforilação, amidação, derivatização por grupos de proteção/bloqueio conhecidos, clivagem proteolítica, ligação a um ligante celular ou outra proteína, etc. Qualquer uma das inúmeras modificações químicas pode ser realizada por técnicas conhecidas, incluindo, mas não se limitando a clivagem química específica, acetilação, formilação, etc. Adicionalmente, o derivado pode conter um ou mais aminoácidos não clássicos.

[0149] Uma molécula de ligação ao anti-SEMA4D, por exemplo, um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno, variante ou derivado do mesmo, conforme fornecido neste documento, pode ser composta de aminoácidos unidos entre si por ligações peptídicas ou ligações peptídicas modificadas, *por exemplo*, isômeros peptídicos, e pode conter outros aminoácidos além dos 20 aminoácidos codificados em genes. Por exemplo, uma molécula de ligação a anti-SEMA4D, *por exemplo*, um

anticorpo ou fragmento de ligação a antígeno, variante ou derivado do mesmo, conforme fornecido neste documento, pode ser modificada por processos naturais, como processamento pós-tradução ou por técnicas de modificação química que são bem conhecidas na técnica. Tais modificações são bem descritas em textos básicos e em monografias mais detalhadas, bem como em uma literatura de pesquisa volumosa. Modificações podem ocorrer em qualquer lugar da molécula de ligação a anti-SEMA4D, incluindo a estrutura principal do peptídeo, as cadeias laterais do aminoácido e os terminais amino ou carboxil, ou em frações tais como carboidratos. Além disso, uma dada molécula de ligação anti-SEMA4D pode conter muitos tipos de modificações. As moléculas de ligação a anti-SEMA4D podem ser ramificadas, por exemplo, como resultado da ubiquitinação, e podem ser cíclicas, com ou sem ramificação. A molécula de ligação a anti-SEMA4D cíclica, ramificada e ramificada cíclica pode resultar de processos naturais pós-traducionais ou pode ser feita por métodos sintéticos. As modificações incluem, por exemplo, acetilação, acilação, ribosilação de ADP, amidação, ligação covalente de flavina, ligação covalente de uma fração de heme, ligação covalente de um nucleotídeo ou derivado de nucleotídeo, ligação covalente de um lipídio ou derivado de lipídio, ligação covalente de fosfotidilinositol, ligação cruzada, ciclização, formação de ligação dissulfeto, desmetilação, formação de ligações cruzadas covalentes, formação de cisteína, formação de piroglutamato, formilação, gama-carboxilação, glicosilação, formação de âncora de GPI, hidroxilação, iodação, metilação, miristilação, oxidação, peguilação, processamento proteolítico, fosforilação, prenilação, racemização, selenoilação, sulfatação, adição mediada por RNA transportador de aminoácidos a proteínas, tais como arginilação, e ubiquitinação. (Ver, por exemplo, Proteins-Structure and Molecular Properties, T.E. Creighton, WH Freeman and Company, NY; 2<sup>a</sup> ed. (1993); Johnson, ed. (1983) Posttranslational Covalent Modification of Proteins (Academic Press, NY), pgs. 1-12; Seifter *et al.*, *Meth. Enzymol.* 182:626-646 (1990); Rattan

*etal., Ann. NY Acad Set. 663:48-62 (1992)).*

[0150] Esta divulgação também fornece proteínas de fusão compreendendo uma molécula de ligação anti-SEMA4D, *por exemplo*, um anticorpo ou fragmento de ligação a antígeno, variante ou derivado do mesmo, conforme fornecido neste documento, e um polipeptídeo heterólogo. O polipeptídeo heterólogo ao qual o anticorpo é fundido pode ser útil para a função ou é útil para tomar por alvo as células que expressam polipeptídeo anti-SEMA4D. Uma molécula de ligação a anti-SEMA4D, *por exemplo*, um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno, variante ou derivado do mesmo, conforme fornecido neste documento, pode ser fundida ou conjugada com um ou mais polipeptídeos heterólogos ou outras frações para aumentar a meia-vida *in vivo* dos polipeptídeos ou para uso em imunoensaios usando métodos conhecidos na técnica. Por exemplo, numa modalidade, o PEG ou albumina de soro humano pode ser fundido ou conjugado com uma molécula de ligação anti-SEMA4D, conforme fornecido neste documento, para aumentar sua meia-vida *in vivo*. Ver Leong *et al.*, *Cytokine* 76:106 (2001); *Adv. in Drug Deliv. Rev.* 54:531 (2002); ou Weir *et al.*, *Biochem. Soc. Transactions* 30:512 (2002).

[0151] Além disso, uma molécula de ligação a anti-SEMA4D, *por exemplo*, um anticorpo ou fragmento de ligação a antígeno, variante ou derivado do mesmo, conforme fornecido neste documento, pode ser fundida a uma ou mais sequências de marcadores, como um peptídeo, para facilitar sua purificação ou detecção. Em certas modalidades, a sequência de aminoácidos marcadora é um peptídeo hexa-histidina (HIS), assim como a tag fornecida em um vetor pQE (QIAGEN, Inc.), entre outros, muitos dos quais estão comercialmente disponíveis. Conforme descrito em Gentz *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:821-824 (1989), por exemplo, hexa-histidina fornece uma conveniente purificação da proteína de fusão. Outras tags peptídicas úteis para purificação incluem, mas não estão limitadas a, a tag "HA", que corresponde a um epítopo derivado da proteína hemaglutinina da influenza (Wilson *et al.*, *Cell* 37: 16'1

(1984)) e a tag "flag".

[0152] Proteínas de fusão podem ser preparadas usando métodos que são bem conhecidas na técnica; (ver, por exemplo, Pat. US N°s 5.116.964 e 5.225.538). O sítio preciso em que a fusão é feita pode ser selecionado empiricamente para otimizar as características de secreção ou ligação da proteína de fusão. O DNA que codifica a proteína de fusão é então transfetado para dentro de uma célula hospedeira para a expressão.

[0153] Uma molécula de ligação a anti-SEMA4D, *por exemplo*, um anticorpo ou fragmento de ligação a antígeno, variante ou derivado do mesmo, conforme fornecido neste documento, pode ser usada na forma não conjugada ou pode ser conjugada a pelo menos uma dentre uma variedade de moléculas, *por exemplo*, para melhorar as propriedades terapêuticas da molécula, para facilitar a detecção do alvo ou para geração de imagens ou terapia do paciente. Uma molécula de ligação a anti-SEMA4D, *por exemplo*, um anticorpo ou fragmento de ligação a antígeno, variante ou derivado do mesmo, conforme fornecido neste documento, pode ser marcada ou conjugada antes ou após a purificação ou quando a purificação é realizada.

[0154] Em particular, uma molécula de ligação a anti-SEMA4D, *por exemplo*, um anticorpo ou fragmento de ligação a antígeno, variante ou derivado do mesmo, conforme fornecido neste documento, pode ser conjugada a agentes terapêuticos, pró-drogas, agentes citotóxicos, peptídeos, proteínas, enzimas, vírus, lipídios, modificadores de resposta biológica, agentes farmacêuticos ou PEG.

[0155] As pessoas versadas na técnica apreciarão que os conjugados também podem ser montados usando uma variedade de técnicas, dependendo do agente selecionado a ser conjugado. Por exemplo, os conjugados com biotina são preparados, *por exemplo*, reagindo um polipeptídeo de ligação com um éster ativado de biotina, como o éster de biotina N-hidroxisuccinimida. Da mesma forma, conjugados com um marcador fluorescente podem ser preparados na presença de um

agente de acoplamento, *por exemplo*, aqueles listados neste documento, ou por reação com um isocianato, *por exemplo*, fluoresceinisocianato. Os conjugados de uma molécula de ligação a anti-SEMA4D, *por exemplo*, um anticorpo ou fragmento de ligação a antígeno, variante ou derivado do mesmo, conforme fornecido neste documento, podem ser preparados de uma maneira análoga.

[0156] Esta divulgação engloba ainda uma molécula de ligação a anti-SEMA4D, *por exemplo*, um anticorpo ou fragmento de ligação a antígeno, variante ou derivado do mesmo, conforme fornecido neste documento, conjugado com um agente de diagnóstico ou terapêutico. Essas moléculas de ligação a anti-SEMA4D podem ser usadas em diagnóstico para, por exemplo, monitorar o desenvolvimento ou progressão de uma doença como parte de um procedimento de teste clínico para, *por exemplo*, determinar a eficácia de um determinado tratamento e/ou regime de prevenção. Por exemplo, a detecção pode ser facilitada acoplando a molécula de ligação a anti-SEMA4D a uma substância detectável. Exemplos substâncias detectáveis incluem várias enzimas, grupos prostéticos, materiais fluorescentes, materiais luminescentes, materiais bioluminescentes, materiais radioativos, metais emissores de pósitrons usando várias tomografias de emissão de pósitron e íons metálicos paramagnéticos não radioativos. Ver, por exemplo, a Pat. US Nº 4.741.900 para íons metálicos que podem ser conjugados com anticorpos para uso como diagnóstico de acordo com esta divulgação. Exemplos de enzimas adequadas incluem peroxidase de raiz forte, fosfatase alcalina,  $\beta$ -galactosidase, ou acetilcolinesterase; exemplos adequados de complexos de grupos prostéticos incluem estreptavidina/biotina e avidina/biotina; exemplos adequados de materiais fluorescentes incluem umbelifera, fluoresceína, isocianato de fluoresceína, rodamina, diclorotriazinilamina fluoresceína, cloreto de dansil ou ficoeritrina; um exemplo de um material luminescente inclui luminol; exemplos de materiais bioluminescentes incluem luciferase, luciferina, e aequorina; e exemplos de material

radioativo adequado incluem  $^{125}\text{I}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{111}\text{In}$ ,  $^{90}\text{Y}$  ou  $^{99}\text{Tc}$ .

[0157] Uma molécula de ligação a anti-SEMA4D, *por exemplo* um anticorpo ou fragmento de ligação a antígeno, variante ou derivado do mesmo, conforme fornecido neste documento, pode ser conjugada a uma fração terapêutica, como uma citotoxina, um agente terapêutico ou um íon metálico radioativo. Uma citotoxina ou agente citotóxico inclui qualquer agente que seja prejudicial para as células.

[0158] Uma molécula de ligação a anti-SEMA4D, *por exemplo*, um anticorpo ou fragmento de ligação a antígeno, variante ou derivado do mesmo, conforme fornecido neste documento, também pode ser marcada de forma detectável, acoplando-a a um composto quimioluminescente. A presença da molécula de ligação a anti-SEMA4D com marcação quimioluminescente é então determinada por meio da detecção da presença de luminescência que surge durante o curso de uma reação química. Exemplos de compostos particularmente úteis de marcação quimioluminescente são luminol, isoluminol, éster de acridinio teromático, imidazol, sal de acridinio e éster oxalato.

[0159] Uma das maneiras pelas quais uma molécula de ligação a anti-SEMA4D, *por exemplo*, um anticorpo ou fragmento de ligação a antígeno, variante ou derivado do mesmo, como fornecido neste documento pode ser detectável, pode ser marcada de forma detectável, ligando a uma enzima e usando a ligação produto num imunoensaio enzimático (EIA) (Voller, A., "The Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)" Publicação Trimestral da Microbiological Associates, Walkersville, Md.; Diagnostic Horizons 2:1-7 (1978); Voller *et al.*, *J. Clin. Pathol.* 57:507-520 (1978); Butler, *Meth. Enzymol.* 75:482-523 (1981); Maggio, ed. (1980) Enzyme Immunoassay, CRC Press, Boca Raton, Fla.; Ishikawa *et al.*, eds. (1981) Enzyme Immunoassay (Kgaku Shoin, Tokyo). A enzima, que está ligada à molécula de ligação a anti-SEMA4D, reagirá com um substrato apropriado, *por exemplo*, um substrato cromogênico, de maneira a produzir uma fração química que pode ser detectada, por

exemplo, por espectrofotometria, fluorimetria ou por meios visuais. Enzimas que podem ser usadas para marcar o anticorpo de forma detectável incluem, mas não estão limitadas a, malato desidrogenase, nuclease estafilocócicas, delta-5-esteroide isomerase, álcool de levedura desidrogenase, alfa-glicerofosfato, desidrogenase, fosfato triose isomerase, peroxidase de raiz forte, fosfatase alcalina, asparaginase, glicose oxidase, beta-galactosidase, ribonuclease, urease, catalase, glicose-6-fosfato desidrogenase, glicoamilase, e acetilcolinesterase. Além disso, a detecção pode ser realizada por métodos colorimétricos que empregam um substrato cromogênico para a enzima. A detecção também pode ser realizada por meio de comparação visual da extensão da reação enzimática de um substrato em comparação com os padrões similares de preparação.

[0160] A detecção também pode ser feita usando qualquer um dentre uma variedade de outros imunoensaios. Por exemplo, marcando radioativamente a molécula de ligação a anti-SEMA4D, é possível detectar a molécula de ligação através do uso de um radioimunoensaio (RIA). O isótopo radioativo pode ser detectado por meio de, incluindo, mas não limitado a um contador gama, um contador de cintilação, ou autoradiografia.

[0161] Uma molécula de ligação a anti-SEMA4D, *por exemplo*, anticorpo ou fragmento de ligação a antígeno, variante ou derivado do mesmo, conforme fornecido neste documento, também pode ser marcada de forma detectável usando metais emissores de fluorescência, como  $^{152}\text{Eu}$ , ou outros da série de lantanídeos. Esses metais podem ser ligados à molécula de ligação usando tais grupos de quelação de metal, tais como ácido dietilenotriaminepentacético (DTPA) ou ácido etilenodiaminotetracético (EDTA).

[0162] As técnicas para conjugar várias frações a uma molécula de ligação a anti-SEMA4D, como fornecido neste documento, são bem conhecidas pelos versados na técnica.

### Expressão de Polipeptídeos de Anticorpo

[0163] Sequências de DNA que codificam as cadeias leve e pesada de uma molécula de ligação a anti-SEMA4D, *por exemplo*, um anticorpo ou fragmento de ligação a antígeno, variante ou derivado do mesmo, conforme fornecido neste documento, podem ser feitas, simultaneamente ou separadamente, usando transcriptase reversa e DNA polimerase de acordo com métodos bem conhecidos. A PCR pode ser iniciada por primers consenso de região constante ou primers mais específicos baseados no DNA da cadeia pesada e leve e nas sequências de aminoácidos publicadas. Conforme discutido acima, a PCR também pode ser usada para isolar os clones de DNA que codificam as cadeias leve e pesada do anticorpo. Neste caso, as bibliotecas podem ser triadas por primers de consenso ou sondas homólogas maiores, tais como sondas da região constante humana.

[0164] O DNA, tipicamente o DNA de plasmídeo, pode ser isolado das células usando técnicas conhecidas na técnica, mapeamento de restrição e sequenciamento de acordo com as técnicas padrão bem conhecidas estabelecidas em detalhes, *por exemplo*, nas referências relacionadas às técnicas de DNA recombinante fornecidas em outras partes deste documento.

[0165] Após a manipulação do material genético isolado para fornecer uma molécula de ligação a anti-SEMA4D, *por exemplo*, um anticorpo ou fragmento de ligação a antígeno, variante ou derivado do mesmo, conforme fornecido neste documento, os polinucleotídeos que codificam a molécula de ligação podem ser inseridos em uma expressão vetor para introdução em uma ou mais células hospedeiras que podem ser usadas para produzir a quantidade desejada de molécula de ligação a anti-SEMA4D.

[0166] A expressão recombinante de um anticorpo anti-SEMA4D, ou fragmento, derivado ou análogo dele, *por exemplo*, uma cadeia pesada ou leve de um anticorpo, requer a construção de um ou mais vetores de expressão contendo um

polinucleotídeo ou combinação de polinucleotídeos que codifica o anticorpo. Uma vez que um polinucleotídeo ou combinação de polinucleotídeos que codifica a molécula de anticorpo ou cadeia pesada ou leve de um anticorpo, ou uma porção do mesmo (*por exemplo*, contendo o domínio variável da cadeia pesada ou leve), da invenção foi obtido, o vetor para a produção da molécula de anticorpo pode ser produzido pela tecnologia do DNA recombinante, usando as práticas bem conhecidas na técnica. Assim, métodos para preparar uma proteína expressando um polinucleotídeo ou combinação de polinucleotídeos contendo as sequências de ácido nucleico que codificam o anticorpo são descritos neste documento. Os métodos que são bem conhecidos por aqueles versados na técnica podem ser usados para construir os vetores de expressão contendo as sequências codificadoras de anticorpo e sinais de controle transcricionais e traducionais apropriados. Esses métodos incluem, por exemplo, técnicas de DNA recombinante *in vitro*, técnicas sintéticas e recombinação genética *in vivo*. Esta divulgação, portanto, fornece vetores replicáveis que compreendem sequências de ácidos nucleicos que codificam uma molécula de ligação a anti-SEMA4D, *por exemplo*, um anticorpo como fornecido neste documento ou uma cadeia pesada ou leve, ou uma região variável da cadeia pesada ou leve, operacionalmente ligada a um promotor. Tais vetores podem incluir a sequência nucleotídica que codifica uma região constante da cadeia pesada e/ou leve do anticorpo (ver, *por exemplo*, Publicação PCT WO 86/05807; Publicação PCT WO 89/01036; e Pat. a Pat. Nº 5.122.464) e o domínio variável do anticorpo pode ser clonado nesse vetor para a expressão da cadeia pesada ou leve inteira.

[0167] O termo "vetor" ou "vetor de expressão" é usado neste documento para significar vetores usados de acordo com esta divulgação como um veículo para introduzir e expressar um gene desejado em uma célula hospedeira. Como é do conhecimento dos versados na técnica, esses vetores podem ser facilmente selecionados dentre, *por exemplo*, plasmídeos, fagos e vírus, *por exemplo*, retrovírus.

Em geral, os vetores compatíveis com essa divulgação irão compreender um marcador de seleção, sítios de restrição apropriados para facilitar a clonagem do gene desejado e a capacidade de entrar e/ou replicar em células eucarióticas ou procarióticas.

[0168] Numerosos sistemas de vetores de expressão podem ser empregados. Por exemplo, uma classe de vetor utiliza elementos de DNA que são derivados de vírus de animais, como o vírus do papiloma bovino, vírus polioma, adenovírus, vírus vaccinia, baculovírus, retrovírus (RSV, MMTV ou MOMLV) ou vírus SV40. Outros envolvem o uso de sistemas policistrônicos com sítios de ligação interna do ribossomo (IRES). Adicionalmente, as células que integraram o DNA em seus cromossomos podem ser selecionadas, introduzindo um ou mais marcadores que permitem a seleção de células transfetadas. O marcador pode fornecer prototrofia para um hospedeiro auxotrófico, resistência à biocida (*por exemplo*, antibióticos) ou resistência a metais pesados, como o cobre. O gene marcador selecionável também pode ser ligado diretamente às sequências de DNA a serem expressas, ou introduzido a célula por cotransformação nela. Elementos adicionais também podem ser necessários para a síntese ideal do mRNA. Esses elementos podem incluir sequências sinais, sinais de splice, bem como promotores transcricionais, potenciadores e sinais de terminação.

[0169] Em certos aspectos, as moléculas de ácido nucleico da região variável clonada podem ser inseridas em um vetor de expressão juntamente com os genes da região constante da cadeia pesada e leve sintetizados como discutido acima. Certamente, qualquer vetor de expressão que seja capaz de induzir expressão em células eucarióticas pode ser usado. Os exemplos de vetores adequados incluem, mas não estão limitados a plasmídeos pcDNA3, pHCMV/Zeo, pCR3.1, pEF 1/His, pIND/GS, pRc/HCMV2, pSV40/Zeo2, pTRACER-HCMV, pUB6/V5-His, pVAXI, e pZeoSV2 (disponíveis pela Invitrogen, San Diego, Calif.) e ao plasmídeo pCI (disponível pela Promega, Madison, Wis.). Em geral, a triagem de grandes números

de células transformadas para aqueles que expressam adequadamente altos níveis das cadeias pesada e leve de imunoglobulina é a experimentação de rotina que pode ser realizada, por exemplo, por sistemas robóticos.

[0170] Mais geralmente, uma vez que o vetor ou sequência de DNA que codifica uma subunidade monomérica de uma molécula de ligação a anti-SEMA4D, *por exemplo*, um anticorpo ou fragmento de ligação a antígeno, variante ou derivado dele, conforme fornecido neste documento, foi preparado, o vetor de expressão pode ser introduzido em uma célula hospedeira apropriada. A introdução do plasmídeo na célula hospedeira pode ser realizada por várias técnicas bem conhecidas para aqueles versados na técnica. Elas incluem, sem limitação, transfecção (incluindo o uso de electroforese e eletroporação), fusão de protoplasto, precipitação de fosfato de cálcio, fusão celular com DNA envelopado, microinjeção e infecção com vírus intacto. Ver Ridgway (1988) "Mammalian Expression Vectors" em Vectors, ed. Rodriguez e Denhardt (Butterworths, Boston, Massachusetts), Capítulo 24.2, pp. 470-472. Em geral, a introdução do plasmídeo no hospedeiro se dá via eletroporação. As células hospedeiras que abrigam o construto de expressão podem ser cultivadas em condições apropriadas para a produção das cadeias leves e das cadeias pesadas e analisadas para a síntese de proteínas da cadeia pesada e/ou leve e conjunto. As técnicas de ensaio exemplificativas incluem o ensaio imunoabsorvente ligado a enzima (ELISA), radioimunoensaio (RIA) ou análise de separador de células ativado por fluorescência (FACS), imuno-histoquímica e similares.

[0171] Um vetor de expressão pode ser transferido para uma célula hospedeira por técnicas convencionais, e as células transfectadas podem ser cultivadas por técnicas convencionais para produzir uma molécula de ligação a anti-SEMA4D, *por exemplo*, um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno, variante ou derivado do mesmo como fornecido neste documento. Assim, esta divulgação inclui células hospedeiras contendo um polinucleotídeo ou combinação de

polinucleotídeos que codificam um anticorpo como fornecido neste documento, ou uma cadeia pesada ou leve do mesmo, operacionalmente ligada a um promotor, *por exemplo*, um promotor heterólogo. Em certas modalidades, para a expressão de anticorpos de cadeia dupla, os vetores que codificam ambas as cadeias pesada e leve, podem ser coexpressos na célula hospedeira para expressão e montagem de toda a molécula de ligação, como detalhado abaixo.

[0172] Conforme usado neste documento, "células hospedeiras" refere-se às células que abrigam os vetores construídos usando técnicas de DNA recombinante e que codificam pelo menos um polinucleotídeo heterólogo. Nas descrições dos processos de isolamento de anticorpos a partir de hospedeiros recombinantes, os termos "célula" e "cultura de célula" são usados de forma permutável para denotar a fonte de anticorpo, a menos que seja claramente especificado o contrário. Em outras palavras, a recuperação do polipeptídeo das "células" pode significar tanto a partir das células inteiras centrifugadas, quanto a partir da cultura de células contendo o meio e as células suspensas.

[0173] Uma variedade de sistemas de vetor de expressão de hospedeiro pode ser utilizada para expressar uma molécula de ligação a anti-SEMA4D, *por exemplo*, um anticorpo ou fragmento de ligação a antígeno, variante ou derivado do mesmo, conforme fornecido neste documento. Tais sistemas de expressão no hospedeiro representam veículos pelos quais as sequências codificadoras de interesse podem ser produzidas e subsequentemente purificadas, mas também representam células que podem, quando transformadas ou transfetadas com as sequências nucleotídicas codificadoras apropriadas, expressam uma molécula do anticorpo descrita neste documento *in situ*. Estes incluem, mas não estão limitados a micro-organismos, tais como bactérias (*por exemplo*, *E. coli*, *B. subtilis*) transformadas com DNA de bacteriófago recombinante, DNA de plasmídeo ou vetores de expressão de DNA de cosmídeo contendo sequências codificadoras de anticorpo; levedura (*por exemplo*,

*Saccharomyces, Pichia*) transformada com vetores de expressão recombinante de levedura contendo sequências codificadoras de anticorpos; sistemas de células de inseto infectadas com vetores de expressão recombinante de vírus (*por exemplo*, baculovírus) contendo sequências codificadoras de anticorpo; sistemas de células vegetais infectadas com vetores de expressão recombinante de vírus (*por exemplo*, vírus do mosaico da couve-flor, CaMV; vírus do mosaico do tabaco, TMV) ou transformadas com vetores de expressão recombinantes de plasmídeo (*por exemplo*, plasmídeo Ti) contendo sequências codificadoras de anticorpos; ou sistemas de células de mamíferos (*por exemplo*, células COS, CHO, NSO, BLK, 293, 3T3) que abrigam construtos de expressão recombinantes contendo promotores derivados do genoma das células de mamíferos (*por exemplo*, promotor de metalotioneína) ou de vírus de mamíferos (*por exemplo*, o promotor tardio do adenovírus; o promotor do vírus vaccinia 7,5 K ou o promotor de citomegalovírus humano imediato anterior). Em certos aspectos, células bacterianas como *Escherichia coli*, ou células eucarióticas, especialmente para a expressão de moléculas de anticorpo recombinantes completas, podem ser usadas para a expressão de uma molécula de anticorpo recombinante. Por exemplo, células de mamíferos, como células de ovário de hamster chinês (CHO), em conjunto com um vetor, são um sistema de expressão eficaz para anticorpos (Foecking *et al.*, *Gene* 45:101 (1986); Cockett *et al.*, *Bio/Technology* 8:2 (1990)).

[0174] A linhagem de células hospedeiras usada para expressão de proteínas pode ser de origem mamífera. As linhagens celulares hospedeiras exemplificativas incluem, mas não estão limitadas a, CHO (ovário de hamster chinês), DG44 e DUXB11 (linhagens de Ovário de Hamster Chinês, DHFR menos), HeLa (carcinoma cervical humano), CVI (linhagem de rim de macaco), COS (um derivado de CVI com antígeno T SV40), VERY, BHK (rim de filhote de hamster), MDCK, 293, W38, R1610 (fibroblastos de hamster chinês), BALBC/3T3 (fibroblastos de camundongo), HAK (linha de rim de hamster), SP2/O (mieloma de camundongo), P3 vezes.63-Ag3.653

(mieloma de camundongo), BFA-1c1BPT (células endoteliais bovinas), RAJI (linfócito humano) e 293 (rim humano). As linhagens de células hospedeiras estão normalmente disponíveis pelos serviços comerciais, pela American Tissue Culture Collection ou pela literatura publicada.

[0175] Além disso, uma cepa de célula hospedeira pode ser escolhida, a qual modula a expressão das sequências inseridas, ou modifica e processa o produto do gene da forma específica desejada. Tais modificações (*por exemplo*, glicosilação) e o processamento (*por exemplo*, clivagem) dos produtos de proteína podem ser importantes para a função da proteína. Células hospedeiras diferentes têm características e mecanismos específicos para o processamento pós-tradução e modificação de proteínas e produtos de genes. As linhagens celulares apropriadas ou sistemas de hospedeiro podem ser escolhidos para garantir a modificação e o processamento corretos da proteína estrangeira expressa. Para este fim, podem ser usadas células hospedeiras eucarióticas que possuem a maquinaria celular para o processamento apropriado do transcrito primário, glicosilação e fosforilação do produto do gene.

[0176] Para a produção a longo prazo e de alto rendimento de proteínas recombinantes, pode ser utilizada expressão estável. Por exemplo, as linhagens celulares que expressam de forma estável a molécula de anticorpo podem ser projetadas. Ao invés de usar vetores de expressão que contêm origens virais de replicação, as células hospedeiras podem ser transformadas com o DNA controlado por elementos de controle de expressão apropriados (*por exemplo*, promotor, potenciador, sequências, terminadores de transcrição, sítios de poliadenilação, etc) e um marcador selecionável. Seguindo a introdução do DNA estrangeiro, as células projetadas podem ser cultivadas, por exemplo, por 1-2 dias em meios enriquecidos e, então, são trocadas para meios seletivos. O marcador selecionável no plasmídeo recombinante confere resistência à seleção e permite que as células integrem o

plasmídeo de forma estável em seus cromossomos e cresçam para formar focos que, por sua vez, podem ser clonados e expandidos em linhagens celulares. Este método pode ser usado vantajosamente para projetar linhagens celulares que expressam de forma estável a molécula de anticorpo.

[0177] Os níveis de expressão de uma molécula de anticorpo podem ser aumentados pela amplificação do vetor (para uma revisão, consulte Bebbington e Hentschel (1987) "The Use of Vectors Based on Gene Amplification for the Expression of Cloned Genes in Mammalian Cells in DNA Cloning" (Academic Press, NY) Vol. 3. Quando um marcador no sistema de vetor expressando anticorpo é ampliável, um aumento do nível do inibidor presente na cultura da célula hospedeira irá aumentar o número de cópias do gene marcador. Uma vez que a região amplificada está associada ao gene do anticorpo, a produção do anticorpo também aumentará (Crouse *et al.*, *Mol. Cell. Biol.* 3:251 (1983)).

[0178] A produção *in vitro* permite aumentar proporcionalmente para gerar grandes quantidades dos polipeptídeos desejados. As técnicas para o cultivo de células de mamíferos em condições de cultura de tecidos são conhecidas na técnica e incluem cultura de suspensão homogênea, *por exemplo*, em um reator de transporte aéreo ou em um reator de agitador contínuo, ou cultura de célula imobilizada ou aprisionada, *por exemplo*, em fibras oca, microcápsulas, em microgrânulos de agarose ou cartuchos de cerâmica. Se necessário e/ou desejado, as soluções de polipeptídeos podem ser purificadas pelos métodos de cromatografia habituais, por exemplo, filtração de gel, cromatografia de troca iônica, cromatografia sobre celulose DEAE ou cromatografia de (imuno)afinidade, *por exemplo*, após a biossíntese de um polipeptídeo de região de dobradiça sintético ou antes ou subsequente à etapa de cromatografia HIC descrita neste documento.

[0179] Moléculas de ácido nucleico que codificam uma molécula de ligação a anti-SEMA4D, *por exemplo*, um anticorpo ou fragmento de ligação a antígeno,

variante ou derivado, conforme aqui fornecidas, também podem ser expressas em células não de mamíferos, como insetos, bactérias ou leveduras ou plantas células. As bactérias que absorvem prontamente os ácidos nucleicos incluem membros das enterobactérias, como cepas de *Escherichia coli* ou *Salmonella*, e bacillaceae, tais como *Bacillus subtilis*, *Pneumococcus*, *Streptococcus*, e *Haemophilus influenzae*. Será apreciado ainda que, quando expressos em bactérias, os polipeptídeos heterólogos normalmente se tornam parte dos corpos de inclusão. Os corpos de inclusão podem ser isolados, purificados e depois montados em moléculas funcionais. Onde são desejadas formas tetravalentes de anticorpos, as subunidades podem então se automontar em anticorpos tetravalentes (WO 02/096948A2).

[0180] Em sistemas bacterianos, um número de vetores de expressão pode ser vantajosamente selecionado, dependendo do uso pretendido para a molécula de anticorpo sendo expressa. Por exemplo, quando uma grande quantidade dessa proteína deve ser produzida, para a geração de composições farmacêuticas de uma molécula de anticorpo, vetores que direcionam a expressão de altos níveis de produtos de proteína de fusão que são prontamente purificadas podem ser desejáveis.

[0181] Além dos procarióticos, os micróbios eucarióticos também podem ser usados. O *Saccharomyces cerevisiae*, ou a levedura de padeiro comum, é o mais usado entre os micro-organismos eucarióticos embora uma série de outras cepas sejam comumente disponíveis *por exemplo*, *Pichia pastoris*.

[0182] Em um sistema de inseto, o vírus da poliedrose nuclear (AcNPV) de *Autographa californica* é usado como um vetor para expressar genes estrangeiros. O vírus cresce nas células de *Spodoptera frugiperda*. A sequência codificadora de anticorpo pode ser clonada individualmente em regiões não essenciais (por exemplo, o gene da poliedrina) do vírus e colocada sob controle de um promotor de AcNPV (por exemplo, o promotor da poliedrina).

[0183] Uma vez que uma molécula de ligação a anti-SEMA4D , *por exemplo*,

um anticorpo ou fragmento de ligação a antígeno, variante ou derivado, conforme fornecido neste documento tenha sido recombinantemente expressa, ela pode ser purificada por qualquer método conhecido na técnica para purificação de uma molécula de imunoglobulina, por exemplo, por cromatografia (*por exemplo*, troca iônica, afinidade, particularmente por afinidade pela proteína A e cromatografia em coluna de dimensionamento), centrifugação, solubilidade diferencial ou por qualquer outra técnica padrão para a purificação de proteínas. Alternativamente, os métodos para aumentar a afinidade de anticorpos como fornecidos neste documento são divulgados na Publicação de Pedido de Patente US Nº 2002 0123057 A1.

#### Métodos de Tratamento Usando Anticorpos Anti-SEMA4D Terapêuticos

[0184] Esta divulgação fornece métodos para o uso de uma molécula de ligação a anti-SEMA4D, *por exemplo*, um anticorpo ou fragmento de ligação a antígeno, variante ou derivado, como fornecido neste documento, para tratar sujeitos com uma doença ou distúrbio associado à patologia de SEMA4D.

[0185] A discussão a seguir refere-se a métodos de diagnóstico e tratamento de várias doenças e distúrbios com uma molécula de ligação anti-SEMA4D, *por exemplo*, um anticorpo ou fragmento de ligação a antígeno, variante ou derivado, como fornecido neste documento, *por exemplo*, capaz de se ligar especificamente a SEMA4D, *por exemplo*, SEMA4D humano, de camundongo ou humano e de camundongo, e tendo atividade neutralizante de SEMA4D.

[0186] Em um aspecto, a divulgação fornece um método para neutralizar SEMA4D em um sujeito humano, compreendendo administrar ao sujeito humano uma molécula de ligação anti-SEMA4D, *por exemplo*, um anticorpo ou fragmento, variante ou derivado de ligação a antígeno, conforme fornecido neste documento. Em certos aspectos, o sujeito humano precisa de tratamento para uma doença ou distúrbio autoimune, uma doença ou distúrbio inflamatório, câncer, uma doença ou distúrbio neuroinflamatório, uma doença ou distúrbio neurodegenerativo ou qualquer

combinação destes. Em certos aspectos, a doença ou distúrbio neuroinflamatório é esclerose múltipla. Em certos aspectos, a doença ou distúrbio neurodegenerativo é acidente vascular cerebral, doença de Alzheimer, doença de Parkinson, doença de Huntington, síndrome de Down, ataxia, esclerose lateral amiotrófica (ELA), demência frontotemporal (DFT), comprometimento cognitivo relacionado ao HIV, lúpus do SNC, comprometimento cognitivo leve ou uma combinação deles. Em certos aspectos, a doença autoimune ou inflamatória é artrite, *por exemplo, artrite reumatoide, aterosclerose (ver, por exemplo, Publicação PCT No. WO 2015/054628, que é aqui incorporado por referência na sua totalidade) ou doenças osteodegenerativas, como osteoporose (ver, por exemplo, Patente US Nº 9.447.191, que é incorporada neste documento por referência na sua totalidade).*

[0187] Em um aspecto, o tratamento inclui a aplicação ou administração de uma molécula de ligação a anti-SEMA4D, *por exemplo, um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno, variante ou derivado, conforme fornecido neste documento a um sujeito, ou aplicação ou administração a um tecido isolado ou linhagem celular de um sujeito, em que o sujeito tem uma doença, um sintoma de uma doença ou uma predisposição para uma doença. Em outro aspecto, o tratamento também inclui a aplicação ou administração de uma composição farmacêutica compreendendo uma molécula de ligação anti-SEMA4D, *por exemplo, um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno, variante ou derivado dele, conforme fornecido neste documento a um sujeito ou a um tecido isolado ou linhagem celular de um paciente com doença, sintoma de doença ou predisposição para uma doença.**

[0188] Em um aspecto, uma molécula de ligação a anti-SEMA4D, *por exemplo, um anticorpo ou fragmento de ligação a antígeno, variante ou derivado, conforme fornecido neste documento pode ser útil para o tratamento de câncer, *por exemplo, tratamento de vários tumores malignos e não malignos. Por "atividade antitumoral" entende-se uma redução na taxa de proliferação ou acumulação de**

células malignas e, portanto, um declínio na taxa de crescimento de um tumor existente ou de um tumor que surge durante a terapia e/ou destruição de células neoplásicas (tumorais) existentes ou células neoplásicas recém-formadas e, portanto, uma diminuição no tamanho total de um tumor durante a terapia. Por exemplo, a terapia com uma molécula de ligação a anti-SEMA4D, *por exemplo*, um anticorpo ou fragmento de ligação a antígeno, variante ou derivado, conforme fornecido neste documento pode provocar uma resposta fisiológica, por exemplo, uma redução na angiogênese ou migração de CTL para o tumor microambiente. Os métodos para tratar o câncer com uma molécula de ligação a anti-SEMA4D, *por exemplo*, um anticorpo ou fragmento de ligação a antígeno, variante ou derivado, conforme fornecido neste documento, podem ser encontrados, *por exemplo*, na publicação PCT Nº WO 2014/209802 [imunoterapia combinada], que é incorporada neste documento por referência na sua totalidade.

[0189] Em um aspecto, a divulgação fornece uma molécula de ligação ao anti-SEMA4D, *por exemplo*, um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno, variante ou derivado dele, conforme fornecido neste documento para uso como medicamento, em particular para uso no tratamento ou profilaxia de câncer ou para uso em uma condição ou lesão pré-cancerosa.

[0190] Em outro aspecto, uma molécula de ligação a anti-SEMA4D, *por exemplo*, um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno, variante ou derivado dele, conforme fornecido neste documento, pode ser útil para o tratamento de uma doença autoimune ou doença inflamatória. Em outro aspecto, uma molécula de ligação a anti-SEMA4D, *por exemplo*, um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno, variante ou derivado dele, conforme fornecido neste documento, pode ser útil para o tratamento de uma doença neuroinflamatória ou neurodegenerativa. Os métodos para o tratamento de doenças neuroinflamatórias ou neurodegenerativas podem ser encontrados, *por exemplo*, na publicação PCT Nº WO 2013/055922 [BBB],

publicação PCT Nº WO 2015/061330 [HD] e publicação PCT Nº WO 2013/170221 [neurogênese/acidente vascular cerebral], cujo conteúdo é incorporado por referência neste documento na sua totalidade.

[0191] De acordo com os métodos fornecidos neste documento, uma molécula de ligação anti-SEMA4D, *por exemplo*, um anticorpo ou fragmento de ligação a antígeno, variante ou derivado dele, conforme fornecido neste documento, pode ser usada para promover uma resposta terapêutica positiva em relação a um agente maligno célula humana. Por "resposta terapêutica positiva" em relação ao tratamento do câncer, entende-se uma melhora na doença em associação com a atividade antitumoral dessas moléculas de ligação, *por exemplo*, anticorpos ou fragmentos deles, e/ou uma melhora nos sintomas associados à doença. Ou seja, um efeito antiproliferativo, a prevenção de outras consequências tumorais, uma redução no tamanho do tumor, uma diminuição na vasculatura do tumor, uma redução no número de células cancerígenas e/ou uma diminuição em um ou mais sintomas associados à doença pode ser observada. Assim, por exemplo, uma melhoria na doença pode ser **CARACTERIZADA** como uma resposta completa. Por "resposta completa" entende-se uma ausência de doença clinicamente detectável com normalização de quaisquer estudos radiográficos anormais anteriormente, medula óssea e líquido cefalorraquidiano (LCR). Alternativamente, uma melhoria da doença pode ser categorizada como uma resposta parcial. Por "resposta parcial" entenda-se uma redução de pelo menos cerca de 50% em toda a carga mensurável do tumor (*isto* é, o número de células tumorais presentes no sujeito) na ausência de novas lesões e persistindo por pelo menos um mês. Essa resposta é aplicável apenas a tumores mensuráveis.

[0192] Uma molécula de ligação a anti-SEMA4D, *por exemplo*, um anticorpo ou fragmento de ligação a antígeno, variante ou derivado dele, conforme fornecido neste documento, também pode ser útil no tratamento de doenças inflamatórias e

deficiências ou distúrbios do sistema imunológico. As doenças inflamatórias são **CARACTERIZADAS** por inflamação e destruição de tecidos, ou uma combinação deles. Por "atividade anti-inflamatória" entende-se uma redução ou prevenção de inflamação. "Doença inflamatória" inclui qualquer processo imunomediado inflamatório em que o evento ou alvo inicial da resposta imune envolva não antígeno(s), incluindo, por exemplo, aloantígenos, xenoantígenos, antígenos virais, antígenos bacterianos, antígenos desconhecidos ou alérgenos. Numa modalidade, a doença inflamatória é um distúrbio inflamatório do sistema nervoso periférico ou central. Noutra modalidade, a doença inflamatória é um distúrbio inflamatório das articulações.

[0193] Além disso, o termo "doença(s) inflamatória(s)" inclui "doença(s) autoimune(s)". Como aqui utilizado, o termo "autoimunidade" é geralmente entendido como englobando processos mediadores da imunidade inflamatória envolvendo antígenos "self". Nas doenças autoimunes, o(s) autoantígeno(s) desencadeia(m) respostas imunes do hospedeiro. Uma doença autoimune pode resultar de uma resposta imune inadequada dirigida contra um autoantígeno (um autoantígeno), que é um desvio do estado normal de autotolerância. Em geral, os anticorpos (particularmente, mas não exclusivamente, os anticorpos IgG), atuando como moléculas citotóxicas ou como complexos imunológicos, são os principais mediadores de várias doenças autoimunes, muitas das quais podem ser debilitantes ou com risco de vida.

[0194] Em uma modalidade, uma molécula de ligação ao anti-SEMA4D, *por exemplo*, um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno, variante ou derivado dele, conforme fornecido neste documento, pode ser usada para tratar a esclerose múltipla (MS). A EM, também conhecida como esclerose disseminada ou encefalomielite disseminada, é uma condição autoimune na qual o sistema imunológico ataca o sistema nervoso central, levando à desmielinização. O nome

esclerose múltipla refere-se às cicatrizes (escleroses, também conhecidas como placas ou lesões) que se formam no sistema nervoso. As lesões de EM geralmente envolvem áreas de substância branca próximas aos ventrículos do cerebelo, tronco encefálico, gânglios da base e medula espinhal e nervo óptico. A EM resulta na destruição de oligodendrócitos, as células responsáveis pela criação e manutenção da bainha de mielina. A EM resulta em um desbaste ou perda completa de mielina e, à medida que a doença avança, transecção de axônios.

[0195] Os sintomas neurológicos podem variar com a EM, e a doença geralmente progride para incapacidade física e cognitiva. A EM assume várias formas, com novos sintomas ocorrendo em ataques discretos (formas recorrentes) ou acumulando-se lentamente ao longo do tempo (formas progressivas). Entre os ataques, os sintomas podem desaparecer completamente, mas geralmente resulta em dano neurológico permanente, especialmente à medida que a doença avança.

[0196] A neutralização de SEMA4D usando uma molécula de ligação anti-SEMA4D, *por exemplo*, um anticorpo ou fragmento de ligação a antígeno, variante ou derivado dele, conforme fornecido neste documento, pode ser usada para reduzir a severidade da EM por vários mecanismos diferentes, *por exemplo*, anticorpos monoclonais anti-SEMA4D podem bloquear a maturação imune e a ativação do SEMA4D para reduzir a taxa de recaída, reduzindo as respostas imunes secundárias aos antígenos do SNC, e os anticorpos monoclonais anti-SEMA4D podem bloquear o efeito do SEMA4D solúvel na mediação da apoptose de oligodendrócitos no SNC, pode reduzir a severidade da doença, reduzindo a desmielinização.

[0197] Em um aspecto, uma molécula de ligação a anti-SEMA4D, *por exemplo*, um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno, variante ou derivado dele, conforme fornecido neste documento, pode ser usada para tratar a artrite. A artrite é uma doença inflamatória das articulações, que pode ser causada por uma condição autoimune na qual o sistema imunológico ataca as articulações. Em certas

modalidades, a artrite é selecionada do grupo que consiste em osteoartrite, artrite gotosa, espondilite anquilosante, artrite psoriática, artrite reativa, artrite reumatoide, artrite reumatoide de início juvenil, artrite infecciosa, artrite inflamatória, artrite séptica, artrite degenerativa e artrite de Lyme. Numa modalidade, a artrite é artrite reumatoide (AR).

[0198] Esta divulgação inclui métodos de tratamento ou prevenção de artrite, administrando a um sujeito uma molécula de ligação a anti-SEMA4D, conforme fornecido neste documento. Os métodos como fornecidos neste documento podem reduzir a dor, inchaço ou rigidez associados à artrite, *por exemplo*, artrite reumatoide. Esta divulgação também é direcionada a métodos para melhorar o desempenho, função e saúde das articulações. Em algumas modalidades desta divulgação, o tratamento resulta em uma diminuição nos escores de gravidade da artrite, uma diminuição na gravidade/área da artrite sob a curva, uma diminuição nos parâmetros histopatológicos associados à artrite (inflamação, pannus, dano da cartilagem e dano ósseo), uma diminuição nos níveis séricos de ácido araquidônico ou diminuição dos anticorpos anticolágeno. Em certas modalidades, os resultados clínicos benéficos ou desejados incluem, mas não estão limitados a, alívio dos sintomas associados à artrite; prevenção de artrite; atraso no início da artrite; incidência reduzida de artrite em uma população; diminuição da extensão da condição associada à artrite; estabilização (*por exemplo*, não piora) do estado da condição, distúrbio ou doença associada à artrite; atraso no início ou lentidão da condição, distúrbio ou progressão da doença associada à artrite; melhoria da condição, distúrbio ou estado da doença, remissão (parcial ou total) da condição, distúrbio ou doença associada à artrite, detectável ou indetectável; ou aprimoramento ou melhoria da condição, distúrbio ou doença associada à artrite.

[0199] Os métodos fornecidos neste documento podem ser usados para tratar indivíduos com artrite ou indivíduos com risco de desenvolver artrite. Assim, em

algumas modalidades, esta divulgação fornece um método de tratamento de um sujeito com articulações normais, articulações artríticas limítrofes ou articulações muito artríticas, o método compreendendo a administração de uma molécula de ligação anti-SEMA4D, conforme fornecida neste documento, a um sujeito, como descrito neste documento. Em algumas modalidades, os métodos fornecidos neste documento podem ser usados para tratar a artrite crônica pelo restante da vida do sujeito.

[0200] De acordo com os métodos fornecidos neste documento, uma molécula de ligação anti-SEMA4D, *por exemplo*, um anticorpo ou fragmento de ligação a antígeno, variante ou derivado dele, conforme fornecido neste documento, pode ser usada para promover uma resposta terapêutica positiva em relação a tratamento ou prevenção de uma doença autoimune e/ou doença inflamatória. Por "resposta terapêutica positiva" em relação a uma doença autoimune e/ou doença inflamatória, entende-se uma melhora na doença em associação com a atividade anti-inflamatória, atividade antiangiogênica, atividade antapoptótica ou similar desses anticorpos e/ou uma melhora nos sintomas associados à doença. Ou seja, um efeito antiproliferativo, a prevenção de uma proliferação adicional de células que expressam SEMA4D, uma redução na resposta inflamatória incluindo, entre outros, a secreção reduzida de citocinas inflamatórias, moléculas de adesão, proteases, imunoglobulinas (nos casos em que o SEMA4D contém célula é uma célula B), combinações delas, e similares, aumento da produção de proteínas anti-inflamatórias, redução no número de células autorreativas, aumento da tolerância imunológica, inibição da sobrevivência autorreativa das células, redução da apoptose, redução do endotélio, pode ser observada migração celular, aumento da migração espontânea de monócitos, redução e/ou diminuição de um ou mais sintomas mediados pela estimulação de células que expressam sSEMA4D ou SEMA4D. Tais respostas terapêuticas positivas não se limitam à via de administração e podem compreender a administração ao doador, ao

tecido doador (como por exemplo, perfusão de órgãos), ao hospedeiro, qualquer combinação deles, e similares.

[0201] A resposta clínica pode ser avaliada usando técnicas de triagem, como ressonância magnética (RM), imagem radiográfica x, tomografia computadorizada (TC), citometria de fluxo ou análise por classificador de células ativadas por fluorescência (FACS), histologia, patologia macroscópica e química do sangue, incluindo, entre outros, alterações detectáveis por ELISA, RIA, cromatografia e similares. Além dessas respostas terapêuticas positivas, o sujeito em terapia com uma molécula de ligação anti-SEMA4D, *por exemplo*, um anticorpo ou fragmento de ligação a antígeno, variante ou derivado, conforme fornecido neste documento, pode experimentar o efeito benéfico de uma melhoria nos sintomas associados com a doença.

[0202] Uma molécula de ligação a anti-SEMA4D, *por exemplo*, um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno, variante ou derivado dele, conforme fornecido neste documento, pode ser usada em combinação com pelo menos uma outra terapia de câncer, incluindo, mas não se limitando a, cirurgia ou procedimentos cirúrgicos; terapia de modulação imune; terapia de radiação; quimioterapia, opcionalmente em combinação com transplante autólogo de medula óssea ou outra terapia contra o câncer; em que a terapia adicional contra o câncer é administrada antes, durante ou após a molécula de ligação a anti-SEMA4D, *por exemplo*, terapia de anticorpo ou seu fragmento de ligação ao antígeno, terapia. Assim, onde as terapias combinadas compreendem a administração de uma molécula de ligação ao anti-SEMA4D, *por exemplo*, um anticorpo ou seu fragmento de ligação ao antígeno, conforme fornecido neste documento em combinação com a administração de outro agente terapêutico, como quimioterapia, terapia de radiação, outra terapia de anticorpo anticâncer, terapia de câncer baseada em pequenas moléculas ou terapia de câncer baseada em vacina/imunoterapia, os métodos fornecidos neste documento abrangem a

coadministração, usando formulações separadas ou uma única formulação farmacêutica ou administração consecutiva em qualquer ordem.

[0203] Uma molécula de ligação a anti-SEMA4D, *por exemplo*, um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno, variante ou derivado dele, conforme fornecido neste documento, pode ser usada em combinação com quaisquer terapias conhecidas para doenças autoimunes e inflamatórias, incluindo qualquer agente ou combinação de agentes que se sabe serem úteis, ou que foram usadas ou estão em uso atualmente, no tratamento de doenças autoimunes e inflamatórias. Assim, onde as terapias combinadas compreendem a administração de uma molécula de ligação anti-SEMA4D em combinação com a administração de outro agente terapêutico, os métodos fornecidos neste documento abrangem a coadministração, utilizando formulações separadas ou uma única formulação farmacêutica e administração consecutiva em qualquer ordem. Em algumas modalidades, os anticorpos anti-SEMA4D descritos autoimune são administrados em combinação com drogas imunossupressoras ou anti-inflamatórias, em que o anticorpo e o(s) agente(s) terapêutico(s) podem ser administrados sequencialmente, em qualquer ordem ou simultaneamente (*ou seja*, simultaneamente ou dentro deles período).

[0204] Em certos aspectos, uma molécula de ligação a anti-SEMA4D, *por exemplo*, um anticorpo ou fragmento de ligação a antígeno, variante ou derivado, conforme fornecido neste documento, pode ser usada sozinha ou em combinação com drogas imunossupressoras para tratar e/ou prevenir a artrite reumatoide. Como discutido acima, a eficácia do tratamento pode ser avaliada usando qualquer meio e inclui, entre outros, a eficácia medida pelas respostas clínicas definidas pelos critérios do American College of Rheumatology, pelos critérios da Liga Europeia Contra o Reumatismo ou por qualquer outro critério. Ver, por exemplo, Felson *et al.*, *Arthritis. Rheum.* 38:121-35 (1995) e van Gestel *et al.*, *Arthritis Rheum.* 39:34-40 (1996).

[0205] Em ainda outros aspectos, uma molécula de ligação a anti-SEMA4D,

*por exemplo*, um anticorpo ou fragmento de ligação a antígeno, variante ou derivado, conforme fornecido neste documento, pode ser usada sozinha ou em combinação com drogas imunossupressoras para tratar e/ou prevenir a esclerose múltipla.

[0206] Um outro aspecto desta divulgação é o uso de uma molécula de ligação a anti-SEMA4D, *por exemplo*, um anticorpo ou fragmento de ligação a antígeno, variante ou derivado, como fornecido neste documento, para monitoramento diagnóstico de níveis de proteína no tecido como parte de um procedimento de teste clínico, *por exemplo*, para determinar a eficácia de um determinado regime de tratamento. Por exemplo, detecção pode ser facilitada pelo acoplamento do anticorpo a uma substância detectável. Exemplos de substâncias detectáveis incluem várias enzimas, grupos prostéticos, materiais fluorescentes, materiais luminescentes, materiais bioluminescentes e materiais radioativos. Exemplos de enzimas adequadas incluem peroxidase de raiz forte, fosfatase alcalina,  $\beta$ -galactosidase, ou acetilcolinesterase; adequados exemplos de complexos de grupos prostéticos incluem streptavidina/biotina e avidina/biotina; exemplos adequados de materiais fluorescentes incluem umbelíferona, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, diclorotriazinilamina fluoresceína, cloreto de dansila ou ficoeritrina; um exemplo de um material luminescente inclui luminol; exemplos de materiais bioluminescentes incluem luciferase, luciferina, e aequorina; e exemplos de material radioativo adequado incluem  $^{125}\text{I}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{35}\text{S}$ , ou  $^3\text{H}$ .

### VIII. Composições Farmacêuticas e Métodos de Administração

[0207] Os métodos de preparação e administração de uma molécula de ligação a anti-SEMA4D, *por exemplo*, um anticorpo ou fragmento de ligação a antígeno, variante ou derivado dele, conforme fornecido neste documento a um sujeito em necessidade, são bem conhecidos ou são prontamente determinados por aqueles versados na técnica. A via de administração da molécula de ligação a anti-SEMA4D pode ser, por exemplo, oral, parentérica, por inalação ou tópica. O termo "parentérica",

tal como usado neste documento, inclui *por exemplo*, administração intravenosa, intra-arterial, intraperitoneal, intramuscular, subcutânea, retal ou vaginal. Embora todas estas formas de administração estejam contempladas pelo escopo desta divulgação, um exemplo de uma forma para administração seria possível para por injeção, particularmente injeção intravenosa ou intra-arterial ou gotas. Normalmente, uma composição farmacêutica apropriada para a injeção pode incluir um tampão (*por exemplo*, tampão de acetato, fosfato ou citrato), um surfactante (*por exemplo*, polissorbato), opcionalmente um agente estabilizador (*por exemplo*, albumina humana), etc. No entanto, em outros métodos compatíveis com os ensinamentos deste documento, uma molécula de ligação a anti-SEMA4D, *por exemplo*, um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno, variante ou derivado dele, conforme fornecido neste documento, pode ser distribuída diretamente no sítio da condição adversa, *por exemplo*, um tumor sólido, aumentando assim a exposição do tecido doente ao agente terapêutico.

[0208] Uma molécula de ligação a anti-SEMA4D, *por exemplo*, um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno, variante ou derivado deles, conforme fornecido neste documento, pode ser administrada em uma quantidade farmaceuticamente eficaz para o tratamento *in vivo* de doenças mediadas por SEMA4D, como cânceres, doenças autoimunes, doenças inflamatórias, incluindo doenças inflamatórias do sistema nervoso central (SNC) e sistema nervoso periférico (SNP), doenças neurodegenerativas e angiogênese invasiva. A este respeito, será apreciado que as moléculas de ligação divulgadas podem ser formuladas de modo a facilitar a administração e promover a estabilidade do agente ativo. Em certos aspectos, as composições farmacêuticas, como fornecido neste documento, podem incluir um carreador estéril farmaceuticamente aceitável, não tóxico, como solução salina fisiológica, tampões não tóxicos, conservantes e similares. Para os propósitos do presente pedido, uma quantidade farmaceuticamente eficaz de uma molécula de

ligação anti-SEMA4D, *por exemplo*, um anticorpo ou fragmento de ligação a antígeno, variante ou derivado dele, conforme fornecido neste documento, conjugado ou não conjugado, significa uma quantidade suficiente para atingir ligação eficaz a um alvo e obter um benefício, *por exemplo*, melhorar os sintomas de uma doença ou distúrbio ou detectar uma substância ou célula.

[0209] As composições farmacêuticas usadas na divulgação compreendem as transportadoras farmaceuticamente aceitáveis, incluindo, *por exemplo*, trocadores de íons, alumina, estearato de alumínio, lecitina, soro as proteínas, tais como albumina humana, substâncias tampão, tais como fosfatos, glicina, ácido sórbico, sorbato de potássio, misturas de glicerídeo parciais dos ácidos graxos saturados vegetais, água, sais ou sulfato de eletrólitos, tais como de protamina, fosfato dissódico, hidrogenofosfato de potássio, cloreto de sódio, sais de zinco, sílica coloidal, trissilicato de magnésio, polivinil pirrolidona, substâncias à base de celulose, polietileno glicol, carboximetilcelulose de sódio, poliacrilatos, ceras, polímeros de polietileno-polioxipropileno-bloco, polietileno glicol e gordura de lâ.

[0210] Os preparativos para a administração parentérica incluem, sem limitação, soluções aquosas ou não aquosas estéreis, emulsões e suspensões. Exemplos de solventes não aquosos incluem: propilenoglicol, polietilenoglicol, óleos vegetais, tais como azeite e ésteres orgânicos injetáveis, tais como oleato de etil. Os transportadores aquosos incluem *por exemplo*, água, soluções alcoólicas/aquosas, suspensões ou emulsões incluindo solução salina e meios tamponados. Os carreadores farmaceuticamente aceitáveis incluem, mas não estão limitados a 0,01-0,1 M, *por exemplo*, tampão fosfato a 0,05 M ou solução salina a 0,8%. Outros veículos parentéricos comuns incluem: soluções de fosfato de sódio, dextrose de Ringer, dextrose e cloreto de sódio, lactato de Ringer ou óleos fixos. Veículos intravenosos incluem reposidores de fluidos e nutrientes, reposidores de eletrólitos, como aqueles à base de dextrose de Ringer, e similares. Aditivos e outros conservantes também

podem estar presentes, como por exemplo, antimicrobianos, antioxidantes, agentes quelantes, gases inertes e semelhantes.

[0211] Em certos aspectos, composições farmacêuticas adequadas para utilização injetável incluem soluções aquosas estéreis (quando solúvel em água) ou dispersões e pós estéreis para preparação extemporânea de soluções injetáveis estéreis ou dispersões. Em tais casos, a composição deve ser estéril e deve ser fluida à medida que haja uma fácil seringabilidade. Deve ser estável sob as condições de fabricação e armazenamento e pode ser preservada contra a ação contaminante de microrganismos, tais como bactérias e fungos. O carreador pode ser um solvente ou meio de dispersão contendo, por exemplo, água, etanol, poliol (*por exemplo*, glicerol, propilenoglicol e polietilenoglicol líquido e similares) e suas misturas apropriadas. A fluidez apropriada pode ser mantida, por exemplo, pelo uso de um revestimento, tal como lecitina, pela manutenção do tamanho de partícula necessário no caso de dispersão e pelo uso de surfactantes. As formulações adequadas para utilização nos métodos terapêuticos divulgados neste documento são descritas em Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Publishing Co.) 16a ed. (1980).

[0212] A prevenção da ação de micro-organismos pode ser alcançada por diversos agentes antibacterianos e antifúngicos, por exemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido ascórbico, timerosal e afins. Em certos aspectos, agentes isotônicos, por exemplo, açúcares, polialcoois, como manitol, sorbitol ou cloreto de sódio podem ser incluídos na composição. A absorção prolongada das composições injetáveis pode ser provocada pela inclusão, na composição, de um agente que retarda a absorção, por exemplo, monoestearato de alumínio e gelatina.

[0213] Em qualquer caso, soluções injetáveis estéreis podem ser preparadas incorporando um composto ativo (*por exemplo*, uma molécula de ligação anti-SEMA4D, *por exemplo*, um anticorpo ou fragmento de ligação a antígeno, variante ou derivado deles, conforme fornecido neste documento, por si ou em combinação com

outros agentes ativos) na quantidade necessária em um solvente apropriado com um ou uma combinação de ingredientes aqui enumerados, conforme necessário, seguido de esterilização por filtração. Geralmente, as dispersões são preparadas incorporando o composto ativo em um excipiente estéril que contém um meio de dispersão básico e os outros ingredientes necessários dentre aqueles enumerados acima. No caso de pós estéreis para a preparação de soluções injetáveis estéreis, os métodos de preparação podem incluir secagem a vácuo e de liofilização que produz um pó do ingrediente ativo mais qualquer ingrediente adicional desejado a partir de uma solução deste anteriormente filtrada esterilizada. As preparações para as injeções são processadas, preenchidas em recipientes como ampolas, bolsas, garrafas, seringas ou frascos e seladas sob condições assépticas, de acordo com métodos conhecidos na técnica. Além disso, as preparações podem ser embaladas e vendidas na forma de um kit, como os descritos no pedido de patente US Nº Ser. 09/259.337. Tais artigos de fabricação podem ter rótulos ou bulas, indicando que as composições associadas são úteis para o tratamento de um sujeito que sofre ou predispõe a uma doença ou distúrbio.

[0214] As formulações parentéricas podem ser uma dose em bolus única, uma infusão ou uma dose em bolus de carga seguida de uma dose de manutenção. Essas composições podem ser administradas em intervalos fixos ou variáveis específicos, *por exemplo*, uma vez ao dia ou "conforme necessário".

[0215] Certas composições farmacêuticas fornecidas por esta divulgação podem ser administradas por via oral em uma forma de dosagem aceitável, incluindo, *por exemplo*, cápsulas, comprimidos, suspensões aquosas ou soluções. Certas composições farmacêuticas também podem ser administradas por aerossol nasal ou inalação. Tais composições podem ser preparadas como soluções em soro fisiológico, empregando álcool benzílico ou outros conservantes adequados, promotores de absorção para melhorar a biodisponibilidade e/ou outros agentes convencionais de

solubilização ou dispersão.

[0216] A quantidade de uma molécula de ligação a anti-SEMA4D, *por exemplo*, um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno, variante ou derivado, conforme fornecido neste documento, que pode ser combinada com os materiais carreadores para produzir uma forma de dosagem única, variará dependendo do hospedeiro tratado e do modo particular de administração. A composição pode ser administrada como uma dose única, doses múltiplas ou durante um período de tempo estabelecido numa infusão. Os regimes de dosagem podem ser ajustados para fornecer a resposta desejada ideal (*por exemplo*, uma resposta terapêutica ou profilática).

[0217] Uma molécula de ligação a anti-SEMA4D, *por exemplo*, um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno, variante ou derivado deles, conforme fornecido neste documento, pode ser administrada a um humano ou outro animal, de acordo com os métodos de tratamento acima mencionados, em uma quantidade suficiente para produzir um efeito terapêutico. Uma molécula de ligação a anti-SEMA4D, *por exemplo*, um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno, variante ou derivado deles, conforme fornecido neste documento, pode ser administrada a um humano ou outro animal em uma forma de dosagem convencional preparada combinando o anticorpo com um carreador farmaceuticamente aceitável convencional ou diluente de acordo com técnicas conhecidas. Será reconhecido por um versado na técnica que a forma e o caráter do carreador ou diluente farmaceuticamente aceitável são ditados pela quantidade de ingrediente ativo com o qual ele deve ser combinado, a via de administração e outras variáveis conhecidas.

[0218] Por "dose ou quantidade terapeuticamente eficaz" ou "quantidade eficaz", entende-se uma quantidade de uma molécula de ligação anti-SEMA4D, *por exemplo*, um anticorpo ou seu fragmento de ligação a antígeno, variante ou derivado deles, conforme fornecido neste documento, que quando administrada produz uma

resposta terapêutica positiva em relação ao tratamento de um paciente com uma doença a ser tratada.

[0219] Doses terapeuticamente eficazes de composições como fornecidas neste documento para o tratamento de doenças mediadas por SEMA4D, como câncer; doenças autoimunes, *por exemplo*, artrite, esclerose múltipla, doenças inflamatórias, incluindo doenças inflamatórias do sistema nervoso central (SNC) e sistema nervoso periférico (SNP); doenças neurodegenerativas; e angiogênese invasiva, variam dependendo de muitos fatores diferentes, incluindo meios de administração, sítio de destino, estado fisiológico do paciente, se ele é humano ou animal, outros medicamentos administrados e se o tratamento é profilático ou terapêutico. Geralmente, o paciente é um ser humano, mas mamíferos não humanos, incluindo os mamíferos transgênicos, também podem ser tratados. As doses de tratamento podem ser tituladas usando métodos de rotina conhecidos por aqueles versados na técnica para otimizar a segurança e a eficácia.

[0220] A quantidade de uma molécula de ligação a anti-SEMA4D a ser administrada, *por exemplo*, um anticorpo ou fragmento de ligação a antígeno, variante ou derivado deles, conforme fornecido neste documento, é facilmente determinada por um versado na técnica sem experimentação indevida. Os fatores que influenciam o modo de administração e a quantidade respectiva de molécula de ligação a anti-SEMA4D incluem, entre outros, a gravidade da doença, a história da doença e a idade, altura, peso, saúde e condição física o indivíduo sob terapia. Deles modo, a quantidade de molécula de ligação ao anti-SEMA4D a ser administrada dependerá do modo de administração e se o indivíduo sofrerá uma dose única ou doses múltiplas deste agente.

[0221] Esta divulgação também fornece o uso de uma molécula de ligação anti-SEMA4D, *por exemplo*, um anticorpo ou fragmento de ligação a antígeno, variante ou derivado deles, na fabricação de um medicamento para o tratamento de

uma doença autoimune e/ou doença inflamatória, incluindo, *por exemplo*, artrite, esclerose múltipla, doenças inflamatórias no SNC e PNS, doenças neurodegenerativas ou câncer.

[0222] Esta divulgação também fornece o uso de uma molécula de ligação anti-SEMA4D, *por exemplo*, anticorpo desta divulgação ou fragmento, variante ou derivado de ligação a antígeno deles, na fabricação de um medicamento para tratamento de uma doença autoimune e/ou doença inflamatória, incluindo, *por exemplo*, artrite, esclerose múltipla, doenças inflamatórias do SNC e PNS, doenças neurodegenerativas ou câncer, em que o medicamento é usado em um sujeito que foi pré-tratado com pelo menos uma outra terapia. Por "pré-tratamento" ou "pré-tratado", o sujeito recebeu uma ou mais outras terapias (*por exemplo*, foi tratado com pelo menos uma outra terapia contra o câncer) antes de receber o medicamento que compreende a molécula de ligação anti-SEMA4D. "Pré-tratado" ou "pré-tratamento" inclui sujeitos que foram tratados com pelo menos uma outra terapia dentro de 2 anos, dentro de 18 meses, dentro de 1 ano, dentro de 6 meses, dentro de 2 meses, dentro de 6 semanas, dentro de 1 mês, dentro de 4 semanas, dentro de 3 semanas, dentro de 2 semanas, dentro de 1 semana, dentro de 6 dias, dentro de 5 dias, dentro de 4 dias, dentro de 3 dias, dentro de 2 dias ou mesmo dentro de 1 dia antes do início do tratamento com o medicamento que compreende uma molécula de ligação a anti-SEMA4D, *por exemplo*, um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno, variante ou derivado deles, conforme fornecido neste documento. Não é necessário que o sujeito tenha respondido ao pré-tratamento com a terapia ou terapias anteriores. Assim, o sujeito que recebe o medicamento que compreende a molécula de ligação anti-SEMA4D poderia ter respondido ou ter falhado em responder (*por exemplo*, o câncer era refratário) ao pré-tratamento com a terapia anterior ou a uma ou mais das terapias anteriores quando o pré-tratamento compreendeu múltiplas terapias. Exemplos de outras terapias contra o câncer para as quais um sujeito pode ter

recebido pré-tratamento antes de receber o medicamento compreendendo uma molécula de ligação anti-SEMA4D, *por exemplo*, um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno, variante ou derivado deles, conforme fornecido neste documento, incluem, sem limitação, cirurgia; terapia de radiação; quimioterapia, opcionalmente em combinação com transplante autólogo de medula óssea; outra terapia de anticorpo monoclonal anticâncer; terapia de câncer baseada em moléculas pequenas; terapias de câncer baseadas em vacina/imunoterapia; terapia com esteroides; outra terapia de câncer; ou qualquer combinação destes.

#### IX. Diagnóstico

[0223] Esta divulgação fornece ainda um método de diagnóstico útil durante o diagnóstico de doenças mediadas por SEMA4D, como certos tipos de câncer, doenças autoimunes, doenças inflamatórias, incluindo, *por exemplo*, artrite, esclerose múltipla, doenças inflamatórias do sistema nervoso central (SNC) e do sistema nervoso periférico (SNP), doenças neurodegenerativas e angiogênese invasiva, que envolve a medição do nível de expressão da proteína SEMA4D ou transcrição em tecidos ou outras células ou fluido corporal de um indivíduo e comparar o nível de expressão medido com um nível de expressão padrão de SEMA4D em tecido normal ou fluido corporal, por meio do qual um aumento no nível de expressão em comparação com o padrão é indicativo de um distúrbio.

[0224] Uma molécula de ligação a anti-SEMA4D, *por exemplo*, um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno, variante ou derivado deles, conforme fornecido neste documento, pode ser usada para analisar os níveis de proteína SEMA4D em uma amostra biológica usando métodos imuno-histológicos clássicos conhecidos por aqueles versados na técnica (*por exemplo*, ver Jalkanen, *et al.*, *J. Cell. Biol.* 101:976-985 (1985); Jalkanen *et al.*, *J. Cell Biol.* 105: 3087-3096 (1987)). Outros métodos baseados em anticorpos úteis para detectar a proteína SEMA4D incluem imunoensaios, tais como o ensaio imunoabsorvente ligado a enzima (ELISA),

imunoprecipitação ou Western blotting. Os ensaios adequados são descritos em mais detalhes em outras partes deste documento. to those of skill in the art (e.g., see Jalkanen, *et al.*, *J. Cell. Biol.* 101:976-985 (1985); Jalkanen *et al.*, *J. Cell Biol.* 105:3087-3096 (1987)). Other antibody-based methods useful for detecting SEMA4D protein expression include immunoassays, such as the enzyme linked immunosorbent assay (ELISA), immunoprecipitation, or Western blotting. Suitable assays are described in more detail elsewhere herein.

[0225] Por "avaliar o nível de expressão do polipeptídeo SEMA4D", entende-se medir qualitativamente ou quantitativamente ou estimar o nível do polipeptídeo SEMA4D em uma primeira amostra biológica diretamente (*por exemplo*, determinando ou estimando o nível absoluto de proteína) ou relativamente (*por exemplo*, comparando com o nível de polipeptídeo associado à doença em uma segunda amostra biológica). Em certos aspectos, o nível de expressão de polipeptídeo SEMA4D na primeira amostra biológica pode ser medido ou estimado e comparado com um nível padrão de polipeptídeo SEMA4D, sendo o padrão retirado de uma segunda amostra biológica obtida de um indivíduo que não apresenta o distúrbio ou que é determinado por níveis médios de uma população de indivíduos que não apresentam o distúrbio. Como será apreciado na técnica, uma vez que o nível de polipeptídeo SEMA4D "padrão" é conhecido, pode ser usado repetidamente como um padrão para comparação.

[0226] Por "amostra biológica" entende-se qualquer amostra biológica obtida de um indivíduo, linha celular, cultura de tecidos ou outra fonte de células que potencialmente expressem SEMA4D. Métodos para a obtenção de biópsias de tecidos e fluidos corporais de mamíferos são bem conhecidos na técnica.

## X. Imunoensaios

[0227] Uma molécula de ligação a anti-SEMA4D, *por exemplo*, um anticorpo ou fragmento de ligação a antígeno, variante ou derivado deles, conforme fornecido neste documento, pode ser testada quanto a ligação imunoespecífica por qualquer

método conhecido na técnica. Os imunoensaios que podem ser utilizados incluem, mas não estão limitados a, sistemas de ensaio competitivos e não competitivos usando técnicas como Western blots, radioimunoensaios, ELISA (ensaio imunoabsorvente ligado a enzima), imunoensaios "sanduíche", ensaios de imunoprecipitação, reações de precipitina, reações de precipitação de gel precipitina, ensaios de imunodifusão, ensaios de aglutinação, ensaios de fixação de complemento, ensaios imunoradiométricos, imunoensaios fluorescentes ou imunoensaios de proteína A, para citar apenas alguns. Tais ensaios são rotineiros e bem conhecidos na técnica (*ver, por exemplo, Ausubel et al. eds, (1994) Current Protocols in Molecular Biology (John Wiley & Sons, Inc., NY) vol. 1, que é incorporado neste documento por referência na sua totalidade*). Imunoensaios exemplares são brevemente descritos abaixo, mas não se destinam a limitação.

[0228] Uma molécula de ligação a anti-SEMA4D, *por exemplo*, um anticorpo ou fragmento de ligação a antígeno, variante ou derivado deles, conforme fornecido neste documento, adicionalmente, pode ser empregada histologicamente, como em imunofluorescência, microscopia imunoelétrônica ou ensaios não imunológicos, para detecção *in situ* da proteína SEMA4D ou variantes conservadas ou seus fragmentos peptídicos. A detecção *in situ* pode ser realizada removendo uma amostra histológica de um paciente e aplicando a ele um anticorpo anti-SEMA4D marcado ou seu fragmento de ligação ao antígeno, *por exemplo*, sobrepondo o anticorpo marcado (ou fragmento) a uma amostra biológica. Através do uso de tal procedimento, é possível determinar não apenas a presença da proteína SEMA4D ou variantes ou fragmentos peptídicos conservados, mas também sua distribuição no tecido examinado. Usando esta divulgação, os versados na técnica perceberão prontamente que qualquer um de uma ampla variedade de métodos histológicos (como procedimentos de coloração) pode ser modificado para alcançar tal detecção *in situ*.

[0229] A atividade de ligação de um determinado lote de uma molécula de

ligação anti-SEMA4D, *por exemplo*, um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno, variante ou derivado deles, conforme fornecido neste documento, pode ser determinada de acordo com métodos bem conhecidos. Os versados na técnica serão capazes de determinar as condições operacionais e ótimas do ensaio para cada determinação empregando experimentação de rotina.

[0230] Há uma variedade de métodos disponíveis para medir a afinidade de uma interação anticorpo-antígeno, mas relativamente poucos para determinar constantes de velocidade. A maioria dos métodos depende do anticorpo ou antígeno de marcação, o que inevitavelmente complica as medições de rotina e introduz incertezas nas quantidades medidas.

[0231] A ressonância plasmônica de superfície (SPR), como realizada no BIACORE®, oferece várias vantagens comparada aos métodos convencionais de medição da afinidade das interações anticorpo-antígeno: (i) nenhum requisito para marcar anticorpo ou antígeno; (ii) os anticorpos não precisam ser purificados previamente, o sobrenadante da cultura de células pode ser usado diretamente; (iii) medições em tempo real, permitindo rápida comparação semiquantitativa de diferentes interações de anticorpos monoclonais, são permitidas e são suficientes para muitos fins de avaliação; (iv) a superfície bioespecífica pode ser regenerada, de modo que uma série de diferentes anticorpos monoclonais possa ser facilmente comparada sob condições idênticas; (v) os procedimentos analíticos são totalmente automatizados e uma extensa série de medições pode ser realizada sem a intervenção do usuário. BIApplications Handbook, versão AB (reimpresso 1998), código BIACORE® Nº BR-1001-86; BIATechnology Handbook, versão AB (reimpresso 1998), código BIACORE® Nº BR-1001-84. Os estudos de ligação baseados em SPR requerem que um membro de um par de ligações seja imobilizado na superfície do sensor. O parceiro de ligação imobilizado é referido como o ligante. O parceiro de ligação na solução é referido como analito. Em alguns casos, o ligante é anexado

indiretamente à superfície através da ligação a outra molécula imobilizada, a qual é denominada molécula de captura. A resposta de SPR reflete uma mudança na concentração de massa na superfície do detector à medida que os analitos se ligam ou se dissociam.

[0232] Com base em SPR, as medições BIACORE® em tempo real monitoram as interações diretamente à medida que ocorrem. A técnica é bem adequada para a determinação de parâmetros cinéticos. A classificação comparativa de afinidade é simples de executar, e as constantes cinética e de afinidade podem ser derivadas dos dados do sensorgrama.

[0233] Quando o analito é injetado em um pulso discreto através de uma superfície do ligante, o sensorgrama resultante pode ser dividido em três fases essenciais: (i) associação do analito com o ligante durante a injeção da amostra; (ii) equilíbrio ou estado estacionário durante a injeção da amostra, onde a taxa de ligação do analito é equilibrada pela dissociação do complexo; (iii) dissociação do analito da superfície durante o fluxo do tampão.

[0234] As fases de associação e dissociação fornecem informações sobre a cinética da interação analito-ligante ( $k_a$  e  $k_d$ , as taxas de formação e dissociação de complexos,  $k_d/k_a = K_D$ ). A fase de equilíbrio fornece informações sobre a afinidade da interação do analito-ligante ( $K_D$ ).

[0235] O software BIAevaluation fornece recursos abrangentes para ajuste de curvas usando integração numérica e algoritmos de ajuste global. Com uma análise adequada dos dados, constantes de taxa e afinidade para interação podem ser obtidas a partir de investigações simples com BIACORE®. O intervalo de afinidades mensuráveis por esta técnica é muito amplo, variando de mM a pM.

[0236] A especificidade do epítopo é uma característica importante de um anticorpo monoclonal. O mapeamento de epítopos com BIACORE®, em contraste com as técnicas convencionais usando radioimunoensaio, ELISA ou outros métodos

de adsorção de superfície, não requer marcação ou anticorpos purificados e permite testes de especificidade de vários sítios usando uma sequência de vários anticorpos monoclonais. Além disso, um grande número de análises pode ser processado automaticamente.

[0237] Experimentos de ligação em pares testam a capacidade de dois MAbs se ligarem simultaneamente ao mesmo antígeno. Os MAbs dirigidos contra epítopos separados se ligam independentemente, enquanto os MAbs direcionados contra epítopos idênticos ou intimamente relacionados interferem na ligação um do outro. Estes experimentos de ligação com o BIACORE® são fáceis de realizar.

[0238] Por exemplo, pode-se usar uma molécula de captura para ligar o primeiro Mab, seguido pela adição de antígeno e segundo MAb sequencialmente. Os sensorgramas revelarão: (1) quanto do antígeno se liga ao primeiro Mab, (2) até que ponto o segundo MAb se liga ao antígeno ligado à superfície, (3) se o segundo MAb não se liga, se reverter a ordem do teste aos pares altera os resultados.

[0239] A inibição peptídica é outra técnica usada para o mapeamento de epítopos. Este método pode complementar estudos de ligação de anticorpos em pares e pode relacionar epítopos funcionais a características estruturais quando a sequência primária do antígeno é conhecida. Peptídeos ou fragmentos de antígeno são testados quanto à inibição da ligação de diferentes MAbs ao antígeno imobilizado. Os péptidos que interferem na ligação de um determinado MAb são assumidos como estando estruturalmente relacionados com o epítopo definido por esse MAb.

[0240] Esta divulgação emprega, a menos que indicado de outra forma, técnicas convencionais de biologia celular, cultura celular, biologia molecular, biologia transgênica, microbiologia, DNA recombinante e imunologia, que estão dentro das habilidades da técnica. Essas técnicas são totalmente explicadas na literatura. Ver, por exemplo, Sambrook *et al.*, ed. (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2a. ed.; Cold Spring Harbor Laboratory Press); Sambrook *et al.*, ed. (1992) Molecular

Cloning: A Laboratory Manual, (Cold Springs Harbor Laboratory, NY); D. N. Glover ed., (1985) DNA Cloning, Volumes I e II; Gait, ed. (1984) Oligonucleotide Synthesis; Mullis *et al.* A Pat. US Nº 4.683.195; Hames e Higgins, orgs. (1984) Nucleic Acid Hybridization; Hames e Higgins, orgs. (1984) Transcription And Translation; Freshney (1987) Culture Of Animal Cells (Alan R. Liss, Inc.); Immobilized Cells And Enzymes (IRL Press) (1986); Perbal (1984) A Practical Guide To Molecular Cloning; o tratado, Methods In Enzymology (Academic Press, Inc., N.Y.); Miller e Calos eds. (1987) Gene Transfer Vectors For Mammalian Cells, (Cold Spring Harbor Laboratory); Wu *et al.*, eds., Methods In Enzymology, Vols. 154 e 155; Mayer e Walker, eds. (1987) Immunochemical Methods In Cell And Molecular Biology (Academic Press, London); Weir e Blackwell, eds., (1986) Handbook Of Experimental Immunology, Volumes I-IV; Manipulating the Mouse Embryo, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., (1986); e em Ausubel *et al.* (1989) Current Protocols in Molecular Biology (John Wiley and Sons, Baltimore, Md.).

[0241] Os princípios gerais da manipulação de anticorpos são apresentados em Borrebaeck, ed. (1995) Antibody Engineering (2a ed.; Oxford Univ. Press). Os princípios gerais da manipulação proteica são estabelecidos em Rickwood *et al.*, EDS. (1995) Protein Engineering, A Practical Approach (IRL Press em Oxford Univ. Press, Oxford, Eng.). Os princípios gerais de anticorpos e ligação de anticorpo-hapteno são apresentados em: Nisonoff (1984) Molecular Immunology (2a ed.; Sinauer Associates, Sunderland, Mass.); e Steward (1984) Antibodies, Their Structure and Function (Chapman and Hall, New York, N.Y.). Além disso, métodos padrão em imunologia conhecidos na técnica e não especificamente descritos podem ser seguidos como em Current Protocols in Immunology, John Wiley & Sons, New York; Stites *et al.*, eds. (1994) Basic and Clinical Immunology (8<sup>a</sup> ed.; Appleton & Lange, Norwalk, Conn.) e Mishell and Shiigi (eds) (1980) Selected Methods in Cellular Immunology (W.H. Freeman and Co., NY).

[0242] Trabalhos de referência padrão que estabelecem princípios gerais de imunologia incluem Current Protocols in Immunology, John Wiley & Sons, Nova York; Klein J., Immunology: The Science of Self-Nonself Discrimination (John Wiley & Sons, NY (1982)); Kennett *et al.*, eds. (1980) Monoclonal Antibodies, Hybridoma: A New Dimension in Biological Analyses (Plenum Press, NY); Campbell (1984) "Monoclonal Antibody Technology" em Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, ed. Burden *et al.*, (Elsevier, Amsterdam); Goldsby *et al.*, eds. (2000) Kuby Immunology (4<sup>a</sup> ed.; W.H. Freeman and Co., NY); Roitt *et al.* (2001) Immunology (6<sup>a</sup> ed.; London: Mosby); Abbas *et al.* (2005) Cellular and Molecular Immunology (5<sup>a</sup> ed.; Elsevier Health Sciences Division); Kontermann and Dubel (2001) Antibody Engineering (Springer Verlag); Sambrook and Russell (2001) Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Press); Lewin (2003) Genes VIII (Prentice Hall, 2003); Harlow and Lane (1988) Antibodies: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Press); Dieffenbach and Dveksler (2003) PCR Primer (Cold Spring Harbor Press).

[0243] Todas as referências citadas acima, bem como todas as referências citadas neste documento, são incorporadas neste documento por referência em sua totalidade.

[0244] Os seguintes exemplos são oferecidos a título de ilustração e não a título de limitação.

#### Exemplos

Exemplo 1: Geração de anticorpo MAb D2517 monoclonal anti-SEMA4D totalmente humano

[0245] O anticorpo monoclonal anti-SEMA4D totalmente humano D2517 foi gerado pelo método a seguir. Bibliotecas de anticorpos totalmente humanos foram geradas no vírus vaccinia e foram triadas quanto à ligação a SEMA4D de acordo com os métodos descritos no pedido de patente US Publicação Nº 2013-0288927-A1, que

é incorporado neste documento por referência na sua totalidade. Um total de 96 anticorpos foram agrupados em seis grupos epítopos diferentes por ELISA de competição. A ligação competitiva de anticorpos humanos à forma nativa de SEMA4D humana em células Jurkat foi avaliada usando anticorpos de camundongo, mAb76 e mAb67, e um controle de IgG de camundongo. O mAb76 e o mAb67 se ligam a epítopos conhecidos do SEMA4D humano, e a competição com qualquer um deles indica funcionalidade. As células Jurkat foram pré-incubadas por 30 minutos em gelo com mAb76, mAb67 ou controle de IgG de camundongo a 5 ug/mL em 100 ul e 200.000 células em tampão FACS (1XPBS + BSA a 0,05% + EDTA a 2 mM). Isto permitiu a ligação saturada dos anticorpos do camundongo, bloqueando os epítopos de ligação. Os anticorpos de teste humanos e os anticorpos de controle foram pré-incubados a 1 ug/mL em gelo por 30 minutos com um reagente secundário de cabra anti-anticorpo humano Fc-Dylight 649 (Jackson Immunoresearch 496-170). Após a incubação das células Jurkat com anticorpos IgG de camundongo, as células foram lavadas e incubadas com a mistura teste anticorpo/complexo secundário por 30 minutos em gelo. As células foram subsequentemente lavadas duas vezes com 200 µL de tampão FACS e ressuspensas numa solução de fixação de 250 µL de PBS/1% de BSA e 0,5% de paraformaldeído com PI. Após ressuspensão, as células foram analisadas por citometria de fluxo em um FACS CANTO II. A população PI negativa foi bloqueada e o desvio de Dylight649 foi registrado e avaliado. A inibição percentual da ligação foi calculada em comparação com a ligação dos anticorpos humanos às células Jurkat pré-incubadas com IgG de camundongo irrelevante.

[0246] O MAb C2305 foi selecionado para posterior caracterização devido à sua capacidade de bloquear os anticorpos anti-SEMA4D murinos previamente **CARACTERIZADOS** 67-2 e 76-1. Ver, *por exemplo*, Patente US Nº 8.496.938, cuja divulgação é aqui incorporada por referência na sua totalidade.

[0247] Um polinucleotídeo que codifica o MAb C2305 VH foi clonado em um

vetor de expressão em mamífero que continha a sequência de codificação da região constante da cadeia pesada gama-4 humana, criando uma cadeia pesada de comprimento total. Um polinucleotídeo que codifica o MAb C2305 VL foi clonado em um vetor de expressão em mamífero que possuía a sequência de codificação da região constante lambda humana, criando uma cadeia leve de comprimento total. Os vetores de expressão contendo a cadeia pesada e a cadeia leve foram cotransfetados em células CHO-S. O anticorpo monoclonal produzido foi secretado das células e coletado após um período de expressão de 3-6 dias. O MAb resultante foi purificado utilizando cromatografia de Proteína A e **CARACTERIZADO**. Demonstrou-se que o MAb totalmente humano resultante (MAb C2305) é específico para SEMA4D por citometria de fluxo e por ELISA, e mostrou-se capaz de competir com o MAb 67-2 murino pela ligação a SEMA4D. A atividade funcional do MAb C2305 foi ainda avaliada em um Ensaio de Bloqueio de Receptores de acordo com o método no Exemplo 3, abaixo. O bloqueio do receptor foi observado, mas em um nível inferior ao do MAb 2503 humanizado (Patente US Nº 8.496.938, também referida como VX15/2503) que foi usado como um comparador.

[0248] MAb C2305 foi totalmente sequenciado e foi então manipulado para melhorar a afinidade. A região determinante de complementaridade 3 da cadeia pesada (HCDR3) foi submetida a técnicas padrão de mutagênese direcionada ao sítio, e uma nova região variável da cadeia leve (VL) totalmente humana foi identificada utilizando-se de uma biblioteca de cadeias leves de acordo com os métodos descritos no pedido de patente US Publicação Nº 2013-0288927-A1. A partir dessas alterações, um MAb com afinidade melhorada, MAb D2517, foi selecionado como anticorpo principal. O MAb D2517 foi clonado, montado e expresso como um anticorpo IgG4 totalmente humano com uma cadeia leve lambda. As sequências VH, VL e CDR de MAb D2517 são apresentadas na Tabela 2.

Tabela 2: Sequências MAb D2517

EQ	ES TRUTURA	SEQUÊNCIA
	VH	EVOLVESGGGLVOPGGSLRLSCAASGFIFSDYW
	VL	SYELTOPPSVSVSPGOTASITCSGDKLGDKYAVW

**Exemplo 2: Caracterização de Ligação de MAb D2517**

[0249] As características de ligação do MAb D2517 foram determinadas pelo ensaio BIACORE, como se segue. O anticorpo, bem como o anticorpo comparador VX15/2503, ambos formulados em PBS, foram capturados no sensor com IgGFc anti-humano de cabra em baixa densidade e, em seguida, o SEMA4D-His de sagui foi escoado sobre o anticorpo capturado em um intervalo de concentração de antígeno de 0-25 nm. Os resultados são mostrados na Tabela 3. A afinidade de MAb D2517 para SEMA4D foi semelhante à afinidade de VX15/2503.

**Tabela 3: Resultados do ensaio BIACORE**


[0250] A capacidade do MAb D2517 de se ligar ao SEMA4D de macaco humano, camundongo, sagui e cinomolgo foi determinada por ELISA usando o método a seguir. As placas de ELISA de poço C Nunc maxisorp foram revestidas durante a noite com 100 µL/poço de CD 100-His formulado em IX PBS. Após a incubação durante a noite, as placas foram lavadas e subsequentemente bloqueadas com 200 uL/poço com PBS + 0,5% de BSA + 0,025% de tween 20 por pelo menos 1

hora à temperatura ambiente. Após lavagem adicional, foram adicionados 100 µl/poço de MAbs diluídos (100 ng/mL) a cada poço da placa ELISA, que foi incubada à temperatura ambiente por 2 horas e depois lavada. A seguir, 100 µl/poço de Fc anti-humano de cabra 1:10.000 (Jackson cat#109-035-098 lote 118460) foram adicionados a cada poço e a placa ELISA foi incubada à temperatura ambiente por 1 hora. A placa foi então lavada e desenvolvida com substrato de 100 uL/poço TMB por 15 minutos. A reação de detecção foi parada usando ácido sulfúrico 100 uL/poço/2N e a placa foi lida usando um Leitor de Placas no comprimento de onda de 450-570 nM.

[0251] Os resultados são mostrados na FIG. 1A (SEMA4D de humano), FIG. 1B (SEMA4D de sagui), a FIG. 1C (SEMA4D de cinomolgo) e FIG. 1D (SEMA4D de camundongo).

Exemplo 3: MAb D2517 bloqueia o SEMA4D da ligação ao seu receptor

[0252] A capacidade do MAbD2517 de bloquear o SEMA4D derivado de várias espécies para se ligar ao seu receptor, Plexin B1, foi testada como se segue.

[0253] MAbD2517 e MAbVX 15/2503 foram formulados em tampão de acetato. Os anticorpos foram comparados em séries de diluição em triplicado quanto à sua capacidade de bloquear dos complexos SEMA4D-His (SEMA4D de humano, macaco cinomolgo, camundongo ou rato) a ligação às células 293PLXNB1. Todos os anticorpos foram diluídos de 1,5 µg/mL a 88 ng/mL em uma placa de 96 poços e combinados 1:1 com 0,8 ug/mL do SEMA4D-His apropriado e incubados durante a noite a 4°C.

[0254] No dia seguinte, os complexos ou controles Anticorpo/SEMA4D-His foram adicionados a  $2,5 \times 10^5$  células 293PLXNB1 em uma placa de 96 poços e a ligação foi deixada ocorrer por 30 minutos a 4°C. Após a lavagem, as células foram coradas com anti-6xHis-APC (30 min, 4°C), lavadas e analisadas por citometria de fluxo em FACS Canto II. Os resultados são mostrados na FIG. 2A-2D. Os valores de EC50 foram calculados a partir das curvas e são mostrados na Tabela 4.

Tabela 4: Valores EC50 (em nM) para bloquear SEMA4D da ligação ao seu receptor

SEMA4D-his		M
SEMA4D		1,
SEMA4D de		1,
SEMA4D de		1,
SEMA4D de		1,

Exemplo 4: Teste do equivalente quimérico murino de MAbD2517 em um modelo de tumor

[0255] As sequências de aminoácidos de VH e VL (SEQ ID NO: 1 e SEQ ID NO: 5) do MAb D2517 foram inseridas em vetores que expressam as regiões constantes de IgG1 murina e lambda para produzir o anticorpo quimérico MAb D2585. O anticorpo foi expresso em células CHO-S e purificado como explicado no Exemplo 1.

[0256] Camundongos fêmeas Balb/c de 6-8 semanas de idade (n=12) foram enxertadas com 30.000 células de tumor de mama Tubo.A5 por via subcutânea nas camadas de gordura mamária dos camundongos. O tratamento com o anticorpo quimérico de rato IgG1/2B8.1E7 ou anti-SEMA4D MAbD2585 foi iniciado 7 dias após a inoculação (10 mg/kg, IP, X5 semanalmente). Os tumores foram medidos com pinças 2x/semana, iniciando 11 dias após o implante. Os animais foram sacrificados quando o volume do tumor atingiu 800 mm<sup>3</sup>.

[0257] O crescimento do tumor foi medido por compassos de calibre e as medidas foram usadas para calcular o volume do tumor usando a fórmula  $(w^2 \times 1)/2$ , em que w = largura, menor medida e 1 = comprimento, em mm, do tumor. O volume médio do tumor e as curvas de sobrevivência de Kaplan Meier, definidos como o tempo até o ponto final em que o volume do tumor = 800 mm<sup>3</sup>, são mostrados nas

FIGS. 3A e 3B, respectivamente. As análises estatísticas foram realizadas usando a Análise de Variância Bidirecional (ANOVA) para o volume médio do tumor ( $p < 0,05$ ) e a análise Log Rank para sobrevida ( $p < 0,1$ ), respectivamente, que foram estatisticamente significantes.

[0258] A frequência de regressões tumorais no modelo de tumor Tubo também foi medida e é mostrada na FIG. 3C. Regressão é a falta de tumor palpável, definido como um tumor medindo  $< 50 \text{ mm}^3$  por pelo menos duas medições consecutivas. O tratamento com anticorpo quimérico MAbD2585 aumentou o número de regressões em camundongos portadores de Tubo. O número de regressões no grupo de camundongos tratados com anticorpo quimérico MAbD2585 foi estatisticamente significativo em comparação com a Ig de controle ( $p = 0,01$ ), conforme determinado pelo teste exato de Fisher.

[0259] A abrangência e o escopo da presente divulgação não devem ser limitados por qualquer um dos exemplos de modalidades descritos acima, mas devem ser definidos somente em conformidade com as reivindicações a seguir e seus equivalentes.

## REIVINDICAÇÕES

1. Anticorpo ou seu fragmento de ligação ao antígeno que se liga especificamente a semaforina-4D (SEMA4D), **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende uma região variável de cadeia pesada (VH) e uma região variável de cadeia leve (VL); em que a VH compreende regiões determinantes de complementaridade (HCDRs) HCDR1, HCDR2 e HCDR3 que compreendem sequências de aminoácidos idênticas ou idênticas, exceto por uma, duas, três ou quatro substituições de aminoácidos em um, dois ou todos os três dos HCDRs para SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 e SEQ ID NO: 4, respectivamente; e em que a VL inclui regiões determinantes de complementaridade (LCDRs) LCDR1, LCDR2 e LCDR3 que compreendem sequências de aminoácidos idênticas ou idênticas, exceto por uma, duas, três ou quatro substituições de aminoácidos em uma, duas ou todas as três LCDRs para SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7 e SEQ ID NO: 8, respectivamente.

2. Anticorpo ou seu fragmento, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo fato de que HCDR1, HCDR2 e HCDR3 compreendem sequências de aminoácidos idênticas às SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 e SEQ ID NO: 4, respectivamente, e em que LCDR1, LCDR2, e LCDR3 compreendem sequências de aminoácidos idênticas às SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7 e SEQ ID NO: 8, respectivamente.

3. Anticorpo ou seu fragmento, de acordo com a reivindicação 1 ou reivindicação 2, **CARACTERIZADO** pelo fato de que VH compreende ainda regiões de estrutura (HFWs) HFW1, HFW2, HFW3 e HFW4, e em que VL compreende ainda regiões de estrutura (LFWs) LFW1, LFW2, LFW3 e LFW4.

4. Anticorpo ou seu fragmento, de acordo com a reivindicação 3, **CARACTERIZADO** pelo fato de que as regiões framework são derivadas de um anticorpo humano.

5. Anticorpo ou seu fragmento, de acordo com a reivindicação 3,

**CARACTERIZADO** pelo fato de que as regiões framework são derivadas de um anticorpo não humano.

6. Anticorpo ou seu fragmento, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, **CARACTERIZADO** pelo fato de que VH compreende a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 1.

7. Anticorpo ou seu fragmento, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, **CARACTERIZADO** pelo fato de que VL compreende a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 5.

8. Anticorpo ou seu fragmento, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, **CARACTERIZADO** pelo fato de que VH compreende a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 1 e VL compreende a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 5.

9. Anticorpo ou seu fragmento de ligação ao antígeno que se liga especificamente à semaforina-4D (SEMA4D), **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende uma região variável da cadeia pesada (VH) e uma região variável da cadeia leve (VL); em que a VH compreende uma sequência de aminoácidos pelo menos 80%, 85%, 90%, 95% ou 100% idêntica à SEQ ID NO: 1.

10. Anticorpo ou seu fragmento, de acordo com a reivindicação 9, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a VL compreende uma sequência de aminoácidos pelo menos 80%, 85%, 90%, 95% ou 100% idêntica à SEQ ID NO: 5.

11. Anticorpo ou seu fragmento de ligação ao antígeno que se liga especificamente à semaforina-4D (SEMA4D), **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende uma região variável da cadeia pesada (VH) e uma região variável da cadeia leve (VL); em que a VL compreende uma sequência de aminoácidos pelo menos 80%, 85%, 90%, 95% ou 100% idêntica à SEQ ID NO: 5.

12. Anticorpo ou seu fragmento, de acordo com a reivindicação 11, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a VL compreende uma sequência de

aminoácidos pelo menos 80%, 85%, 90%, 95% ou 100% idêntica à SEQ ID NO: 5.

13. Anticorpo ou seu fragmento de ligação ao antígeno que se liga especificamente à semaforina-4D (SEMA4D) **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende uma região variável da cadeia pesada (VH) e uma região variável da cadeia leve (VL); em que a VH compreende uma sequência de aminoácidos pelo menos 80%, 85%, 90%, 95% ou 100% idêntica à SEQ ID NO: 1; e em que a VL compreende uma sequência de aminoácidos pelo menos 80%, 85%, 90%, 95% ou 100% idêntica à SEQ ID NO: 5.

14. Anticorpo ou seu fragmento, de acordo com a reivindicação 13, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a VH compreende a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 1 e em que a VL compreende a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 5.

15. Anticorpo ou seu fragmento, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 14, **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende ainda uma região constante da cadeia pesada ou um fragmento dela fundido ao terminal C da VH.

16. Anticorpo ou seu fragmento, de acordo com a reivindicação 15, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a região constante da cadeia pesada ou seu fragmento é uma região constante da cadeia pesada humana.

17. Anticorpo ou seu fragmento, de acordo com a reivindicação 16, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a região constante da cadeia pesada ou seu fragmento é uma região constante de IgG4 humana.

18. Anticorpo ou seu fragmento, de acordo com a reivindicação 15, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a região constante da cadeia pesada ou seu fragmento é uma região constante da cadeia pesada não humana.

19. Anticorpo ou seu fragmento, de acordo com a reivindicação 18, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a região constante da cadeia pesada ou seu

fragmento é uma região constante de IgG1 murina.

20. Anticorpo ou fragmento deles, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 19, **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende ainda uma região constante da cadeia leve ou um seu fragmento fundido ao terminal C da VL.

21. Anticorpo ou seu fragmento, de acordo com a reivindicação 20, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a região constante da cadeia leve ou seu fragmento é uma região constante da cadeia leve humana.

22. Anticorpo ou seu fragmento, de acordo com a reivindicação 21, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a região constante da cadeia leve ou seu fragmento é uma região constante da cadeia leve lambda humana.

23. Anticorpo ou seu fragmento, de acordo com a reivindicação 20, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a região constante da cadeia leve ou seu fragmento é uma região constante da cadeia leve não humana.

24. Anticorpo ou seu fragmento, de acordo com a reivindicação 23, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a região constante da cadeia leve ou seu fragmento é uma região constante da cadeia leve lambda murina.

25. Anticorpo ou fragmento de qualquer uma das reivindicações 1 a 24, **CARACTERIZADO** pelo fato de que é um fragmento Fab, um fragmento Fab', um fragmento F(ab')<sub>2</sub>, um fragmento Fd, um fragmento Fv de cadeia única (scFv) ou um fragmento Fv ligado a dissulfeto (sdFv).

26. Anticorpo ou seu fragmento, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 25, **CARACTERIZADO** pelo fato de ser multiespecífico.

27. Anticorpo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 26, **CARACTERIZADO** pelo fato de que pode se ligar especificamente a SEMA4D de humano, SEMA4D de camundongo, SEMA4D de rato ou SEMA4D de primata não humano.

28. Anticorpo ou seu fragmento, de acordo com a reivindicação 27,

**CARACTERIZADO** pelo fato de que SEMA4D de primata não humano é SEMA4D de macaco cinomolgo ou SEMA4D de sagui.

29. Anticorpo ou seu fragmento, de acordo com a reivindicação 27 ou reivindicação 28, que se liga especificamente a SEMA4D com uma afinidade **CARACTERIZADA** pelo fato de uma constante de dissociação KD não superior a 500 nM, 100 nM, 50,0 nM, 40,0 nM, 30,0 nM, 20,0 nM, 10,0 nM, 9,0 nM, 8,0 nM, 7,0 nM, 6,0 nM, 5,0 nM, 4,0 nM, 3,0 nM, 2,0 nM, 1,0 nM, 0,50 nM, 0,10 nM, 0,050 nM, 0,01 nM, 0,005 nM ou 0,001 nM; e em que SEMA4D é SEMA4D de humano, SEMA4D de camundongo, SEMA4D de macaco cinomolgo, SEMA4D desagui ou qualquer combinação destes.

30. Anticorpo ou seu fragmento, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 29, **CARACTERIZADO** pelo fato de que pode inibir a ligação de SEMA4D a um receptor de SEMA4D.

31. Anticorpo ou seu fragmento, de acordo com a reivindicação 30, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o receptor de SEMA4D é Plexin-B1, Plexin-B2, CD72 ou uma combinação destes.

32. Anticorpo ou fragmento deles, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 31, **CARACTERIZADO** pelo fato de que provoca resposta imune mínima ou nenhuma de anti-anticorpo após administração a um sujeito humano.

33. Anticorpo ou seu fragmento, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 32, **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende ainda uma fração heteróloga fundida ou conjugada a ele.

34. Anticorpo ou fragmento deles, de acordo com a reivindicação 33, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a fração heteróloga compreende um polipeptídeo, um agente citotóxico, um agente terapêutico, um pró-fármaco, um lipídio, um carboidrato, um ácido nucleico, um marcador detectável, um polímero ou qualquer combinação destes.

35. Anticorpo ou seu fragmento, de acordo com a reivindicação 34, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o polipeptídeo compreende uma molécula de ligação, uma enzima, uma citocina, uma linfocina, um peptídeo hormonal ou qualquer combinação destes.

36. Anticorpo ou seu fragmento, de acordo com a reivindicação 34, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o agente citotóxico compreende um radionuclídeo, uma toxina biológica, uma toxina enzimaticamente ativa ou qualquer combinação destes.

37. Anticorpo ou seu fragmento, de acordo com a reivindicação 34, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a marcação detectável compreende uma enzima, uma marcação fluorescente, uma marcação quimioluminescente, uma marcação bioluminescente, uma marcação radioativa ou qualquer combinação destes.

38. Composição **CARACTERIZADA** pelo fato de que compreende o anticorpo ou seu fragmento, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 37, e um carreador.

39. Polinucleotídeo isolado ou combinação de polinucleotídeos **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende uma ou mais sequências de ácidos nucleicos que codificam o anticorpo ou seu fragmento, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 37, ou uma subunidade dele.

40. Polinucleotídeo ou combinação de polinucleotídeos, de acordo com a reivindicação 39, **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende uma sequência de ácido nucleico que codifica a VH do anticorpo ou seu fragmento.

41. Polinucleotídeo ou combinação de polinucleotídeos, de acordo com a reivindicação 39, **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende uma sequência de ácido nucleico que codifica a VL do anticorpo ou seu fragmento.

42. Polinucleotídeo ou combinação de polinucleotídeos, de acordo com a reivindicação 39, **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende uma sequência de

ácido nucleico que codifica a VH e uma sequência de ácido nucleico que codifica a VL do anticorpo ou seu fragmento.

43. Polinucleotídeo ou combinação de polinucleotídeos, de acordo com a reivindicação 42, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a sequência de ácido nucleico que codifica VH e a sequência de ácido nucleico que codifica VL estão situadas no mesmo vetor.

44. Vetor de acordo com a reivindicação 43.

45. Polinucleotídeo ou combinação de polinucleotídeos, de acordo com a reivindicação 42, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a sequência de ácido nucleico que codifica VH e a sequência de ácido nucleico que codifica VL estão situadas em vetores separados.

46. Vetores de acordo com a reivindicação 45.

47. Vetor ou vetores de acordo com a reivindicação 44 ou reivindicação 46, **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende ainda elementos genéticos para permitir a expressão do anticorpo ou seu fragmento.

48. Célula hospedeira **CARACTERIZADA** pelo fato de que compreende o polinucleotídeo ou combinação de polinucleotídeos de acordo com qualquer uma das reivindicações 39 a 43 ou 45, ou o vetor ou vetores de acordo com a reivindicação 44 ou reivindicação 46.

49. Método para produzir o anticorpo ou seu fragmento, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 37, **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende a cultura da célula hospedeira da reivindicação 48 e a recuperação do anticorpo ou fragmento deles.

50. Método para neutralizar SEMA4D em um sujeito humano, **CARACTERIZADO** pelo fato de compreender a administração ao sujeito humano do anticorpo ou seu fragmento, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 37 ou a composição da reivindicação 38.

51. Método de acordo com a reivindicação 50, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o sujeito humano precisa de tratamento para uma doença ou distúrbio autoimune, uma doença ou distúrbio inflamatório, câncer, uma doença ou distúrbio neuroinflamatório, uma doença ou distúrbio neurodegenerativo ou qualquer combinação destes.

52. Método, de acordo com a reivindicação 51, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a doença ou distúrbio neuroinflamatório é esclerose múltipla.

53. Método de acordo com a reivindicação 51, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a doença ou distúrbio neurodegenerativo é acidente vascular cerebral, doença de Alzheimer, doença de Parkinson, doença de Huntington, síndrome de Down, ataxia, esclerose lateral amiotrófica (ELA), demência frontotemporal (DFT), comprometimento cognitivo relacionado ao HIV, lúpus do SNC, comprometimento cognitivo leve ou uma combinação deles.

54. Método, de acordo com a reivindicação 51, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a doença autoimune ou a doença inflamatória é artrite.

55. Método, de acordo com a reivindicação 54, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a doença autoimune ou a doença inflamatória é artrite reumatoide.

FIGURA 1

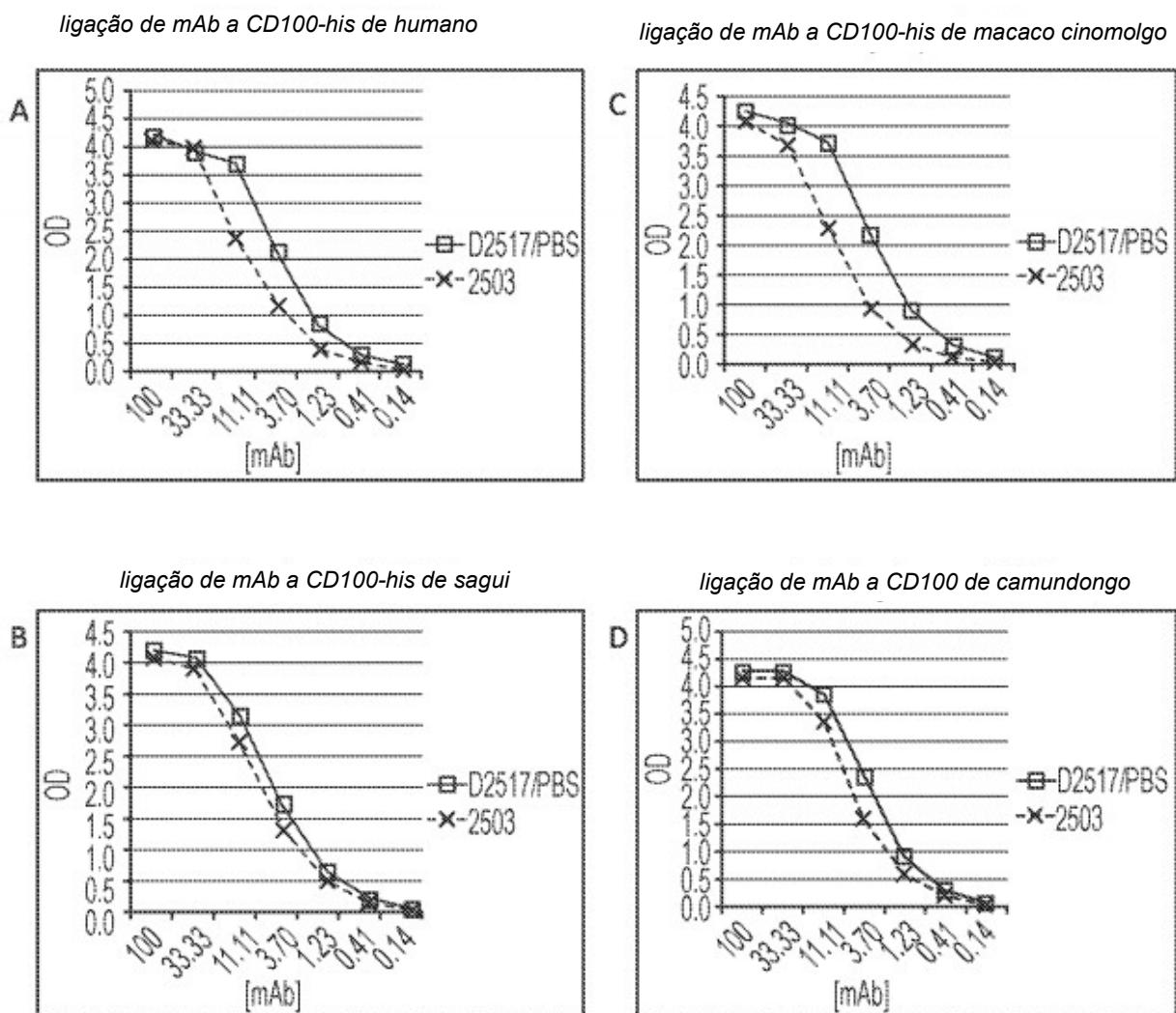
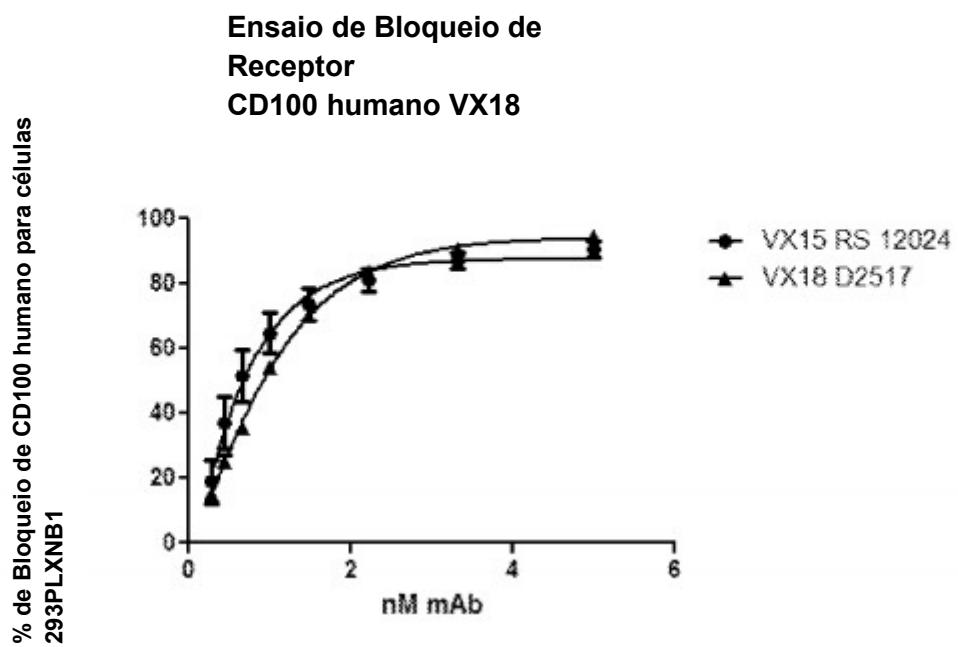
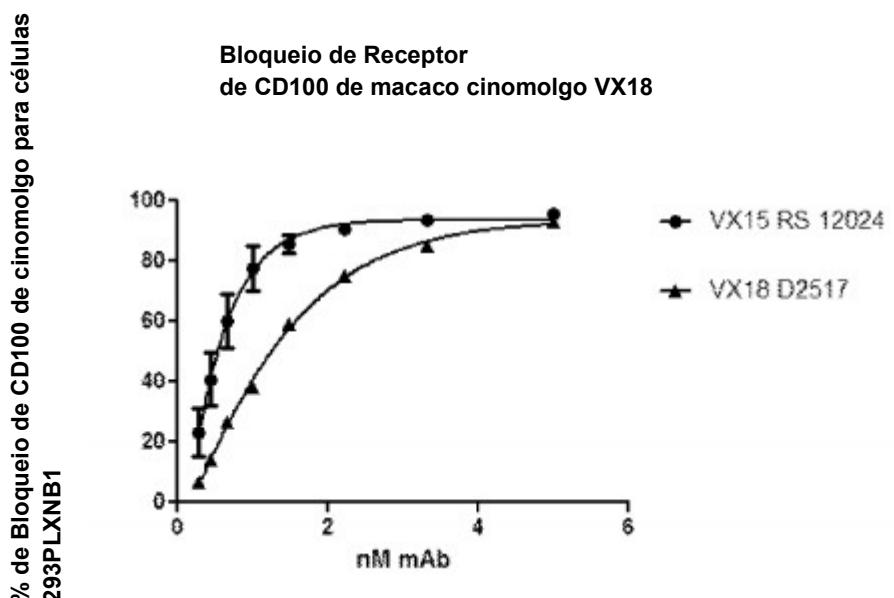
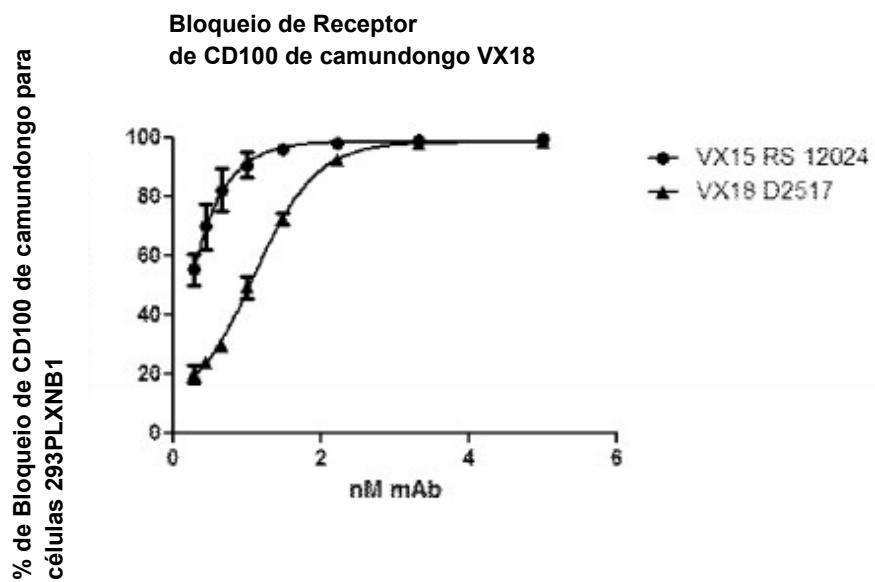
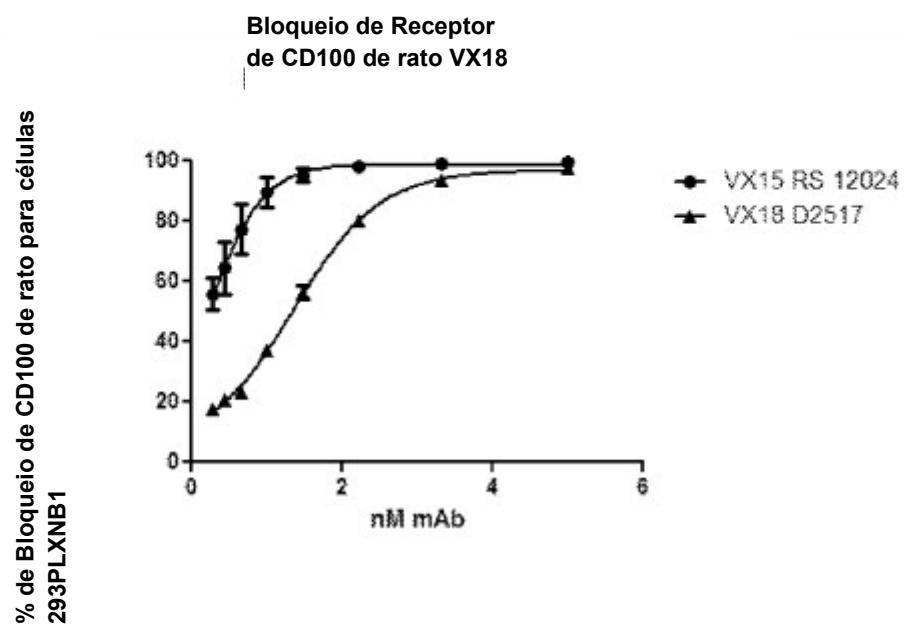


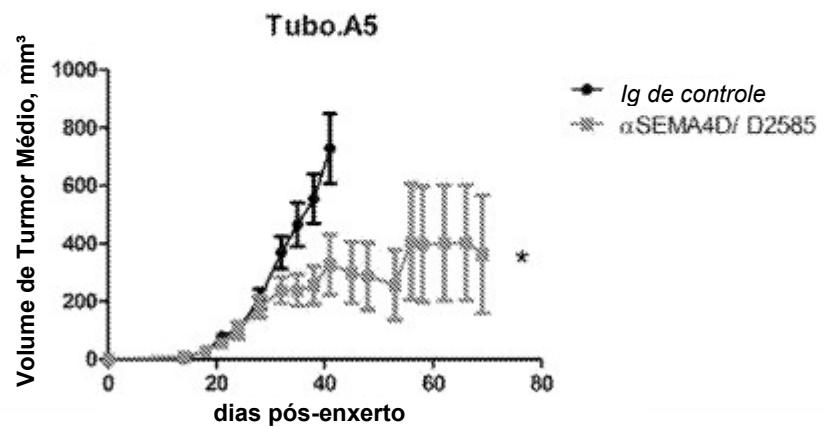
FIGURA 2A

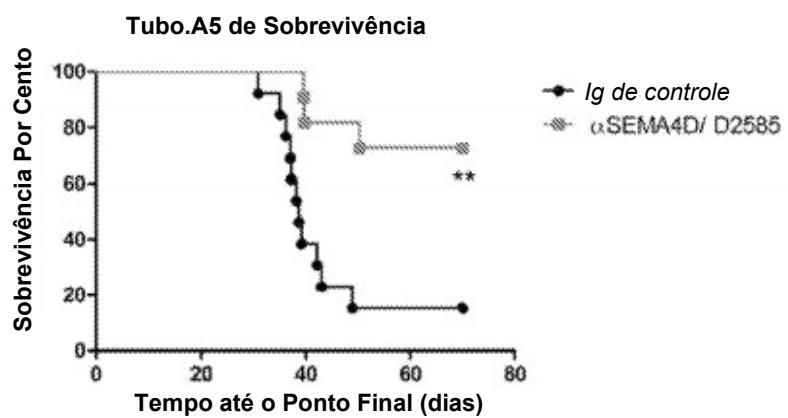


**FIGURA 2B**

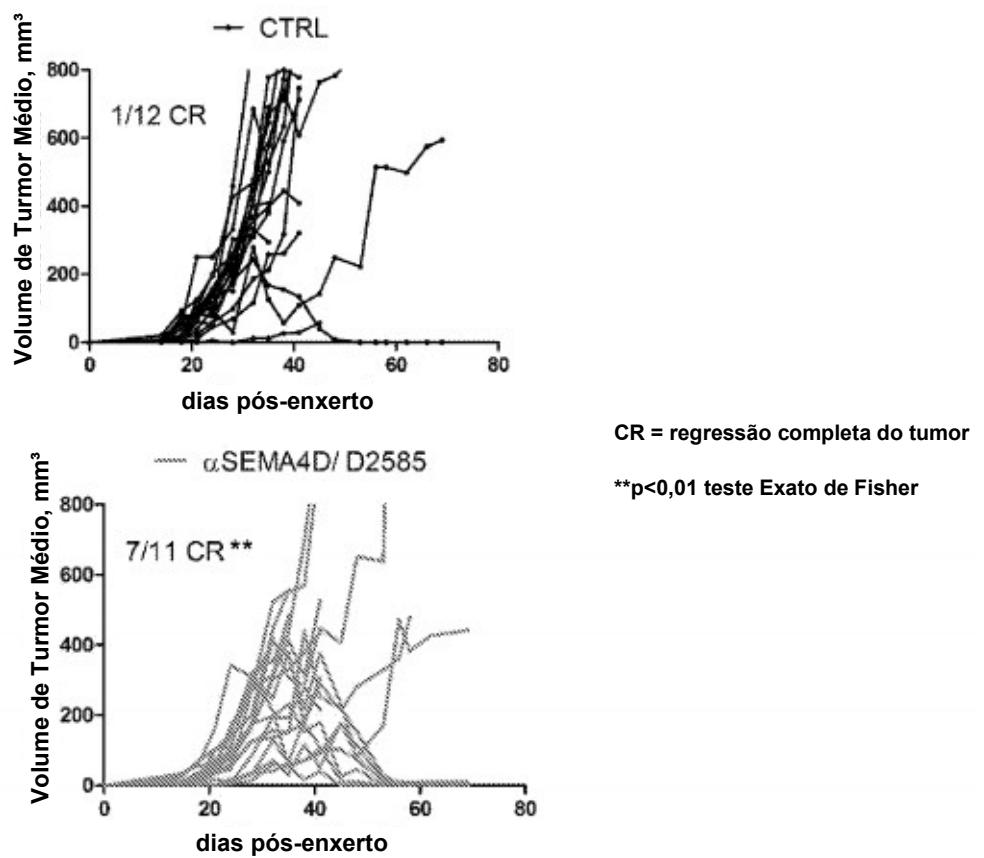
**FIGURA 2C**

**FIGURA 2D**

**FIGURA 3A**

**FIGURA 3B**

### FIGURA 3C



## RESUMO

### **“ANTICORPO 4D ANTI-SEMAFORINA HUMANO”**

São fornecidas composições e métodos para o tratamento de doenças associadas à patologia de semaforina-4D (SEMA4D), incluindo doenças autoimunes, doenças inflamatórias, cânceres, distúrbios neuroinflamatórios e doenças neurodegenerativas.

Este anexo apresenta o código de controle da listagem de sequências biológicas.

**Código de Controle**

Campo 1



Campo 2



**Outras Informações:**

- Nome do Arquivo: 196.595-6 Listagem de sequências OK.txt
- Data de Geração do Código: 04/11/2019
- Hora de Geração do Código: 17:02:54
- Código de Controle:
  - Campo 1: 3B7E309B0D8611B8
  - Campo 2: 7658CB811A38B9F5