

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2017-193569

(P2017-193569A)

(43) 公開日 平成29年10月26日(2017.10.26)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 Z N A N	4 C 0 8 4
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	4 C 0 8 5
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00 1 1 1	
A 6 1 P 25/00 (2006.01)	A 6 1 P 25/00	
A 6 1 P 21/00 (2006.01)	A 6 1 P 21/00	

審査請求 有 請求項の数 17 O L 外国語出願 (全 45 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2017-129377 (P2017-129377)	(71) 出願人	504455148
(22) 出願日	平成29年6月30日 (2017. 6. 30)		バクシネックス インコーポレーティッド
(62) 分割の表示	特願2014-535877 (P2014-535877) の分割		アメリカ合衆国 ニューヨーク州 ロチェ スター マウント ホープ アベニュー 1 8 9 5
原出願日	平成24年10月11日 (2012.10.11)	(74) 代理人	100102978
(31) 優先権主張番号	61/545, 809		弁理士 清水 初志
(32) 優先日	平成23年10月11日 (2011.10.11)	(74) 代理人	100102118
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 春名 雅夫
(31) 優先権主張番号	61/555, 726	(74) 代理人	100160923
(32) 優先日	平成23年11月4日 (2011.11.4)		弁理士 山口 裕孝
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100119507
(31) 優先権主張番号	61/593, 641		弁理士 刑部 俊
(32) 優先日	平成24年2月1日 (2012.2.1)	(74) 代理人	100142929
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 井上 隆一

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 血液脳関門透過性の調節のためのセマフォリン-4 D 結合分子の使用

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】神経炎症性障害を有する対象において血液脳関門透過性を低下させる方法の提供。

【解決手段】セマフォリン-4D (SEMA4D) またはその高親和性プレキシシン-B1受容体に特異的に結合する単離された結合分子の有効量を該対象に投与する、方法。神経炎症性障害を有する対象において、クローディン-5の発現を維持するか又は増加させるのに、SEMA4Dに特異的に結合する結合分子。SEMA4Dのプレキシシン-B1との相互作用を阻害する方法。SEMA4D受容体がプレキシシン-B1であり、VX15/2503又は67から選択されるモノクローナル抗体がSEMA4Dに特異的に結合する、方法。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

神経炎症性障害を有する対象において血液脳関門透過性を低下させる方法であって、セマフォリン-4D (SEMA4D) に特異的に結合する単離された結合分子の有効量を該対象に投与する段階を含み、それにより該対象において血液脳関門透過性を低下させる、方法。

【請求項 2】

神経炎症性障害を有する対象においてクローディン-5の発現を維持するかまたは増加させる方法であって、セマフォリン-4D (SEMA4D) に特異的に結合する単離された結合分子の有効量を該対象に投与する段階を含み、該結合分子が該対象においてクローディン-5の発現を維持するかまたは増加させる、方法。

10

【請求項 3】

結合分子が、SEMA4Dのプレキシシン-B1との相互作用を阻害する、請求項1または2記載の方法。

【請求項 4】

神経炎症性障害を有する対象において血液脳関門透過性を低下させる方法であって、セマフォリン4D (SEMA4D) のSEMA4D受容体との相互作用を特異的に阻害する単離された結合分子の有効量を該対象に投与する段階を含み、それにより該対象において血液脳関門透過性を低下させる、方法。

【請求項 5】

神経炎症性障害を有する対象を処置する方法であって、セマフォリン4D (SEMA4D) のSEMA4D受容体との相互作用を特異的に阻害する単離された結合分子の有効量を該対象に投与する段階を含み、該結合分子が血液脳関門の透過性を低下させ、それにより該対象を処置する、方法。

20

【請求項 6】

SEMA4D受容体がプレキシシン-B1である、請求項4または5記載の方法。

【請求項 7】

結合分子が、SEMA4Dまたはプレキシシン-B1に特異的に結合する、請求項4～6のいずれか一項記載の方法。

【請求項 8】

VX15/2503または67からなる群より選択される参照モノクローナル抗体がSEMA4Dに特異的に結合することを、前記結合分子が競合的に阻害する、請求項1～7のいずれか一項記載の方法。

30

【請求項 9】

神経炎症性障害を有する対象において血液脳関門透過性を低下させる方法であって、SEMA4Dに特異的に結合する単離された結合分子の有効量を該対象に投与する段階を含み、VX15/2503または67からなる群より選択される参照モノクローナル抗体がSEMA4Dに特異的に結合することを、該結合分子が競合的に阻害し、それにより該対象において血液脳関門透過性を低下させる、方法。

【請求項 10】

結合分子が、VX15/2503または67からなる群より選択される参照モノクローナル抗体と同一のSEMA4Dエピトープに特異的に結合する、請求項1～9のいずれか一項記載の方法。

40

【請求項 11】

結合分子が、抗体またはその抗原結合断片を含む、請求項1～10のいずれか一項記載の方法。

【請求項 12】

抗体またはその抗原結合断片が、SEQ ID NO 6、7、および8をそれぞれ含むVHCDR1～3を含む可変重鎖 (VH)、ならびに、SEQ ID NO 14、15、および16をそれぞれ含むVLCDR1～3を含む可変軽鎖 (VL) を含む、請求項11記載の方法。

【請求項 13】

抗体またはその抗原結合断片が、モノクローナル抗体VX15/2503または67である、請求

50

項12記載の方法。

【請求項 14】

結合分子が、プレキシン-B1に特異的に結合する、請求項7記載の方法。

【請求項 15】

SEMA4Dがプレキシン-B1に結合することを、前記結合分子が競合的に阻害する、請求項14記載の方法。

【請求項 16】

結合分子が、抗プレキシン-B1抗体またはその抗原結合断片である、請求項14または15記載の方法。

【請求項 17】

神経炎症性障害を有する対象を処置する方法であって、セマフォリン-4D (SEMA4D) に特異的に結合する単離された結合分子およびプレキシン-B1に特異的に結合する単離された結合分子の有効量を該対象に投与する段階を含み、該SEMA4D結合分子およびプレキシン-B1結合分子が血液脳関門の透過性を低下させ、それにより該対象を処置する、方法。

【請求項 18】

神経炎症性障害を有する対象を処置する方法であって、セマフォリン4D (SEMA4D) のSEMA4D受容体との相互作用の阻害物質の有効量を該対象に投与する段階を含み、該阻害物質が血液脳関門の透過性を低下させ、それにより該対象を処置する、方法。

【請求項 19】

阻害物質が、抗SEMA4D結合分子、抗プレキシンB1結合分子、SEMA4Dの低分子阻害物質、またはSEMA4D受容体の低分子阻害物質からなる群より選択される、請求項18記載の方法。

【請求項 20】

神経炎症性障害が、多発性硬化症、筋萎縮性側索硬化症、てんかん、アルツハイマー病、パーキンソン病、髄膜炎、脳浮腫、および脳外傷からなる群より選択される、請求項1~19のいずれか一項記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

電子的に提示した配列表の参照

本出願とともに提出したASCIIテキストファイル（名称："1843_068PC03_SequenceList ing_ascii.txt"；サイズ：33,807バイト；および作成日：2012年10月10日）における電子的に提示した配列表の内容は、全体として参照により本明細書に組み入れられる。

【背景技術】

【0002】

発明の背景

CD100としても公知であるセマフォリン4D (SEMA4D) は、セマフォリン遺伝子ファミリーに属する膜貫通タンパク質である（例えば、SEQ ID NO: 1 (ヒト)；SEQ ID NO: 2 (マウス)）。SEMA4Dは、ホモ二量体として細胞表面上に発現しているが、細胞活性化時に、SEMA4Dは、タンパク質分解性切断を介して細胞表面から放出されて、タンパク質の可溶型であるsSEMA4Dを生成することができ、これもまた生物学的に活性を有する。例えば、Suzuki et al., Nature Rev. Immunol. 3:159-167 (2003) (非特許文献1)；Kikutani et al., Nature Immunol. 9:17-23 (2008) (非特許文献2)を参照されたい。

【0003】

SEMA4Dは、脾臓、胸腺、およびリンパ節を含むリンパ系器官において、ならびに、脳、心臓、および腎臓などの非リンパ系器官において高レベルで発現している。リンパ系器官において、SEMA4Dは、休止T細胞上に豊富に発現しているが、休止B細胞、および樹状細胞 (DC) などの抗原提示細胞 (APC) 上には弱くしか発現していない。しかしながら、その発現は、種々の免疫学的刺激による活性化後にこれらの細胞において上方制御される。免疫細胞からの可溶性SEMA4Dの放出もまた、細胞活性化により増加する。

【0004】

10

20

30

40

50

SEMA4Dは、神経変性疾患、自己免疫疾患、脱髄性疾患、およびある特定の癌の発生に関係している。その受容体、例えばプレキシン-B1を通したSEMA4Dシグナル伝達の血管形成に対する役割は、よく認識されているが、SEMA4Dシグナル伝達の血液脳関門（BBB）に対する作用は、不明のままである。BBBの透過性の変化は、脳組織および機能に対して甚大な影響を有するため、これは重要である。従って、BBBの崩壊の結果として生じる神経炎症性障害のための処置、および特に、BBBの崩壊を阻害、抑制、予防、逆転、または緩徐化する治療論の必要が残っている。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0005】

10

【非特許文献1】Suzuki et al., Nature Rev. Immunol. 3:159-167 (2003)

【非特許文献2】Kikutani et al., Nature Immunol. 9:17-23 (2008)

【発明の概要】

【0006】

血液脳関門透過性の調節のためにセマフォリン-4d結合分子を用いる方法を本明細書において開示する。SEMA4DがBBBの完全性を損ない、それによりその透過性を増大させ得ることを実証する証拠を提示する。本明細書において例証される本発明の局面に従って、神経炎症性障害を有する対象において血液脳関門透過性を低下させる方法であって、セマフォリン-4D（SEMA4D）に特異的に結合する単離された結合分子の有効量を該対象に投与する段階を含み、それにより該対象において血液脳関門透過性を低下させる方法が、提供される。

20

【0007】

本明細書において例証される局面に従って、神経炎症性障害を有する対象においてクロードイン-5の発現を維持するかまたは増加させる方法であって、セマフォリン-4D（SEMA4D）に特異的に結合する単離された結合分子の有効量を該対象に投与する段階を含み、該結合分子が該対象においてクロードイン-5の発現を維持するかまたは増加させる方法が、提供される。

【0008】

本明細書において例証される局面に従って、神経炎症性障害を有する対象において血液脳関門透過性を低下させる方法であって、セマフォリン4D（SEMA4D）のSEMA4D受容体との相互作用を特異的に阻害する単離された結合分子の有効量を該対象に投与する段階を含み、それにより該対象において血液脳関門透過性を低下させる方法が、提供される。

30

【0009】

本明細書において例証される局面に従って、神経炎症性障害を有する対象を処置する方法であって、セマフォリン4D（SEMA4D）のSEMA4D受容体との相互作用を特異的に阻害する単離された結合分子の有効量を該対象に投与する段階を含み、該結合分子が血液脳関門の透過性を低下させ、それにより該対象を処置する方法が、提供される。

【0010】

本明細書において例証される局面に従って、神経炎症性障害を有する対象において血液脳関門透過性を低下させる方法であって、SEMA4Dに特異的に結合する単離された結合分子の有効量を該対象に投与する段階を含み、該結合分子が、VX15/2503または67からなる群より選択される参照モノクローナル抗体がSEMA4Dに特異的に結合することを競合的に阻害する方法が、提供される。

40

【0011】

本明細書において例証される局面に従って、神経炎症性障害を有する対象を処置する方法であって、セマフォリン-4D（SEMA4D）に特異的に結合する単離された結合分子およびプレキシン-B1に特異的に結合する単離された結合分子の有効量を該対象に投与する段階を含み、該SEMA4D結合分子およびプレキシン-B1結合分子が血液脳関門の透過性を低下させ、それにより該対象を処置する方法が、提供される。

【0012】

50

本明細書において例証される局面に従って、神経炎症性障害を有する対象を処置する方法であって、セマフォリン4D (SEMA4D) のSEMA4D受容体との相互作用の阻害物質の有効量を該対象に投与する段階を含み、該阻害物質が血液脳関門の透過性を低下させ、それにより該対象を処置する方法が、提供される。

【図面の簡単な説明】

【0013】

【図1】実施例に記載される動的インビトロBBB (「DIV-BBB」) 実験プロトコルの概略図。

【図2】組み換えSEMA4D (0.05、0.5、5、または50 $\mu\text{g/mL}$) およびVX15/2503抗体 (「VX15」) の存在下での、経内皮電気抵抗 (TEER) に反映されるBBB完全性の測定値を示す、インビトロDIV-BBBモデル。

10

【図3】BBBの形成中、組み換えSEMA4D (0.5、5、または50 $\mu\text{g/mL}$) の存在下でのBBBの崩壊中、およびVX15/2503抗体 (「VX15」) の存在下では起きるがアイソタイプ対照 (「Iso」) では起きないBBBの回復中の、経内皮電気抵抗 (TEER) に反映されるBBB完全性の測定値を示す、インビトロDIV-BBBモデル。

【図4】BBBの形成中、0.25、2.5、または25 $\mu\text{g/mL}$ の対照C35抗原 (「CTRL」) または50 $\mu\text{g/mL}$ の組み換えSEMA4Dの存在下でのBBBの崩壊中、およびVX15/2503抗体 (「VX15」) の存在下でのBBBの回復中の、経内皮電気抵抗 (TEER) に反映されるBBB完全性の測定値を示す、インビトロDIV-BBBモデル。

【図5】BBBの形成中、組み換えSEMA4D (50 $\mu\text{g/mL}$) の存在下でのBBBの崩壊中、およびVX15/2503抗体 (「VX15」)、抗プレキシシン-B1抗体 (「抗PLXNB1」) の存在下では起きるがアイソタイプ対照 (「Iso」) では起きないBBBの回復中の、経内皮電気抵抗 (TEER) に反映されるBBB完全性の測定値を示す、インビトロDIV-BBBモデル。

20

【図6】BBBの形成中、活性化PBMC ($10^6/\text{ml}$) およびフロー停止の存在下でのBBBの崩壊中、およびVX15/2503抗体またはアイソタイプ対照IgGの存在下でのBBBの回復中の、経内皮電気抵抗 (TEER) に反映されるBBB完全性の測定値を示す、インビトロDIV-BBBモデル。

【図7】VX15/2503抗体 (「抗SEMA4D」) またはアイソタイプ対照 (「対照IgG」) での処置後の、脳組織中へのフィブリノーゲン (「Fib.+」) 浸透 (図7Aの左パネルおよび図7Bにおける定量化) ならびに赤色染色により検出されるクロードイン-5 (「CLN5+」) 発現 (図7Aの右パネルおよび図7Cにおける定量化) の免疫染色によって反映されるBBBの完全性またはその損失を示す、インビボEAEモデル由来の結果。

30

【図8】初代マウス中枢神経系 (CNS) 内皮培養物においてVEGF-A陽性対照と比較した、鍵となる内皮密着結合タンパク質クロードイン-5 (「CLN-5」) の発現に対する、増大する濃度の組み換えSEMA4D (1ng/ml、10ng/ml、および100ng/ml) の作用を示す、免疫プロットの結果。

【発明を実施するための形態】

【0014】

発明の詳細な説明

I. 定義

「1つの」 (「a」または「an」) 実体という用語は、1つまたは複数のその実体を指し ; 例えば、「抗SEMA4D抗体 (an anti-SEMA4D antibody)」は、1つまたは複数の抗SEMA4D抗体を表すように理解されることに、注意されたい。そのように、「1つの」、「1つまたは複数の」、および「少なくとも1つの」という用語は、本明細書において互換的に使用することができる。

40

【0015】

「血液脳関門」および「BBB」という用語は互換的に使用されることに注意されたい。

【0016】

本明細書において使用される際、「血液脳関門崩壊」、「血液脳関門破壊」、「血液脳関門の崩壊」、または「血液脳関門の破壊」などの、BBBに関する「崩壊」または「破壊」という用語は、血液脳関門の透過性の増大を指し、または、BBBのヒト化動的インビト

50

ロモデルである「DIV-BBB」の場合は、経内皮電気抵抗 (TEER) の低下を指す。McCallister et al., Brain Res. 904:20-30 (2001); Santaguida et al., Brain Res. 1109:1-13 (2006); およびCucullo et al., Epilepsia 48:505-16 (2007)は、DIV-BBBにおいてTEERと透過性との間に直接 (逆の) 関連があることを示している。さらに、血液脳関門の透過性の増大または電気抵抗の低下は、BBB上に存在する内皮細胞の数、密度、および / もしくは濃度の低下; または、BBBを形成する内皮細胞もしくは正常細胞の間での、または内皮細胞と星状細胞との間の、形態または相互作用の変化の結果であり得る。

【 0 0 1 7 】

本明細書において使用される際、「血液脳関門回復」または「血液脳関門の回復」などの、BBBに関する「回復」という用語は、血液脳関門の透過性の低下を指し、または、BBBのヒト化動的インビトロモデルであるDIV-BBBの場合は、経内皮電気抵抗の増大を指す。

【 0 0 1 8 】

本明細書において使用される際、「神経炎症性障害」という用語は、中枢神経系 (CNS) 炎症性障害、神経変性障害、中枢神経系の自己免疫障害、オリゴデンドロサイトに影響を及ぼすミエリン障害もしくは疾患、または中枢神経系の外傷後ミエリン障害を指す。神経炎症性障害はしばしば神経変性障害でもあることに注意されたい。しかしながら、神経変性障害は、明らかな神経炎症が無く存在することが可能である。例えば、後期の二次進行性多発性硬化症は、この例である。

【 0 0 1 9 】

「治療的有効量」という用語は、対象または哺乳動物において疾患または障害を「処置する」ために有効である、抗体、ポリペプチド、ポリヌクレオチド、有機小分子、または他の薬物の量を指す。神経炎症性障害の場合、治療的有効量の薬物は、BBBの透過性を低下させることができ; BBB透過性の増大を低減、妨害、または停止することができ; BBBの増大した透過性を阻害、例えば、抑制、妨害、予防、停止、または逆転することができ; BBB上に存在する内皮細胞の数、密度、および / もしくは濃度; 内皮細胞の形態もしくは機能における変化; または、BBBを形成する内皮細胞もしくは正常細胞の間での、または内皮細胞と星状細胞との間の相互作用における変化を増加させることができ; 増大したBBB透過性と関連する1つまたは複数の症候、例えば神経炎症性障害をある程度まで和らげることができ; 罹患率および死亡率を低減させることができ; 生活の質を改善することができ; またはそのような作用の組み合わせをもたらす。

【 0 0 2 0 】

「処置」(「treating」もしくは「treatment」もしくは「to treat」) または「緩和」(「alleviating」もしくは「to alleviate」) などの用語は、1) 診断された病理学的状態または障害を治療する、それを減速させる、その症候を減少させる、それを逆転する、および / またはその進行を停止させる治療的手段、ならびに2) 標的とした病理学的状態または障害を予防する、および / またはその発症を緩徐化する防御的手段または予防的手段の両方を指す。従って、処置を必要とする人々は、既に障害を有する人々; 障害を有する傾向がある人々; および障害が予防されるべき人々を含む。有益なまたは望ましい臨床結果は、検出可能であろうとまたは検出不可能であろうと、症候の緩和、疾患の程度の縮小、疾患の状態の安定化 (すなわち悪化させないこと)、疾患進行の遅延または緩徐化、疾患状態の改善または一時的緩和、および寛解 (部分的であろうとまたは全体的であろうと) を含むが、これらに限定されない。「処置」とはまた、処置を受けていない場合に期待される生存と比較した際に延長した生存も意味することができる。処置を必要とする人々は、既に状態もしくは障害を有する人々、および、状態もしくは障害を有する傾向がある人々、または、状態もしくは障害が予防されるべき人々を含む。

【 0 0 2 1 】

「対象」または「個体」または「動物」または「患者」または「哺乳動物」により、それについて診断、予後診断、または治療が望ましい任意の対象、特に、哺乳動物対象が意味される。哺乳動物対象は、ヒト、家庭内の動物、農場の動物、および、動物園、スポーツ、またはペットの動物、例えば、イヌ、ネコ、モルモット、ウサギ、ラット、マウス、

10

20

30

40

50

ウマ、ウシ、雌ウシ、クマなどを含む。

【0022】

本明細書において使用される際、「抗SEMA4D抗体の投与から恩恵を受けるであろう対象」および「処置を必要とする動物」などの句は、例えば、SEMA4Dポリペプチドの検出のために（例えば診断手順のために）使用される抗SEMA4D抗体もしくは他のSEMA4D結合分子の投与から、および／または、抗SEMA4D抗体もしくは他のSEMA4D結合分子での処置、すなわち、疾患の軽減または予防から恩恵を受けるであろう、哺乳動物対象などの対象を含む。

【0023】

本発明の「結合分子」または「抗原結合分子」は、その最も広い意味において、抗原決定基に特異的に結合する分子を指す。1つの態様において、結合分子は、SEMA4Dに、例えば、約150 kDaの膜貫通SEMA4Dポリペプチドまたは約120 kDaの可溶性SEMA4Dポリペプチド（一般的にsSEMA4Dと呼ばれる）に特異的に結合する。別の態様において、本発明の結合分子は、抗体またはその抗原結合断片である。別の態様において、本発明の結合分子は、抗体分子の少なくとも1個の重鎖CDRまたは軽鎖CDRを含む。別の態様において、本発明の結合分子は、1種または複数の抗体分子由来の少なくとも2個のCDRを含む。別の態様において、本発明の結合分子は、1種または複数の抗体分子由来の少なくとも3個のCDRを含む。別の態様において、本発明の結合分子は、1種または複数の抗体分子由来の少なくとも4個のCDRを含む。別の態様において、本発明の結合分子は、1種または複数の抗体分子由来の少なくとも5個のCDRを含む。別の態様において、本発明の結合分子は、1種または複数の抗体分子由来の少なくとも6個のCDRを含む。

10

20

【0024】

本出願は、神経炎症性障害（例えば、多発性硬化症、筋萎縮性側索硬化症、てんかん、アルツハイマー病、パーキンソン病、髄膜炎、脳浮腫、脳外傷、および卒中）を有する対象において血液脳関門透過性を低下させる方法であって、抗SEMA4D結合分子、抗プレキシシンB1結合分子、またはこれらの組み合わせを該対象に投与する段階を含む方法に向けられる。

【0025】

本明細書において使用される際、「抗SEMA4D結合分子」または「抗プレキシシンB1結合分子」とは、抗体、またはその抗原結合断片、変異体、もしくは誘導体を指す。天然に存在する抗体などの完全なサイズの抗体に具体的に言及しない限り、「抗SEMA4D抗体」または「抗プレキシシンB1抗体」という用語は、完全なサイズの抗体、およびそのような抗体の抗原結合断片、変異体、類似体、または誘導体、例えば、天然に存在する抗体、または免疫グロブリン分子、または工学により作製された抗体分子、または抗体分子と類似した様式で抗原に結合する断片を包含する。

30

【0026】

本明細書において使用される際、「SEMA4DのSEMA4D受容体との相互作用の阻害物質」とは、「抗SEMA4D結合分子」、「抗プレキシシンB1結合分子」、およびSEMA4DまたはSEMA4D受容体の低分子阻害物質を指す。

【0027】

本明細書において使用される際、「ヒト」抗体または「完全ヒト」抗体は、ヒト免疫グロブリンのアミノ酸配列を有する抗体を含み、ヒト免疫グロブリンライブラリーから、または、下記および例えばKucherlapatiらによる米国特許第5,939,598号に記載されるような、1種または複数のヒト免疫グロブリンの遺伝子導入であり、かつ内在性免疫グロブリンを発現しない動物から単離された抗体を含む。「ヒト」抗体または「完全ヒト」抗体は、少なくとも重鎖の可変ドメイン、または少なくとも重鎖および軽鎖の可変ドメインを含み、該可変ドメインがヒト免疫グロブリン可変ドメインのアミノ酸配列を有する抗体もまた含む。

40

【0028】

「ヒト」抗体または「完全ヒト」抗体は、本明細書において記載される抗体分子（例えば、VH領域および／またはVL領域）の変異体（誘導体を含む）を含むか、それらから本質

50

的になるか、またはそれらからなり、抗体またはその断片がSEMA4Dポリペプチドまたはその断片もしくは変異体に免疫特異的に結合する、上記のような「ヒト」抗体または「完全ヒト」抗体もまた含む。アミノ酸置換を結果として生じる部位特異的変異誘発およびPCR媒介変異誘発を含むがこれらに限定されない、当業者に公知である標準的な技術を、ヒト抗SEMA4D抗体をコードするヌクレオチド配列中に変異を導入するために使用することができる。好ましくは、変異体（誘導体を含む）は、参照VH領域、VHCDR1、VHCDR2、VHCDR3、VL領域、VLCDR1、VLCDR2、またはVLCDR3に対して、50アミノ酸未満の置換、40アミノ酸未満の置換、30アミノ酸未満の置換、25アミノ酸未満の置換、20アミノ酸未満の置換、15アミノ酸未満の置換、10アミノ酸未満の置換、5アミノ酸未満の置換、4アミノ酸未満の置換、3アミノ酸未満の置換、または2アミノ酸未満の置換をコードする。

10

【0029】

ある特定の態様において、アミノ酸置換は、下記でさらに議論される保存的アミノ酸置換である。あるいは、変異を、飽和変異誘発などにより、コード配列のすべてまたは一部に沿って無作為に導入することができ、結果として生じた変異体を、活性（例えば、SEMA4Dポリペプチド、例えば、ヒト、マウス、またはヒトおよびマウス両方のSEMA4Dに結合する能力）を保持する変異体を同定するために生物学的活性についてスクリーニングすることができる。「ヒト」抗体または「完全ヒト」抗体のそのような変異体（またはその誘導体）は、「最適化された」または「抗原結合について最適化された」ヒト抗体または完全ヒト抗体と呼ぶこともでき、抗原に対して改善された親和性を有する抗体を含む。

20

【0030】

「抗体」および「免疫グロブリン」という用語は、本明細書において互換的に使用される。抗体または免疫グロブリンは、少なくとも重鎖の可変ドメインを含み、通常、少なくとも重鎖および軽鎖の可変ドメインを含む。脊椎動物系における基本的な免疫グロブリン構造は、比較的よく理解されている。例えば、Harlow et al. (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual* (2nd ed.; Cold Spring Harbor Laboratory Press)を参照されたい。

【0031】

本明細書において使用される際、「免疫グロブリン」という用語は、生化学的に区別することができる種々の広範なクラスのポリペプチドを含む。当業者は、重鎖が、ガンマ、ミュー、アルファ、デルタ、またはイプシロン（ γ 、 μ 、 α 、 δ 、 ϵ ）として、それらの中にいくつかのサブクラス（例えば 1～4）を伴って分類されることを認識するであろう。抗体の「クラス」をそれぞれIgG、IgM、IgA、IgG、またはIgEと決定することが、この鎖の性質である。免疫グロブリンのサブクラス（アイソタイプ）、例えば、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1などは、十分に特徴決定されており、機能的特殊化を与えることが公知である。これらのクラスおよびアイソタイプの各々の修飾バージョンは、本開示を考慮して当業者が容易に識別可能であり、従って、本発明の範囲内である。すべての免疫グロブリンクラスが、明らかに本発明の範囲内であり、以下の議論は概して、IgGクラスの免疫グロブリン分子に向けられる。IgGに関して、標準的な免疫グロブリン分子は、分子量およそ23,000ダルトンの2個の同一の軽鎖ポリペプチド、および分子量53,000～70,000の2個の同一の重鎖ポリペプチドを含む。4本の鎖は典型的に、ジスルフィド結合により「Y」形態に連結され、軽鎖が、「Y」の口部から始まり可変領域を通して連続して、重鎖をひとまとめにする。

30

40

【0032】

軽鎖は、カッパまたはラムダ（ κ 、 λ ）のいずれかとして分類される。各重鎖のクラスは、軽鎖または軽鎖のいずれと結合してもよい。概して、免疫グロブリンがハイブリドーマ、B細胞、または遺伝子工学により作製された宿主細胞のいずれかにより生成される際、軽鎖および重鎖は互いに共有結合し、かつ2個の重鎖の「尾」部分は、共有ジスルフィド結合または非共有結合により互いに結合している。重鎖において、アミノ酸配列は、Y形態の叉状端のN末端から各鎖の底部のC末端までおよぶ。

【0033】

軽鎖および重鎖の両方は、構造的および機能的な相同性の領域に分割される。「定常」

50

および「可変」という用語は、機能的に使用される。この点において、軽鎖の可変ドメイン（VLまたはVK）および重鎖の可変ドメイン（VH）両方の部分は、抗原認識および特異性を決定することが、認識されるであろう。逆に、軽鎖の定常ドメイン（CL）および重鎖の定常ドメイン（CH1、CH2、またはCH3）は、分泌、経胎盤移動性、Fc受容体結合、補体結合などのような重要な生物学的特性を与える。慣例により、定常領域ドメインのナンバリングは、抗体の抗原結合部位またはアミノ末端からより遠くなるにつれて増大する。N末端部分が可変領域であり、C末端部分が定常領域である；CH3ドメインおよびCLドメインは、それぞれ重鎖および軽鎖のカルボキシ末端を実際を含む。

【0034】

上記に示されるように、可変領域は、抗体が抗原上のエピトープを選択的に認識し、かつ特異的に結合することを可能にする。すなわち、抗体のVLドメインおよびVHドメイン、またはこれらの可変ドメイン内の相補性決定領域（CDR）のサブセットは、組み合わせられて、三次元の抗原結合部位を規定する可変領域を形成する。この4要素からなる抗体構造は、Yの各腕の末端に存在する抗原結合部位を形成する。より具体的には、抗原結合部位は、VH鎖およびVL鎖の各々上の3個のCDRにより規定される。いくつかの場合には、例えば、ラクダ科の種に由来するかまたはラクダ科の免疫グロブリンに基づいて工学により作製されたある特定の免疫グロブリン分子は、完全な免疫グロブリン分子が、軽鎖を有さず、重鎖のみからなり得る。例えば、Hamers-Casterman et al., Nature 363:446-448 (1993)を参照されたい。

【0035】

天然に存在する抗体において、各抗原結合ドメイン中に存在する6個の「相補性決定領域」または「CDR」は、抗体が水性環境においてその三次元形態を呈する際に抗原結合ドメインを形成するように特異的に位置づけられる、アミノ酸の短い非隣接の配列である。「フレームワーク」領域と呼ばれる抗原結合ドメイン中のアミノ酸の残りの部分は、より低い分子間の可変性を示す。フレームワーク領域は、主としてシート立体配座を採り、CDRは、シート構造を連結し、いくつかの場合にはその一部を形成するループを形成する。従って、フレームワーク領域は、CDRを鎖間の非共有相互作用により正確な配向に位置づけることを提供する足場を形成するように作用する。位置づけられたCDRにより形成される抗原結合ドメインは、免疫反応性抗原上のエピトープに対して相補性の表面を規定する。この相補性の表面が、抗体のその同起源エピトープに対する非共有結合を促進する。それぞれCDRおよびフレームワーク領域を構成するアミノ酸は、正確に定義されているため（下記参照）、任意の所定の重鎖可変ドメインまたは軽鎖可変ドメインについて当業者が容易に同定することができる。

【0036】

当技術分野内で使用される、および／または受け入れられる用語の2つまたはそれより多い定義がある場合には、本明細書において使用される用語の定義は、それとは反対に明示的に述べられない限り、そのような意味のすべてを含むように意図される。具体例は、重鎖ポリペプチドおよび軽鎖ポリペプチド両方の可変領域内に見出される非隣接の抗原結合部位を記載するための、「相補性決定領域」（「CDR」）という用語の使用である。この特定の領域は、参照により本明細書に組み入れられる、Kabat et al. (1983) U.S. Dept. of Health and Human Services, "Sequences of Proteins of Immunological Interest"およびChothia and Lesk, J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987)によって記載されており、定義は、互いに対して比較した際のアミノ酸残基の重複またはサブセットを含む。それにもかかわらず、抗体またはその変異体のCDRに言及するためのいずれかの定義の適用は、本明細書において定義されかつ使用される用語の範囲内であることが意図される。上記で引用される参考文献の各々により定義されるCDRを包含する適切なアミノ酸残基を、比較として下記の表1に示す。特定のCDRを包含する正確な残基の数字は、CDRの配列およびサイズに応じて変動するであろう。当業者は日常的に、抗体の可変領域アミノ酸配列を考慮して、どの残基が特定のCDRを構成するかを決定することができる。

【0037】

(表1) CDRの定義¹

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

¹表1におけるすべてのCDRの定義のナンバリングは、Kabatらにより示されるナンバリング慣例に従う(下記参照)。

【0038】

Kabatらはまた、任意の抗体に適用可能である可変ドメイン配列についてのナンバリングシステムも定義した。当業者は、配列自体を超えるいずれの実験データにも頼ることなく、「Kabatナンバリング」のこのシステムを任意の可変ドメイン配列に明白に割り当てることができる。本明細書において使用される際、「Kabatナンバリング」とは、Kabat et al. (1983) U.S. Dept. of Health and Human Services, "Sequence of Proteins of Immunological Interest."により示されるナンバリングシステムを指す。別の方法で特定化されない限り、本発明の抗SEMA4D抗体、またはその抗原結合断片、変異体、もしくは誘導体における特定のアミノ酸残基の位置のナンバリングについての言及は、Kabatナンバリングシステムに従う。

【0039】

本発明の抗体、またはその抗原結合断片、変異体、もしくは誘導体は、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、少なくとも1本の腕がSEMA4Dに特異的である多重特異性抗体および二重特異性抗体、ヒト抗体、ヒト化抗体、霊長類化抗体、またはキメラ抗体、一本鎖抗体、エピトープ結合断片、例えば、Fab、Fab'およびF(ab')₂、Fd、Fv、一本鎖Fv(sc Fv)、ジスルフィド結合Fv(sdFv)、VLドメインまたはVHドメインのいずれかを含む断片、Fab発現ライブラリーにより産生された断片、ならびに抗イディオタイプ(抗Id)抗体(例えば、本明細書において開示される抗SEMA4D抗体に対する抗Id抗体を含む)を含むが、これらに限定されない。ScFv分子は当技術分野において公知であり、例えば、米国特許第5,892,019号に記載されている。本発明の免疫グロブリンまたは抗体分子は、免疫グロブリン分子の任意のタイプ(例えば、IgG、IgE、IgM、IgD、IgA、およびIgY)、クラス(例えば、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1、およびIgA2など)、またはサブクラスであり得る。

【0040】

本明細書において使用される際、「重鎖部分」という用語は、免疫グロブリン重鎖に由来するアミノ酸配列を含む。ある特定の態様において、重鎖部分を構成するポリペプチドは、VHドメイン、CH1ドメイン、ヒンジ(例えば、上部、中間部、および/または下部ヒンジ領域)ドメイン、CH2ドメイン、CH3ドメイン、またはその変異体もしくは断片の、少なくとも1つを含む。例えば、本発明における使用のための結合ポリペプチドは、CH1ドメインを構成するポリペプチド鎖; CH1ドメイン、ヒンジドメインの少なくとも一部、およびCH2ドメインを構成するポリペプチド鎖; CH1ドメインおよびCH3ドメインを構成するポリペプチド鎖; CH1ドメイン、ヒンジドメインの少なくとも一部、およびCH3ドメインを構成するポリペプチド鎖、または、CH1ドメイン、ヒンジドメインの少なくとも一部、CH2ドメイン、およびCH3ドメインを構成するポリペプチド鎖を含んでもよい。別の態様において、本発明のポリペプチドは、CH3ドメインを構成するポリペプチド鎖を含む。さらに、本発明における使用のための結合ポリペプチドは、CH2ドメインの少なくとも一部(例えば、CH2ドメインのすべてまたは部分)を欠如していてもよい。上記に示されるように、これらのドメイン(例えば重鎖部分)は、アミノ酸配列において天然に存在する免疫グロブリン分子とは異なるように修飾されてもよいことが、当業者に理解されるであろう。

【0041】

本明細書において開示されるある特定の抗SEMA4D抗体、またはその抗原結合断片、変異体、もしくは誘導体において、多量体の1本のポリペプチド鎖の重鎖部分は、多量体の2本目のポリペプチド鎖上のものと同一である。あるいは、本発明の重鎖部分を含有する単量体は、同一ではない。例えば、各単量体は、例えば二重特異性抗体を形成する、異なる標的結合部位を含んでもよい。

【0042】

本明細書中で開示される方法における使用のための結合分子の重鎖部分は、異なる免疫グロブリン分子に由来してもよい。例えば、ポリペプチドの重鎖部分は、IgG1分子に由来するC_{H1}ドメインおよびIgG3分子に由来するヒンジ領域を含むことができる。別の例において、重鎖部分は、部分的にIgG1分子に、および部分的にIgG3分子に由来するヒンジ領域を含むことができる。別の例において、重鎖部分は、部分的にIgG1分子に、および部分的にIgG4分子に由来するキメラヒンジを含むことができる。

【0043】

本明細書において使用される際、「軽鎖部分」という用語は、免疫グロブリン軽鎖、例えば、軽鎖または軽鎖に由来するアミノ酸配列を含む。好ましくは、軽鎖部分は、VLドメインまたはCLドメインの少なくとも1つを含む。

【0044】

本明細書において開示される抗SEMA4D抗体、またはその抗原結合断片、変異体、もしくは誘導体は、これらが認識するかまたは特異的に結合する抗原、例えば、本明細書において開示される標的ポリペプチド（例えばSEMA4D）のエピトープまたは部分の観点から記載されるか、または特定化されてもよい。抗体の抗原結合ドメインと特異的に相互作用する標的ポリペプチドの部分が、「エピトープ」または「抗原決定基」である。標的ポリペプチドは、単一のエピトープを含むことができるが、典型的には、少なくとも2個のエピトープを含み、かつ、抗原のサイズ、立体配座、およびタイプに応じて、任意の数のエピトープを含むことができる。さらに、標的ポリペプチド上の「エピトープ」は、非ポリペプチド要素であってもよいが、またはそれを含んでもよく、例えば、エピトープは炭水化物側鎖を含んでもよいことに注意されたい。

【0045】

抗体のためのペプチドまたはポリペプチドエピトープの最小サイズは、約4個～5個のアミノ酸であると考えられている。ペプチドまたはポリペプチドエピトープは、好ましくは、少なくとも7個、より好ましくは少なくとも9個、および最も好ましくは少なくとも約15個～約30個の間のアミノ酸を含有する。CDRは、その三次形態において抗原性ペプチドまたはポリペプチドを認識することができるため、エピトープを構成するアミノ酸は、隣接している必要がなく、いくつかの場合には、同一のペプチド鎖上でなくてさえよい。本発明の抗SEMA4D抗体により認識されるペプチドまたはポリペプチドエピトープは、少なくとも4個、少なくとも5個、少なくとも6個、少なくとも7個、より好ましくは、少なくとも8個、少なくとも9個、少なくとも10個、少なくとも15個、少なくとも20個、少なくとも25個、または約15個～約30個の間の、SEMA4Dの隣接または非隣接のアミノ酸の配列を含有してもよい。

【0046】

「特異的に結合する」により、抗体がその抗原結合ドメインを介してエピトープに結合すること、および結合が抗原結合ドメインとエピトープとの間のいくつかの相補性を必然的に伴うことが、概して意味される。この定義に従って、抗体が、無作為の関連のないエピトープに結合するよりも容易に、その抗原結合ドメインを介してそのエピトープに結合する際、抗体はエピトープに「特異的に結合する」と言われる。「特異性」という用語は、それによりある特定の抗体がある特定のエピトープに結合する相対的親和性を認定するために、本明細書において使用される。例えば、抗体「A」は、所定のエピトープに対して抗体「B」よりも高い特異性を有すると考えられてもよく、または抗体「A」は、関連するエピトープ「D」に対して有するよりも高い特異性でエピトープ「C」に結合すると言わ

10

20

30

40

50

れてもよい。

【0047】

「優先的に結合する」により、抗体が、関連する、同様の、相同の、または類似のエピトープに結合するよりも容易に、エピトープに特異的に結合することが意味される。従って、所定のエピトープに「優先的に結合する」抗体は、そのような抗体が関連するエピトープと交差反応し得るにもかかわらず、関連するエピトープよりもそのエピトープに結合する可能性が高いであろう。

【0048】

非限定的な例として、抗体は、第2のエピトープについての抗体の解離定数 (K_D) より低い K_D で第1のエピトープに結合する場合、該第1のエピトープに優先的に結合すると考えられてもよい。別の非限定的な例において、抗体は、第2のエピトープについての抗体の K_D より少なくとも1桁低い親和性で第1のエピトープに結合する場合、第1の抗原に優先的に結合すると考えられてもよい。別の非限定的な例において、抗体は、第2のエピトープについての抗体の K_D より少なくとも2桁低い親和性で第1のエピトープに結合する場合、第1のエピトープに優先的に結合すると考えられてもよい。

10

【0049】

別の非限定的な例において、抗体は、第2のエピトープについての抗体のオフ速度 (off rate) ($k(\text{オフ})$) より低い $k(\text{オフ})$ で第1のエピトープに結合する場合、第1のエピトープに優先的に結合すると考えられてもよい。別の非限定的な例において、抗体は、第2のエピトープについての抗体の $k(\text{オフ})$ より少なくとも1桁低い親和性で第1のエピトープに結合する場合、第1のエピトープに優先的に結合すると考えられてもよい。別の非限定的な例において、抗体は、第2のエピトープについての抗体の $k(\text{オフ})$ より少なくとも2桁低い親和性で第1のエピトープに結合する場合、第1のエピトープに優先的に結合すると考えられてもよい。本明細書において開示される抗体、または抗原結合断片、変異体、もしくは誘導体は、 $5 \times 10^{-2} \text{ 秒}^{-1}$ 、 10^{-2} 秒^{-1} 、 $5 \times 10^{-3} \text{ 秒}^{-1}$ 、または 10^{-3} 秒^{-1} より低いまたはそれと同等のオフ速度 ($k(\text{オフ})$) で、本明細書において開示される標的ポリペプチド (例えば、SEMA4D、例えば、ヒト、マウス、またはヒトおよびマウス両方のSEMA4D) またはその断片もしくは変異体に結合すると言われてもよい。より好ましくは、本発明の抗体は、 $5 \times 10^{-4} \text{ 秒}^{-1}$ 、 10^{-4} 秒^{-1} 、 $5 \times 10^{-5} \text{ 秒}^{-1}$ 、または 10^{-5} 秒^{-1} 、 $5 \times 10^{-6} \text{ 秒}^{-1}$ 、 10^{-6} 秒^{-1} 、 $5 \times 10^{-7} \text{ 秒}^{-1}$ 、または 10^{-7} 秒^{-1} より低いまたはそれと同等のオフ速度 ($k(\text{オフ})$) で、本明細書において開示される標的ポリペプチド (例えば、SEMA4D、例えば、ヒト、マウス、またはヒトおよびマウス両方のSEMA4D) またはその断片もしくは変異体に結合すると言われてもよい。

20

30

【0050】

本明細書において開示される抗体、または抗原結合断片、変異体、もしくは誘導体は、 $10^3 \text{ M}^{-1} \text{ 秒}^{-1}$ 、 $5 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ 秒}^{-1}$ 、 $10^4 \text{ M}^{-1} \text{ 秒}^{-1}$ 、または $5 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ 秒}^{-1}$ より高いまたはそれと同等のオン速度 (on rate) ($k(\text{オン})$) で、本明細書において開示される標的ポリペプチド (例えば、SEMA4D、例えば、ヒト、マウス、またはヒトおよびマウス両方のSEMA4D) またはその断片もしくは変異体に結合すると言われてもよい。より好ましくは、本発明の抗体は、 $10^5 \text{ M}^{-1} \text{ 秒}^{-1}$ 、 $5 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ 秒}^{-1}$ 、 $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ 秒}^{-1}$ 、または $5 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ 秒}^{-1}$ 、または $10^7 \text{ M}^{-1} \text{ 秒}^{-1}$ より高いまたはそれと同等のオン速度 ($k(\text{オン})$) で、本明細書において開示される標的ポリペプチド (例えば、SEMA4D、例えば、ヒト、マウス、またはヒトおよびマウス両方のSEMA4D) またはその断片もしくは変異体に結合すると言われてもよい。

40

【0051】

抗体は、参照抗体のエピトープへの結合をある程度遮断する範囲でそのエピトープに優先的に結合する場合、参照抗体の所定のエピトープへの結合を競合的に阻害すると言われる。競合的阻害は、当技術分野において公知である任意の方法、例えば、競合ELISAアッセイにより測定されてもよい。抗体は、少なくとも90%、少なくとも80%、少なくとも70%、少なくとも60%、または少なくとも50%、参照抗体の所定のエピトープへの結合を競合的に阻害すると言われてもよい。

50

【0052】

本明細書において使用される際、「親和性」という用語は、個々のエピトープの免疫グロブリン分子のCDRとの結合の強度の尺度を指す。例えば、Harlow et al. (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed.) の27～28ページを参照されたい。本明細書において使用される際、「結合力」という用語は、免疫グロブリンの集団と抗原との間の複合体の全体の安定性、すなわち、免疫グロブリン混合物の抗原との機能的結合強度を指す。例えば、Harlowの29～34ページを参照されたい。結合力は、集団中の個々の免疫グロブリン分子の特異的なエピトープとの親和性、ならびにまた免疫グロブリンおよび抗原の結合価の両方に関連する。例えば、2価のモノクローナル抗体と、ポリマーなどの高度に反復するエピトープ構造を有する抗原との間の相互作用は、高い結合力の1つであろう。

10

【0053】

本発明の抗SEMA4D抗体、またはその抗原結合断片、変異体、もしくは誘導体はまた、その交差反応性の観点から記載されるか、または特定化されてもよい。本明細書において記載される際、「交差反応性」という用語は、1種の抗原に特異的な抗体の第2の抗原と反応する能力；2種の異なる抗原性物質の間の関連性の尺度を指す。従って、抗体が、その形成を誘導したエピトープ以外のエピトープに結合する場合、交差反応性である。交差反応性エピトープは、概して、誘導エピトープと同一の相補的構造特性の多くを含有し、いくつかの場合には、実際に元よりも良好に適合し得る。

【0054】

例えば、ある特定の抗体は、関連するが同一ではないエピトープ、例えば、参照エピトープと少なくとも95%、少なくとも90%、少なくとも85%、少なくとも80%、少なくとも75%、少なくとも70%、少なくとも65%、少なくとも60%、少なくとも55%、および少なくとも50%の同一性（当技術分野において公知でありかつ本明細書において記載される方法を用いて算出した際）を有するエピトープに結合する、ある程度の交差反応性を有する。抗体は、参照エピトープと95%未満、90%未満、85%未満、80%未満、75%未満、70%未満、65%未満、60%未満、55%未満、および50%未満の同一性（当技術分野において公知でありかつ本明細書において記載される方法を用いて算出した際）を有するエピトープに結合しない場合、ほとんどまたはまったく交差反応性を有さないと言われてもよい。抗体は、そのエピトープの任意の他の類似体、オーソログ、または相同体に結合しない場合、ある特定のエピトープについて「高度に特異的」と考えられてもよい。

20

30

【0055】

本発明の抗SEMA4D結合分子、例えば、抗体、またはその抗原結合断片、変異体、もしくは誘導体はまた、本発明のポリペプチド、例えば、SEMA4D、例えば、ヒト、マウス、またはヒトおよびマウス両方のSEMA4Dに対するその結合親和性の観点から記載されるか、または特定化されてもよい。好ましい結合親和性は、 5×10^{-2} M、 10^{-2} M、 5×10^{-3} M、 10^{-3} M、 5×10^{-4} M、 10^{-4} M、 5×10^{-5} M、 10^{-5} M、 5×10^{-6} M、 10^{-6} M、 5×10^{-7} M、 10^{-7} M、 5×10^{-8} M、 10^{-8} M、 5×10^{-9} M、 10^{-9} M、 5×10^{-10} M、 10^{-10} M、 5×10^{-11} M、 10^{-11} M、 5×10^{-12} M、 10^{-12} M、 5×10^{-13} M、 10^{-13} M、 5×10^{-14} M、 10^{-14} M、 5×10^{-15} M、または 10^{-15} Mより低い解離定数またはKdを有するものを含む。ある特定の態様において、本発明の抗SEMA4D結合分子、例えば、抗体またはその抗原結合断片は、約 5×10^{-9} ～約 6×10^{-9} のKdでヒトSEMA4Dに結合する。別の態様において、本発明の抗SEMA4D結合分子、例えば、抗体またはその抗原結合断片は、約 1×10^{-9} ～約 2×10^{-9} のKdでマウスSEMA4Dに結合する。

40

【0056】

本明細書において使用される際、「キメラ抗体」という用語は、免疫反応性領域または部位が第1の種から取得されているかまたは由来し、かつ、定常領域（本発明に従って、無傷であるか、部分的であるか、または修飾されていてもよい）が第2の種から取得されている任意の抗体を意味すると考えられるであろう。好ましい態様において、標的結合領域または部位は、非ヒト供給源（例えば、マウスまたは霊長類）由来であると考えられ、かつ、定常領域はヒトである。

50

【0057】

本明細書において使用される際、「工学により作製された抗体」という用語は、重鎖または軽鎖のいずれかまたは両方における可変ドメインが、公知の特異性の抗体由来の1個または複数のCDRの少なくとも部分的な置換により、ならびに、必要な場合、部分的なフレーム領域の置換および配列交換により変更されている抗体を指す。CDRは、フレームワーク領域が由来する抗体と同一のクラスまたはさらにサブクラスの抗体に由来してもよいが、CDRが異なるクラスの抗体、好ましくは異なる種由来の抗体に由来することが、想定される。公知の特異性の非ヒト抗体由来の1個または複数の「ドナー」CDRがヒト重鎖または軽鎖のフレームワーク領域中に移植されている、工学により作製された抗体は、本明細書において「ヒト化抗体」と呼ばれる。1個の可変ドメインの抗原結合能力を別の可変ドメインに移すために、CDRのすべてをドナー可変ドメイン由来の完全なCDRで置換することは、必要ではない可能性がある。むしろ、標的結合部位の活性を維持するために必要である残基を移すことが、単に必要である可能性がある。

10

【0058】

ヒト化抗体の重鎖または軽鎖または両方における可変ドメイン内のフレームワーク領域は、ヒト起源の残基のみを含んでもよいことがさらに認識され、この場合、ヒト化抗体のこれらのフレームワーク領域は、「完全ヒトフレームワーク領域」と呼ばれる（例えば、全体として参照により本明細書に組み入れられる米国特許出願公開第2010/0285036 A1号においてMAb 2503として開示されているMAb VX15/2503）。あるいは、ドナー可変ドメインのフレームワーク領域の1個または複数の残基は、SEMA4D抗原に対する妥当な結合を維持するためまたは結合を増強するために、必要な場合、ヒト化抗体の重鎖または軽鎖または両方における可変ドメインのヒトフレームワーク領域の対応する位置の中で、工学により変更することができる。この様式において工学により変更されているヒトフレームワーク領域は、従って、ヒトおよびドナーのフレームワーク残基の混合物を含み、本明細書において「部分的ヒトフレームワーク領域」と呼ばれる。

20

【0059】

例えば、抗SEMA4D抗体のヒト化は、Winterおよび共同研究者の方法に従って（Jones et al., Nature 321:522-525 (1986); Riechmann et al., Nature 332:323-327 (1988); Verhoeyen et al., Science 239:1534-1536 (1988)）、げっ歯類または変異げっ歯類のCDRまたはCDR配列を、ヒト抗SEMA4D抗体の対応する配列と置換することにより、本質的に行うことができる。参照により本明細書に組み入れられる、米国特許第5,225,539号；米国特許第5,585,089号；米国特許第5,693,761号；米国特許第5,693,762号；米国特許第5,859,205号もまた参照されたい。結果として生じたヒト化抗SEMA4D抗体は、ヒト化抗体の重鎖および/または軽鎖の可変ドメインの完全ヒトフレームワーク領域内に少なくとも1個のげっ歯類または変異げっ歯類のCDRを含むであろう。いくつかの例において、ヒト化抗SEMA4D抗体の1個または複数の可変ドメインのフレームワーク領域内の残基は、対応する非ヒト（例えばげっ歯類）残基により置換されており（例えば、米国特許第5,585,089号；米国特許第5,693,761号；米国特許第5,693,762号；および米国特許第6,180,370号を参照されたい）、その場合、結果として生じたヒト化抗SEMA4D抗体は、重鎖および/または軽鎖の可変ドメイン内に部分的ヒトフレームワーク領域を含むであろう。

30

40

【0060】

さらに、ヒト化抗体は、レシピエント抗体中またはドナー抗体中に見出されない残基を含むことができる。これらの修飾は、抗体の性能をさらに磨くために（例えば望ましい親和性を得るために）なされる。概して、ヒト化抗体は、少なくとも1個の、および典型的には2個の可変ドメインの実質的にすべてを含むと考えられ、その中で、CDRのすべてまたは実質的にすべては、非ヒト免疫グロブリンのものに対応し、フレームワーク領域のすべてまたは実質的にすべては、ヒト免疫グロブリン配列のものである。ヒト化抗体は任意で、免疫グロブリン定常領域（Fc）の少なくとも一部、典型的にはヒト免疫グロブリンのものも含むであろう。さらに詳細には、参照により本明細書に組み入れられるJones et al., Nature 331:522-525 (1986); Riechmann et al., Nature 332:323-329 (1988); および

50

Presta, Curr. Op. Struct. Biol. 2:593-596 (1992)を参照されたい。従って、そのような「ヒト化」抗体は、無傷のヒト可変ドメインが非ヒト種由来の対応する配列により置換されているとは実質的に言えない抗体を含んでもよい。実際には、ヒト化抗体は、典型的に、いくつかのCDR残基および場合によりいくつかのフレームワーク残基が、げっ歯類抗体中の類似した部位由来の残基により置換されているヒト抗体である。例えば、米国特許第5,225,539号；米国特許第5,585,089号；米国特許第5,693,761号；米国特許第5,693,762号；米国特許第5,859,205号を参照されたい。また、あらかじめ決定された抗原について改善された親和性を有するヒト化抗体を産生するためのヒト化抗体および技術が開示されている、米国特許第6,180,370号、および国際公開公報第01/27160号も参照されたい。

【0061】

10

II. 血液脳関門（「BBB」）

血液脳関門（BBB）は、循環血液と中枢神経系（CNS）との間の活性界面である。BBBは、2種の区画間の様々な物質の自由な移動を制限し、CNSの恒常性の維持において重大な役割を果たす。BBBは、関門機能および担体機能の両方を有する。BBBは、関門として、細胞および潜在的に毒性または有害な物質の血液から脳への移動を制限する。他方で、BBBは、担体として、脳へ栄養分を輸送することおよび代謝物を除去することを担当する。

【0062】

BBBは、主として3種の構成要素：内皮細胞、星状細胞、および周皮細胞から構成されている。内皮細胞は、脳中の毛細管および血管の内表面を覆う連続性シートを形成する。（Ransohoff et al., "Three or More Routes for Leukocyte Migration Into the Central Nervous System," Nature Rev. Immun. 3:569-581 (2003)）。内皮細胞は、コラーゲンI V、フィブロネクチン、ラミニン、およびプロテオグリカンから主になる基底膜に隣接して位置し、細胞の先端領域でベルト様構造を形成する密着結合により相互接続される。内皮細胞は、顕微鏡の対象（例えば細菌）および大きな分子または親水性分子の脳実質および脳脊髄液（CSF）中への拡散を制限するが、小さな疎水性分子（O₂、ホルモン、CO₂）の拡散を可能にする。関門の細胞は、グルコースなどの代謝産物を、特異的なタンパク質で関門を横切って能動的に輸送する。

20

【0063】

脳毛細管を形成する内皮細胞は、身体中の他の組織において見出されるものとは異なる。脳毛細管内皮細胞は、細胞間密着結合により互いに連結されて、血液から脳およびCNSの他の部分（脳脊髄液、CSFを含む）への分子の受動拡散に対抗する連続性の壁を形成する。これらの細胞はまた、他の組織において毛細管壁を横切るいくらか非選択的な輸送を可能にする飲作用胞をほとんど有さない点でも異なる。また、無制限の通過を可能にすると考えられる細胞間に走る連続性の間隙またはチャンネルが、欠如している。

30

【0064】

BBBは、内皮細胞に加えて、周皮細胞および星状細胞からも構成されている。周皮細胞は、基底膜内に位置し、内皮細胞と相互作用し、内皮の増殖、血管形成、および炎症性過程の制御において重要な役割を果たす。星状細胞は、脳および脊髄中の特徴的な星形のグリア細胞であり、ヒト脳の最も豊富な細胞である。星状細胞は、血管脳関門を形成する内皮細胞の生化学的支持、神経組織への栄養分の供給、細胞外イオンバランスの維持、なら

40

【0065】

血液脳関門は、脳の環境が常に制御されることを保証するように機能する。ホルモン、アミノ酸、およびイオンなどの血中の種々の物質のレベルは、摂食および運動などの活動によりもたらされ得る頻繁な小さな揺らぎを受ける（Goldstein et al., "The Blood-Brain Barrier," Scientific American 255:74-83 (1986)；Pardridge, "Receptor-Mediated Peptide Transport Through the Blood-Brain Barrier," Endocrin. Rev. 7:314-330 (1986)）。脳が血清組成物におけるこれらの変動から血液脳関門により保護されないとすると、結果は制御されない神経活動となるであろう。

50

【 0 0 6 6 】

脳の血流からの分離は、完全ではない。完全な場合には、脳は、栄養分の欠如のためおよび身体に残りの部分と化学物質を交換する必要性のために、妥当に機能することができないであろう。毛細管内皮細胞内の特異的な輸送システムの存在により、脳が、正常な増殖および機能に必要とされる化合物のすべてを、制御された様式で受け取ることが確実になる。多くの例において、これらの輸送システムは、ある特定の分子に選択的に結合し、関門膜を横切ってそれを輸送する膜結合タンパク質からなる。これらの輸送体タンパク質は、溶質担体輸送体として公知である。

【 0 0 6 7 】

BBBは、脳および中枢神経系を外来または外部の分子および細胞由来の損傷から保護するように働くが、外来または外部の分子および細胞は、しばしばBBBを横切り、限定された数において、CNSの免疫監視のためなどに有益でさえあり得る。しかしながら、例えば、B細胞、T細胞、白血球、およびマクロファージなどの高度に活性を有する細胞が、過剰にBBBを横切り、脳に到達すると、脳に損傷を引き起こす可能性がある。例えば、浮腫、脳外傷、卒中、および多発性硬化症を患う患者は、BBBの崩壊を呈する。

【 0 0 6 8 】

種々の神経炎症性障害に対するBBBの作用が、研究されている。(Zlokovic BV, "The Blood-Brain Barrier in Health and Chronic Neurodegenerative Disorders," *Neuron* 57: 178-201 (2008); Zhong Z et al., "ALS-causing SOD1 mutants generate vascular changes prior to motor neuron degeneration," *Nature Neuroscience* 11(4): 420-422 (2008); Hawkins BT et al., "The Blood-Brain Barrier/neurovascular Unit in Health and Disease," *Pharmacological Rev* 57 (2): 173-185 (2005); Oby E et al., "The Blood-Brain Barrier and Epilepsy," *Epilepsia* 47(11): 1761-1774 (2006))。さらに、炎症および血液脳関門 (BBB) (Banks and Erickson, 2010; Lochhead et al, 2010) が、髄膜炎 (van der et al, 2004)、脳浮腫 (Stamatovic et al, 2006)、アルツハイマー病 (Kalaria, 1992)、パーキンソン病 (Westin, J.E., et. al., "Endothelial Proliferation and Increased Blood-Brain Barrier Permeability in the Basal Ganglia in a Rat Model of 3,4-Dihydroxyphenyl-L-Alanine-Induced Dyskinesia," *The Journal of Neuroscience* 26(37): 9448-9461 (2006))、および多発性硬化症 (Minagar and Alexander, 2003) などの神経疾患の病原論に関与していることの証拠が増加している。

【 0 0 6 9 】

例えば、多発性硬化症の場合には、人がMS「攻撃」を受けると、脳または脊髄の区分においてBBBが崩壊して、Tリンパ球が横切って渡り、脳および脊髄の両方において中枢神経系のニューロンを保護しかつ絶縁するミエリンを攻撃することを可能にすることが、磁気共鳴映像法 (「MRI」) を用いて示されている。(Zlokovic 2008; Waubant E., "Biomarkers indicative of blood-brain barrier disruption in multiple sclerosis". *Disease Markers* 22 (4): 235-44 (2006))。

【 0 0 7 0 】

他方、髄膜炎は、脳および脊髄を取り囲む膜 (これらの膜は髄膜として公知である) の炎症が存在する時に起きる。髄膜が炎症を起こすと、血液脳関門が破壊される可能性があり、炎症性細胞および種々の物質 (毒素または抗生物質のいずれかを含む) の両方が脳に入ることが可能になる。(Beam, TR Jr., et al. (December 1977). "Blood, brain, and cerebrospinal fluid concentrations of several antibiotics in rabbits with intact and inflamed meninges". *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 12 (6): 710-6)。

【 0 0 7 1 】

同様に、パーキンソン病 (PD) の場合には、推定上のPD毒素の吸収または代謝、および、摂取された毒性親油性代謝物の迅速な除去を媒介するATP依存性流出ポンプである輸送体P-糖タンパク質 (P-gp) の低い活性による、BBBを横切るそれらの不完全な排出が、PDの病原論において役割を果たす可能性があることが、示唆されている (Kortekaas, R., L

10

20

30

40

50

eenders, K.L., van Oostrom, J.C., Vaalburg, W., Bart, J., Willemsen, A.T., and Hendrikse, N.H. Blood-brain barrier dysfunction in parkinsonian midbrain in vivo. *Ann. Neurol.* 57, 176-179, 2005)。神経炎症はまた、PD患者およびPDの実験モデルにおいて偏在する所見であるようにも見える。食細胞活性化、炎症誘発性サイトカインの合成および放出の増加、補体活性化、ミクログリアの活性化、ならびに活性酸素種（ROS）の放出が、記載されている（Whitton, P.S. Inflammation as a causative factor in the aetiology of Parkinson's disease. *Br. J. Pharmacol.* 150, 963-976, 2007）。

【 0 0 7 2 】

てんかんにおいては、研究により、一般的な血液タンパク質であるアルブミンと星状細胞との間のある特定の相互作用による、慢性または急性の発作を引き起こす際の血液脳関門機能の不全が、暗示されている。これらの知見により、急性の発作が、人工的機構または炎症性機構のいずれかによるBBBの破壊の結果であることが、示唆される。（Oby, E; et al. (2006). "The Blood-Brain Barrier and Epilepsy" (PDF). *Epilepsia* 47 (11): 1761-1774）。

【 0 0 7 3 】

アルツハイマー病（AD）を有する患者においては、証拠により、アミロイド（A β ）を含有する血漿が、A β についてのBBBを横切る主要な流入輸送体であるRAGEを通して脳に入ることを可能にする際の血液脳関門の破壊が、指摘される。研究により、A β / RAGEの相互作用が、循環A β のBBBを横切る脳実質中へのトランスサイトーシスおよびニューロンへの結合を結果としてもたらし、NF- κ B媒介性の内皮活性化が、炎症誘発性サイトカインの分泌、接着分子の発現、およびCBF（脳血流）を抑制するエンドセリン-1の生成を結果としてもたらすことが、示されている。さらに、A β / RAGEの相互作用が、RAGE発現ニューロンに対して酸化損傷を生じることにより、およびミクログリアを活性化することにより、ニューロンの殺傷に寄与することが、示されている。（Zlokovic, B.V. The Blood-Brain Barrier in Health and Chronic Neurodegenerative Disorders. *Neuron* 57, 178-201, 2008）。BBBを介した脳実質の外へおよび微小血管系中へのA β の不完全な流出もまた、AD病原論の設定において見出されており、部分的に、損なわれた低密度リボタンパク質受容体関連タンパク質1（LRP1）の機能に帰する。LRP1は、A β の様々な構造的配座異性体に結合して、それを輸送する反管腔側の（abluminal）BBB膜タンパク質である（Deane et al., "LRP/amyloid beta-peptide interaction mediates differential brain efflux of Abeta isoforms." *Neuron* 43, 333-344, 2004）。A β 曝露により、脳微小血管内皮細胞上のクロードン-5およびZO-2を含む密着結合タンパク質の細胞表面発現パターンが細胞質へと移行し（Marco et al., "Amyloid β -peptide 1-42 alters tight junction protein distribution and expression in brain microvessel endothelial cells." *Neurosci. Lett.* 401, 219-224, 2006）、単層のこれらの細胞の経内皮電気抵抗（TEER）が重度に損なわれる（Gonzalez-Velasquez et al., "Soluble aggregates of the amyloid-beta protein selectively stimulate permeability in human brain microvascular endothelial monolayers." *J. Neurochem.* 107, 466-477, 2008）。

【 0 0 7 4 】

筋萎縮性側索硬化症（ALS）においては、研究により、BBBの崩壊が、運動ニューロンと相互作用する血清タンパク質の漏出を結果としてもたらして、ROS（活性酸素種）を産生し、かつ自己免疫応答を開始させ、脱髄、ニューロンの信号伝達の破壊、および細胞死を引き起こす可能性があることが、示唆されている。（Zlokovic 2008）。

【 0 0 7 5 】

最近の研究により、BBBの脆弱化は、内皮細胞におけるそれらのVEGF-A受容体を通して媒介される攪乱に起因し得ることが、示唆されている。（Argaw AT et al., "VEGF-mediated disruption of endothelial CLN-5 promotes blood-brain barrier breakdown," *PNAS* 106(6): 1977-1982 (2009)）。その研究によると、星状細胞に由来するVEGF-Aは、内皮の膜貫通密着結合タンパク質であるクロードン-5（CLN-5）およびオクルジン（OCLN）の両方を標的として、その発現を妨げる。CLN-5およびOCLN両方の発現が低下するにつ

10

20

30

40

50

れて、BBBの崩壊が増大する。

【0076】

本実施例において示されるように、BBBの脆弱化についての別の可能性のある機構は、SEMA4Dに対するプレキシン-B1高親和性(1 nM)受容体を通した内皮細胞攪乱の結果としてである。プレキシン-B1は、内皮細胞により発現され得る。SEMA4-Dの存在下で、内皮細胞は、例えば、密着結合の修飾を通して、BBBの脆弱化を引き起こすように内皮細胞の形態または機能を変化させる形質転換を受ける可能性がある。このBBBの脆弱化は、次に、細胞および分子に対するBBBの透過性を増大させ、そのような細胞および分子が脳および中枢神経系に入ってその活性を変化させることを可能にし得る。従って、抗SEMA4Dまたは抗プレキシン-B1いずれかの添加が、内皮細胞が形質転換を受けることを予防し、かつBBBの脆弱化を低減させる可能性がある。

10

【0077】

III. 標的ポリペプチドの説明

本明細書において使用される際、「セマフォリン-4D」、「SEMA4D」、および「SEMA4Dポリペプチド」という用語は、「SEMA4D」および「Sema4D」のように、互換的に使用される。ある特定の態様において、SEMA4Dは、細胞の表面上に発現しているか、または細胞により分泌される。別の態様において、SEMA4Dは膜結合性である。別の態様において、SEMA4Dは可溶性、例えばsSEMA4Dである。他の態様において、SEMA4Dは、完全なサイズのSEMA4D、またはその断片、またはSEMA4D変異体ポリペプチドを含んでもよく、該SEMA4Dの断片またはSEMA4D変異体ポリペプチドは、完全なサイズのSEMA4Dのいくつかまたはすべての機能特性を保持している。

20

【0078】

完全なサイズのヒトSEMA4Dタンパク質は、150 kDaの2本のポリペプチド鎖からなるホモ二量体膜貫通タンパク質である。SEMA4Dは、細胞表面受容体のセマフォリンファミリーに属し、CD100とも呼ばれる。ヒトおよびマウス両方のSEMA4D / Sema4Dは、それらの膜貫通型からタンパク質分解性に切断されて120-kDaの可溶型を生じ、2種のSema4Dアイソフォームの存在を示す(Kumanogoh et al., J. Cell Science 116(7):3464 (2003))。セマフォリンは、ニューロンとその適切な標的との間の正確な連結を確立する際に重要な役割を果たす発生中の軸索ガイダンス因子として元来定義された、可溶性タンパク質および膜結合性タンパク質を含む。完全なサイズのSEMA4Dは、構造的にクラスIVセマフォリンと考えられ、アミノ末端のシグナル配列の後に、17個の保存されたシステイン残基を含有する特徴的な「セマ」ドメイン、Ig様ドメイン、リジンに富んだストレッチ、疎水性膜貫通領域、および細胞質尾部を含む。

30

【0079】

SEMA4Dの各ポリペプチド鎖は、約13アミノ酸のシグナル配列の後に、約512アミノ酸のセマフォリンドメイン、約65アミノ酸の免疫グロブリン様(Ig様)ドメイン、104アミノ酸のリジンに富んだストレッチ、約19アミノ酸の疎水性膜貫通領域、および110アミノ酸の細胞質尾部を含む。細胞質尾部中のチロシンリン酸化のためのコンセンサス部位は、SEMA4Dのチロシンキナーゼとの予測される会合を支持する(Schlossman, et al., Eds. (1995) Leucocyte Typing V (Oxford University Press, Oxford))。

40

【0080】

SEMA4Dは、少なくとも2種の受容体を有することが公知である。受容体の1種であるプレキシン-B1は、非リンパ系組織において発現し、SEMA4Dに対する高親和性(1 nM)受容体であることが示されている(Tamagnone et al., Cell 99:71-80 (1999))。プレキシン-B1シグナル伝達のSEMA4D刺激は、ニューロンの成長円錐虚脱を誘導すること、ならびにオリゴデンドロサイトの突起伸長虚脱およびアポトーシスを誘導することが示されている(Giraudon et al., J. Immunol. 172:1246-1255 (2004); Giraudon et al., NeuroMolecular Med. 7:207-216 (2005))。プレキシン-B1シグナル伝達は、SEMA4Dへの結合後に、R-Rasの不活性化を媒介して、細胞外マトリクスへのインテグリン媒介性付着の減少およびRhoAの活性化をもたらす。細胞骨格の再構成および細胞遊走をもたらす。Kruger et al., N

50

ature Rev. Mol. Cell Biol. 6:789-800 (2005) ; Pasterkamp, TRENDS in Cell Biology 15:61-64 (2005)を参照されたい。

【 0 0 8 1 】

リンパ系組織においては、CD72が、低親和性 (300nM) SEMA4D受容体として利用されている (Kumanogoh et al., Immunity 13:621-631 (2000)) 。 B細胞およびAPCがCD72を発現し、抗CD72抗体は、CD40により誘導されるB細胞応答およびCD23のB細胞切断の増強などの、sSEMA4Dと同一の作用の多くを有する。CD72は、多くの抑制性受容体と会合することができるチロシンホスファターゼSHP-1を動員することにより、B細胞応答の負の制御因子として働くと考えられている。SEMA4DのCD72との相互作用は、SHP-1の解離、およびこの負の活性化シグナルの損失を結果としてもたらす。SEMA4Dは、インビトロでT細胞刺激ならびにB細胞の凝集および生存を促進することが示されている。SEMA4D発現細胞またはsSEMA4Dの添加によって、インビトロでCD40により誘導されるB細胞増殖および免疫グロブリン産生が増強され、ならびにインビボの抗体応答が加速化される (Ishida et al., Inter. Immunol. 15:1027-1034 (2003) ; Kumanogoh and H. Kukutani, Trends in Immunol. 22:670-676 (2001)) 。 sSEMA4Dは、共刺激分子の上方制御およびIL-12の分泌の増加を含む、CD40により誘導されるDCの成熟を増強する。さらに、sSEMA4Dは、免疫細胞の遊走を阻害することができ、それは、遮断する抗SEMA4D抗体の添加により逆転させることができる (El habazi et al., J. Immunol. 166:4341-4347 (2001) ; Delaire et al., J. Immunol. 166:4348-4354 (2001)) 。

10

【 0 0 8 2 】

Sema4Dは、脾臓、胸腺、およびリンパ節を含むリンパ系器官において、ならびに、脳、心臓、および腎臓などの非リンパ系器官において高レベルで発現している。リンパ系器官において、Sema4Dは、休止T細胞上に豊富に発現しているが、休止B細胞、および樹状細胞 (DC) などの抗原提示細胞 (APC) 上には弱くしか発現していない。細胞の活性化により、SEMA4Dの表面発現および可溶性SEMA4D (sSEMA4D) の生成が増加する。

20

【 0 0 8 3 】

SEMA4Dの発現パターンにより、SEMA4Dが免疫系において重要な生理学的役割および病理学的役割を果たすことが示唆される。SEMA4Dは、B細胞の活性化、凝集、および生存を促進し ; CD40により誘導される増殖および抗体産生を増強し ; T細胞依存性抗原に対する抗体応答を増強し ; T細胞増殖を増加させ ; 樹状細胞の成熟およびT細胞を刺激する能力を増強し ; かつ脱髄および軸索変性に直接関係していることが、示されている (Shi et al., Immunity 13:633-642 (2000) ; Kumanogoh et al., J Immunol 169:1175-1181 (2002) ; およびWatanabe et al., J Immunol 167:4321-4328 (2001)) 。

30

【 0 0 8 4 】

SEMA4Dノックアウト (SEMA4D-/-) マウスは、SEMA4Dが体液性免疫応答および細胞性免疫応答の両方において重要な役割を果たすことの追加的な証拠を提供している。SEMA4D-/-マウスにおいて、非リンパ系組織の主要な異常性は知られていない。SEMA4D-/-マウス由来の樹状細胞 (DC) は、不十分な同種刺激能力を有し、sSEMA4Dの添加により救出することができる共刺激分子の発現の欠陥を示す。ミエリンオリゴデンドロサイト糖タンパク質特異的なT細胞が、SEMA4Dの非存在下では十分に生成されないため、SEMA4Dが欠損している (SEMA4D-/-) マウスは、ミエリンオリゴデンドロサイト糖タンパク質ペプチドにより誘導される実験的自己免疫性脳脊髄炎を発症することができない (Kumanogoh et al., J Immunol 169:1175-1181 (2002)) 。 有意な量の可溶性SEMA4Dがまた、自己免疫の傾向があるMRL/lprマウス (SLEなどの全身性自己免疫疾患のモデル) の血清中に検出されるが、正常マウスにおいては検出されない。さらに、sSEMA4Dのレベルは、自己抗体のレベルと相関し、年齢とともに増加する (Wang et al., Blood 97:3498-3504 (2001)) 。 可溶性SEMA4Dはまた、脱髄性疾患を有する患者の脳脊髄液および血清中に蓄積することも示されており、sSEMA4Dは、インビトロでヒト多能性神経前駆体 (Dev細胞) のアポトーシスを誘導し、かつ、ラットオリゴデンドロサイトの突起伸長を阻害するとともにそのアポトーシスを誘導する (Giraudon et al., J Immunol 172(2):1246-1255 (2004)) 。 このアポトーシス

40

50

は、抗SEMA4D MAbにより遮断された。

【0085】

IV. 抗SEMA4D抗体

SEMA4Dに結合する抗体は、当技術分野において記載されている。例えば、米国特許出願公開第2008/0219971 A1号、米国特許出願公開第2010/0285036 A1号、および米国特許出願公開第2006/0233793 A1号、国際特許出願である国際公開公報第93/14125号、国際公開公報第2008/100995号、および国際公開公報第2010/129917号、ならびにHerold et al., Int. Immunol. 7(1): 1-8 (1995)を参照されたく、これらの各々は、全体として参照により本明細書に組み入れられる。

【0086】

本出願は、概して、神経炎症性障害、例えば、CNS炎症性障害または神経変性障害を有する対象、例えばヒト患者において、血液脳関門透過性を低下させる方法であって、SEMA4Dに特異的に結合する抗体、またはその抗原結合断片、変異体、もしくは誘導体の投与を含む方法に関連する。ある特定の態様において、抗体は、SEMA4Dの1種または複数のその受容体、例えばプレキシン-B1との相互作用を遮断する。これらの特性を有する抗SEMA4D抗体を、本明細書中で提供される方法において使用することができる。使用することができる抗体は、米国特許出願公開第2010/0285036 A1号に完全に記載されているMAb VX15/2503、67、および76、ならびにその抗原結合断片、変異体、または誘導体を含むが、これらに限定されない。本明細書中で提供される方法において使用することができる追加的な抗体は、米国特許出願公開第2006/0233793 A1号に記載されているBD16およびBB18抗体、ならびにその抗原結合断片、変異体、もしくは誘導体；または、米国特許出願公開第2008/0219971 A1号に記載されているMAb 301、MAb 1893、MAb 657、MAb 1807、MAb 1656、MAb 1808、MAb 59、MAb 2191、MAb 2274、MAb 2275、MAb 2276、MAb 2277、MAb 2278、MAb 2279、MAb 2280、MAb 2281、MAb 2282、MAb 2283、MAb 2284、およびMAb 2285の任意、ならびにその任意の断片、変異体、もしくは誘導体を含む。ある特定の態様において、本明細書中で提供される方法における使用のための抗SEMA4D抗体は、ヒト、マウス、またはヒトおよびマウス両方のSEMA4Dに結合する。また、前述の抗体の任意と同一のエピトープに結合する抗体、および/または前述の抗体の任意がSEMA4Dに結合することを競合的に阻害する抗体も有用である。

【0087】

ある特定の態様において、本明細書中で提供される方法において有用である抗SEMA4D抗体、またはその抗原結合断片、変異体、もしくは誘導体は、参照抗SEMA4D抗体分子、例えば上記のもののアミノ酸配列と少なくとも約80%、約85%、約88%、約89%、約90%、約91%、約92%、約93%、約94%、または約95%の配列同一性を有するアミノ酸配列を有する。さらなる態様において、結合分子は、参照抗体と少なくとも約96%、約97%、約98%、約99%、または100%の配列同一性を共有する。

【0088】

別の態様において、本明細書中で提供される方法において有用である抗SEMA4D抗体、またはその抗原結合断片、変異体、もしくは誘導体は、免疫グロブリン重鎖可変ドメイン（VHドメイン）を含むか、それから本質的になるか、またはそれからなり、該VHドメインのCDRの少なくとも1個は、SEQ ID NO: 9または10のCDR1、CDR2、またはCDR3と少なくとも約80%、約85%、約90%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%、または同一であるアミノ酸配列を有する。

【0089】

別の態様において、本明細書中で提供される方法において有用である抗SEMA4D抗体、またはその抗原結合断片、変異体、もしくは誘導体は、免疫グロブリン重鎖可変ドメイン（VHドメイン）を含むか、それから本質的になるか、またはそれからなり、該VHドメインのCDRの少なくとも1個は、SEQ ID NO: 6、SEQ ID NO: 7、またはSEQ ID NO: 8と少なくとも約80%、約85%、約90%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%、または同一であるアミノ酸配列を有する。

【 0 0 9 0 】

別の態様において、本明細書中で提供される方法において有用である抗SEMA4D抗体、またはその抗原結合断片、変異体、もしくは誘導体は、免疫グロブリン重鎖可変ドメイン（VHドメイン）を含むか、それから本質的になるか、またはそれからなり、該VHドメインのCDRの少なくとも1個は、SEQ ID NO: 6、SEQ ID NO: 7、またはSEQ ID NO: 8と、1、2、3、4、または5個の保存的アミノ酸置換以外は同一であるアミノ酸配列を有する。

【 0 0 9 1 】

別の態様において、本明細書中で提供される方法において有用である抗SEMA4D抗体、またはその抗原結合断片、変異体、もしくは誘導体は、SEQ ID NO: 9またはSEQ ID NO: 10と少なくとも約80%、約85%、約90%、約91%、約92%、約93%、約94%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%、または100%同一であるアミノ酸配列を有するVHドメインを含むか、それから本質的になるか、またはそれからなり、該コードされたVHドメインを含む抗SEMA4D抗体は、SEMA4Dに特異的に、優先的に、または競合的に結合する。

10

【 0 0 9 2 】

別の態様において、本明細書中で提供される方法において有用である抗SEMA4D抗体、またはその抗原結合断片、変異体、もしくは誘導体は、免疫グロブリン軽鎖可変ドメイン（VLドメイン）を含むか、それから本質的になるか、またはそれからなり、該VLドメインのCDRの少なくとも1個は、SEQ ID NO: 17または18のCDR1、CDR2、またはCDR3と少なくとも約80%、約85%、約90%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%、または同一であるアミノ酸配列を有する。

20

【 0 0 9 3 】

別の態様において、本明細書中で提供される方法において有用である抗SEMA4D抗体、またはその抗原結合断片、変異体、もしくは誘導体は、免疫グロブリン軽鎖可変ドメイン（VLドメイン）を含むか、それから本質的になるか、またはそれからなり、該VLドメインのCDRの少なくとも1個は、SEQ ID NO: 14、SEQ ID NO: 15、またはSEQ ID NO: 16と少なくとも約80%、約85%、約90%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%、または同一であるアミノ酸配列を有する。

【 0 0 9 4 】

別の態様において、本明細書中で提供される方法において有用である抗SEMA4D抗体、またはその抗原結合断片、変異体、もしくは誘導体は、免疫グロブリン軽鎖可変ドメイン（VLドメイン）を含むか、それから本質的になるか、またはそれからなり、該VLドメインのCDRの少なくとも1個は、SEQ ID NO: 14、SEQ ID NO: 15、またはSEQ ID NO: 16と、1、2、3、4、または5個の保存的アミノ酸置換以外は同一であるアミノ酸配列を有する。

30

【 0 0 9 5 】

別の態様において、本明細書中で提供される方法において有用である抗SEMA4D抗体、またはその抗原結合断片、変異体、もしくは誘導体は、SEQ ID NO: 17またはSEQ ID NO: 18と少なくとも約80%、約85%、約90%、約91%、約92%、約93%、約94%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%、または100%同一であるアミノ酸配列を有するVLドメインを含むか、それから本質的になるか、またはそれからなり、該コードされたVLドメインを含む抗SEMA4D抗体は、SEMA4Dに特異的に、優先的に、または競合的に結合する。

40

【 0 0 9 6 】

別の態様において、本明細書中で提供される方法において有用である抗SEMA4D抗体、またはその抗原結合断片、変異体、もしくは誘導体は、免疫グロブリン重鎖可変ドメイン（VHドメイン）および免疫グロブリン軽鎖可変ドメイン（VLドメイン）を含むか、それから本質的になるか、またはそれからなり、該VHドメインのCDRの少なくとも1個は、SEQ ID NO: 9または10のCDR1、CDR2、またはCDR3と少なくとも約80%、約85%、約90%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%、または同一であるアミノ酸配列を有し、該VLドメインのCDRの少なくとも1個は、SEQ ID NO: 17または18のCDR1、CDR2、またはCDR3と少なくとも約80%、約85%、約90%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%、または同一であるアミノ酸配列を有する。

50

【0097】

別の態様において、本明細書中で提供される方法において有用である抗SEMA4D抗体、またはその抗原結合断片、変異体、もしくは誘導体は、免疫グロブリン重鎖可変ドメイン（VHドメイン）および免疫グロブリン軽鎖可変ドメイン（VLドメイン）を含むか、それから本質的になるか、またはそれからなり、該VHドメインのCDRの少なくとも1個は、SEQ ID NO: 6、SEQ ID NO: 7、またはSEQ ID NO: 8と、1、2、3、4、または5個の保守的アミノ酸置換以外は同一であるアミノ酸配列を有し、該VLドメインのCDRの少なくとも1個は、SEQ ID NO: 14、SEQ ID NO: 15、またはSEQ ID NO: 16と、1、2、3、4、または5個の保守的アミノ酸置換以外は同一であるアミノ酸配列を有する。

【0098】

別の態様において、本明細書中で提供される方法において有用である抗SEMA4D抗体、またはその抗原結合断片、変異体、もしくは誘導体は、SEQ ID NO: 9またはSEQ ID NO: 10と少なくとも約80%、約85%、約90%、約91%、約92%、約93%、約94%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%、または100%同一であるアミノ酸配列を有するVHドメイン、および、SEQ ID NO: 17またはSEQ ID NO: 18と少なくとも約80%、約85%、約90%、約91%、約92%、約93%、約94%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%、または100%同一であるアミノ酸配列を有するVLドメインを含むか、それから本質的になるか、またはそれからなり、該コードされたVHドメインおよびVLドメインを含む抗SEMA4D抗体は、SEMA4Dに特異的に、優先的に、または競合的に結合する。

【0099】

別の態様において、本明細書中で提供される方法において有用である抗SEMA4D抗体、またはその抗原結合断片、変異体、もしくは誘導体は、米国特許出願公開第2010/0285036 A 1号に完全に記載されている、MAb VX15/2503、67、または76のVLドメインの3個のCDRおよびVHドメインの3個のCDRを含むか、それから本質的になるか、またはそれからなる。いくつかの態様において、本明細書中で提供される方法において有用である抗SEMA4D抗体は、MAb VX15/2503または67を含む。

【0100】

また、本明細書中で提供される方法における使用のために、本明細書において記載されるような抗SEMA4D抗体、またはその抗原結合断片、変異体、もしくは誘導体をコードするポリペプチド、そのようなポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、そのようなポリヌクレオチドを含むベクター、およびそのようなベクターまたはポリヌクレオチドを含む宿主細胞も含まれ、すべては、本明細書中で記載される方法における使用のために、抗SEMA4D抗体、またはその抗原結合断片、変異体、もしくは誘導体を産生するためのものである。

【0101】

本発明の抗SEMA4D抗体の適した生物学的に活性を有する変異体を、本発明の方法において使用することができる。そのような変異体は、親抗SEMA4D抗体の望ましい結合特性を保持しているであろう。抗体変異体を作製する方法は、当技術分野において一般的に利用可能である。

【0102】

変異誘発およびヌクレオチド配列変更のための方法は、当技術分野において周知である。例えば、参照により本明細書に組み入れられる、Walker and Gaastra, eds. (1983) *Techniques in Molecular Biology* (MacMillan Publishing Company, New York); Kunkel, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:488-492 (1985); Kunkel et al., *Methods Enzymol.* 154:367-382 (1987); Sambrook et al. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor, N.Y.); 米国特許第4,873,192号; およびこれらにおいて引用される参考文献を参照されたい。関心対象のポリペプチドの生物学的活性に影響を及ぼさない適切なアミノ酸置換についての手引きは、全体として参照により本明細書に組み入れられるAtlas of Protein Sequence and Structure (Natl. Biomed. Res. Found., Washington, D.C.)の345-352ページにおけるDayhoffらのモデル(1978)において見出され得る。Day

10

20

30

40

50

hoffらのモデルは、適した保存的アミノ酸置換を決定するために、Point Accepted Mutation (PAM) アミノ酸類似度マトリクス (PAM 250マトリクス) を使用する。1個のアミノ酸を類似した特性を有する別のアミノ酸と交換するような、保存的置換が好ましい可能性がある。DayhoffらのモデルのPAM250マトリクスにより教示される保存的アミノ酸置換の例は、Gly Ala、Val Ile Leu、Asp Glu、Lys Arg、Asn Gln、およびPhe Trp Tyrを含むが、これらに限定されない。

【0103】

関心対象のポリペプチドである、抗SEMA4D結合分子、例えば、抗体またはその抗原結合断片の変異体を構築する際には、変異体が、例えば、本明細書において記載されるような、例えば、細胞の表面上に発現しているかまたは細胞により分泌されるSEMA4D、例えば、ヒト、マウス、またはヒトおよびマウス両方のSEMA4Dに特異的に結合することができる、およびSEMA4D遮断活性を有する、望ましい特性を保有し続けるように修飾がなされる。明らかに、変異体ポリペプチドをコードするDNA中に作製されるいずれの変異も、配列をリーディングフレームの外に置いてはならず、かつ好ましくは、mRNAの二次構造を生じ得る相補性領域を創出しないであろう。欧州特許出願公開第75,444号を参照されたい。

【0104】

抗SEMA4D結合分子、例えば、抗体、またはその抗原結合断片、変異体、もしくは誘導体の結合特異性を測定する方法は、標準的な競合結合アッセイ、T細胞またはB細胞による免疫グロブリン分泌をモニタリングするためのアッセイ、T細胞増殖アッセイ、アポトーシスアッセイ、ELISAアッセイなどを含むが、これらに限定されない。例えば、すべてが参照により本明細書に組み入れられる、国際公開公報第93/14125号；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)；およびGiraudon et al., J Immunol 172(2):1246-1255 (2004)において開示される、そのようなアッセイを参照されたい。

【0105】

本明細書において開示される定常領域、CDR、VHドメイン、またはVLドメインを含む任意の特定のポリペプチドが、別のポリペプチドと少なくとも約65%、約70%、約75%、約80%、約85%、約90%、約91%、約92%、約93%、約94%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%、またはさらに約100%同一であるか否かを、本明細書において議論する際、%同一性は、BESTFITプログラム (Wisconsin Sequence Analysis Package, Version 8 for Unix, Genetics Computer Group, University Research Park, 575 Science Drive, Madison, Wis. 53711) などの、しかしこれに限定されない、当技術分野において公知である方法およびコンピュータプログラム/ソフトウェアを用いて決定することができる。BESTFITは、2種の配列間の相同性の最も高いセグメントを見出すために、Smith and Waterman (1981) Adv. Appl. Math. 2:482-489の局所相同性アルゴリズムを使用する。特定の配列が、例えば、本発明による参照配列と95%同一であるか否かを判定するためにBESTFITまたは任意の他の配列アラインメントプログラムを用いる際は、パラメータを、当然、同一性のパーセンテージが参照ポリペプチド配列の完全長にわたって計算されるように、かつ参照配列中のアミノ酸の総数の5%までの相同性におけるギャップが許容されるように、設定する。

【0106】

本発明の目的で、パーセント配列同一性を、Smith-Waterman相同性検索アルゴリズムを使用して、12のギャップ開始ペナルティおよび2のギャップ伸長ペナルティ、62のBLOSUMマトリクスを有するアフィンギャップ検索を用いて決定してもよい。Smith-Waterman相同性検索アルゴリズムは、Smith and Waterman (1981) Adv. Appl. Math. 2:482-489において教示される。変異体は、例えば、参照抗SEMA4D抗体 (例えば、MAb VX15/2503、67、または76) と、わずか1~15個のアミノ酸残基、わずか1~10個のアミノ酸残基、例えば6~10個、わずか5個、わずか4個、3個、2個、またはさらに1個のアミノ酸残基が異なっているもよい。

10

20

30

40

50

【0107】

抗SEMA4抗体の定常領域は、多数の方式でエフェクター機能を変化させるように変異させることができる。例えば、Fc受容体に対する抗体結合を最適化するFc変異を開示している、米国特許第6,737,056B1号および米国特許出願公開第2004/0132101A1号を参照されたい。

【0108】

本明細書中で提供される方法において有用である、ある特定の抗SEMA4D抗体、またはその断片、変異体、もしくは誘導体において、Fc部分を、当技術分野において公知である技術を用いてエフェクター機能を低下させるように変異させることができる。例えば、定常領域ドメインの（点変異または他の手段を通した）欠失または不活性化は、循環する修飾抗体のFc受容体結合を低減させ、それにより腫瘍局在化を増加させることができる。他の場合には、本発明と一致する定常領域修飾は、補体結合を緩和し、従って血清半減期を低減させる。定常領域のさらに他の修飾を、ジスルフィド結合またはオリゴ糖部分を修飾して、抗原特異性または抗体柔軟性の増加による局在化の増強を可能にするために、使用することができる。結果として生じた修飾体の生理学的プロフィール、生物学的利用能、および他の生化学的作用、例えば、腫瘍局在化、生体内分布、および血清半減期は、過度の実験を伴わない周知の免疫学的技術を用いて、容易に測定および定量化することができる。本明細書中で提供される方法における使用のための抗SEMA4D抗体は、例えば、共有結合が抗体のその同起源のエピトープに対する特異的結合を妨げないような、任意のタイプの分子の抗体への共有結合により修飾されている誘導体を含む。例えば、しかし限定としてではなく、抗体誘導体は、例えば、グルコシル化、アセチル化、ペグ化、リン酸化、アミド化、公知の保護基/遮断基による誘導体化、タンパク質分解性切断、細胞性リガンドまたは他のタンパク質への結合などにより修飾されている抗体を含む。多数の化学修飾の任意は、特異的化学切断、アセチル化、ホルミル化などを含むがこれらに限定されない公知の技術により行うことができる。さらに、誘導体は、1個または複数の非古典的アミノ酸を含有することができる。

10

20

【0109】

「保存的アミノ酸置換」とは、その中でアミノ酸残基が類似した電荷をもつ側鎖を有するアミノ酸残基と置き換えられているものである。類似した電荷をもつ側鎖を有するアミノ酸残基のファミリーが、当技術分野において定義されている。これらのファミリーは、塩基性側鎖を有するアミノ酸（例えば、リジン、アルギニン、ヒスチジン）、酸性側鎖を有するアミノ酸（例えば、アスパラギン酸、グルタミン酸）、非荷電極性側鎖を有するアミノ酸（例えば、グリシン、アスパラギン、グルタミン、セリン、スレオニン、チロシン、システイン）、非極性側鎖を有するアミノ酸（例えば、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン）、分岐側鎖を有するアミノ酸（例えば、スレオニン、バリン、イソロイシン）、および芳香族側鎖を有するアミノ酸（例えば、チロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン）を含む。あるいは、変異を、例えば飽和変異誘発により、コード配列のすべてまたは一部に沿って無作為に導入することができ、結果として生じた変異体を、活性（例えば、抗SEMA4Dポリペプチドに結合する能力、SEMA4Dのその受容体との相互作用を遮断する能力、または、神経炎症性障害を有する対象、例えば患者においてBBB透過性を低下させる能力）を保持する変異体を同定するために生物学的活性についてスクリーニングすることができる。

30

40

【0110】

例えば、抗体分子のフレームワーク領域のみまたはCDR領域のみに変異を導入することが可能である。導入された変異は、サイレント変異または中立ミスセンス変異である、すなわち、抗原に結合する抗体の能力に対して何も効果を有さないか、またはほとんど効果を有さないことができる。これらのタイプの変異は、コドン使用頻度を最適化するため、またはハイブリドーマの抗体産生を改善するために有用であり得る。あるいは、非中立ミスセンス変異は、抗原に結合する抗体の能力を変更してもよい。当業者は、抗原結合活性

50

の無変更または結合活性の変更（例えば、抗原結合活性の改善または抗体特異性の変化）などの望ましい特性を有する変異体分子を、設計しかつ試験することができるであろう。変異誘発後に、コードされたタンパク質を、日常的に発現させてもよく、コードされたタンパク質の機能的活性および／または生物学的活性（例えば、SEMA4Dポリペプチドの少なくとも1個のエピトープに免疫特異的に結合する能力）を、本明細書において記載される技術を用いて、または当技術分野において公知である日常的な修飾技術により、測定することができる。

【0111】

ある特定の態様において、本明細書中で提供される方法における使用のための抗SEMA4D抗体は、少なくとも1個の最適化された相補性決定領域（CDR）を含む。「最適化されたCDR」により、CDRが、最適化されたCDRを含む抗SEMA4D抗体に付与される結合親和性および／または抗SEMA4D活性を改善するように、修飾されかつ最適化されていることが意図される。「抗SEMA4D活性」または「SEMA4D遮断活性」は、SEMA4Dと関連する以下の活性の1つまたは複数を調節する活性を含むことができる：B細胞の活性化、凝集、および生存；CD40により誘導される増殖および抗体産生；T細胞依存性抗原に対する抗体応答；T細胞もしくは他の免疫細胞の増殖；樹状細胞の成熟；脱髄および軸索変性；多能性神経前駆体および／もしくはオリゴデンドロサイトのアポトーシス；内皮細胞遊走の誘導；自発性単球遊走の阻害；細胞表面プレキシシン-B1もしくは他の受容体に対する結合、または、可溶性SEMA4DもしくはSEMA4D+細胞の表面上に発現しているSEMA4Dと関連する任意の他の活性。抗SEMA4D活性はまた、中枢神経系（CNS）および末梢神経系（PNS）の炎症性疾患を含む神経炎症性疾患を含むが、必ずしもこれらに限定されない、SEMA4Dの発現または過剰発現と関連する疾患の発生率または重症度の低下に帰することができる。

【0112】

マウス抗SEMA4D MAbs BD16およびBB18に基づく最適化された抗体の例は、米国特許出願公開第2008/0219971 A1号、国際特許出願である国際公開公報第93/141251号、およびHerold et al., Int. Immunol. 7(1): 1-8 (1995)に記載され、これらの各々は、全体として参照により本明細書に組み入れられる。修飾は、抗SEMA4D抗体が、SEMA4D抗原についての特異性を保持し、かつ改善された結合親和性および／または改善された抗SEMA4D活性を有するように、CDR内のアミノ酸残基の置換を含んでもよい。

【0113】

V. 治療用抗SEMA4D抗体および抗プレキシシンB1抗体を用いた処置法

本発明の方法は、神経炎症性障害を有する対象において血液脳関門透過性を低下させるための、SEMA4DのSEMA4D受容体との相互作用の阻害物質、例えば、抗SEMA4D結合分子、抗プレキシシンB1結合分子、またはこれらの組み合わせ、例えば、その抗原結合断片、変異体、および誘導体を含む抗体の使用に向けられる。ある特定の態様において、神経炎症性障害は、例えば、多発性硬化症、筋萎縮性側索硬化症、てんかん、アルツハイマー病、パーキンソン病、髄膜炎、脳浮腫、脳外傷、または卒中である。ある特定の態様において、内皮細胞は、SEMA4D受容体を発現し；ある特定の態様において、該受容体はプレキシシン-B1である。以下の議論は、抗SEMA4D抗体、抗プレキシシンB1抗体、およびこれらの組み合わせの投与に言及するが、本明細書において記載される方法はまた、本発明の抗SEMA4D抗体または抗プレキシシンB1抗体の望ましい特性を保持する、例えば、SEMA4D、例えば、ヒト、マウス、またはヒトおよびマウスのSEMA4Dに特異的に結合することができる、SEMA4D中和活性を有する、ならびに／またはSEMA-4Dのその受容体、例えばプレキシシン-B1との相互作用を遮断する、これらの抗SEMA4D抗体または抗プレキシシンB1抗体の抗原結合断片、変異体、および誘導体にも適用可能である。

【0114】

1つの態様において、処置は、本明細書において記載されるような抗SEMA4D結合分子、抗プレキシシンB1結合分子、またはこれらの組み合わせ、例えば、抗体またはその抗原結合断片の、神経炎症性障害を有するか、またはそれを発症するリスクを有する患者への適用または投与を含む。別の態様において、処置はまた、抗SEMA4D結合分子、抗プレキシシンB1

結合分子、またはこれらの組み合わせ、例えば、抗体またはその抗原結合断片を含む薬学的組成物の、神経炎症性障害を有するか、またはそれを発症するリスクを有する患者への適用または投与を含むようにも意図される。SEMA4Dの内皮細胞上の受容体との相互作用のために、抗SEMA4D結合分子、抗プレキシシンB1結合分子、またはこれらの組み合わせの適用または投与は、血液脳関門の血液側で起きると期待されることが、認識されるべきである。抗SEMA4D結合分子、抗プレキシシンB1結合分子、またはこれらの組み合わせを、例えば、静脈内投与を含むがこれに限定されない、血液側に曝露する経路により投与することによって、抗SEMA4D結合分子、抗プレキシシンB1結合分子、またはこれらの組み合わせは、SEMA4Dの内皮細胞により発現されるSEMA4D受容体との相互作用を阻害することが可能になるであろう。

10

【0115】

本明細書において記載されるような抗SEMA4D結合分子、抗プレキシシンB1結合分子、またはこれらの組み合わせ、例えば、抗体またはその結合断片は、種々の神経炎症性障害の処置のために有用である。いくつかの態様において、神経炎症性障害の処置は、BBBの透過性の低減、または低下を含むように意図される。他の態様において、神経炎症性障害の処置は、BBBの抵抗率の増大を含むように意図される。他の態様において、神経炎症性障害の処置は、BBB上に存在する内皮細胞の数、密度、および/または濃度の増大を含むように意図される。他の態様において、神経炎症性障害の処置は、内皮細胞の形態もしくは機能の変化、または、BBBを形成する内皮細胞もしくは星状細胞の間での、または内皮細胞と星状細胞との間の相互作用の変化を含むように意図される。

20

【0116】

1つの態様において、本発明は、特に、BBBの崩壊、またはBBBの透過性の増大を阻害、低減、予防、または最小化する神経炎症性障害の処置または防御における使用のための薬剤としての、抗SEMA4D結合分子、抗プレキシシンB1結合分子、またはこれらの組み合わせ、例えば、抗体、またはその抗原結合断片、変異体、もしくは誘導体の使用に関連する。

【0117】

本発明の方法に従って、本明細書において他の場所で定義されるような、少なくとも1つの抗SEMA4D結合分子または抗プレキシシンB1結合分子、例えば、抗体、またはその抗原結合断片、変異体、もしくは誘導体を、神経炎症性障害に関して正の治療応答を促進するために使用することができる。神経炎症性障害に関する「正の治療応答」とは、これらの抗体の、抗炎症活性、抗アポトーシス活性などに関連する疾患の改善、および/または、疾患と関連する症候の改善を含むように意図される。すなわち、抗増殖効果、SEMA4D発現細胞のさらなる増殖の予防、炎症性サイトカイン、接着分子、プロテアーゼ、免疫グロブリン（SEMA4Dを有する細胞がB細胞である場合）、これらの組み合わせなどの分泌の低減を含むがこれに限定されない、炎症性応答の低減、抗炎症性タンパク質の産生の増加、自己反応性細胞の数の低減、免疫寛容の増加、自己反応性細胞の生存の阻害、アポトーシスの低減、内皮細胞遊走の低減、自発性単球遊走の増加、sSEMA4DまたはSEMA4D発現細胞の刺激により媒介される1つまたは複数の症候の低減および/または減少を、観察することができる。そのような正の治療応答は、投与の経路に限定されず、かつ、ドナー、ドナー組織（例えば器官灌流など）、宿主、これらの任意の組み合わせなどへの投与を含んでもよい。特に、本明細書において提供される方法は、患者において神経炎症性障害の発症を阻害すること、予防すること、低減させること、緩和すること、または少なくすることに向けられる。従って、例えば、疾患の改善は、臨床的に観察可能な症候の欠如、BBB透過性の低下、BBB上に存在する内皮細胞の数、密度、もしくは濃度の増大、内皮細胞の形態もしくは機能の変化、または、BBBを形成する内皮細胞および周細胞もしくは星状細胞の間での、または内皮細胞、周細胞、および星状細胞の間の相互作用の変化として、特徴決定されてもよい。

30

40

【0118】

BBBの透過性の変化は、インビトロのモデルを用いて測定することができる。ある特定の態様において、動的インビトロDIV-BBBモデルを使用することができる。Cuculloらは、

50

血行動態変化および全身性炎症がいかに脳微小血管系の完全性に影響を及ぼすかを研究するための、正常な成体ヒト脳微小血管内皮細胞およびヒト成体星状細胞から構成されるDIV-BBBモデルを提示している。具体的には、このモデルは、カートリッジ、または中空管を使用して、血液脳関門の血液側を表すカートリッジの内側、および血液脳関門の脳側を表すカートリッジの外側を有する、血液脳関門を表す。カートリッジの内側は、成体ヒト脳微小血管内皮細胞で裏打ちされ、外側は、ヒト成体星状細胞で裏打ちされている。SEMA4Dなどの血液脳関門修飾剤をカートリッジの管腔中に導入する際に、管の内側と外側との間の電流を、下記に記載される経内皮電気抵抗測定を用いてモニタリングする。このモデルの1つの態様は、血管区画と実質区画との間の経内皮細胞輸送を可能にする経毛細管微小孔を有する新規性をもつ。使用されるインビトロDIV-BBBモデル、ならびにヒト微小血管内皮細胞および成体星状細胞の派生および培養の詳細な記載は、例えば、Cucullo et al., Brain Research. 951 243-254 (2002); およびCucullo et al., Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism. 2:767-77 (2011)において見出すことができる。当業者は、先行技術において疾患におけるBBBの役割の研究のために他のBBBモデルが記載されており、かつ有用に使用されていること、ならびに、本開示はいずれの1つの特定のモデルにも限定されるべきではないことを認識するであろうことが、認められるべきである。

10

【0119】

BBBの透過性は、経内皮電気抵抗測定 (TEER) を用いてモニタリングすることができる。TEERを使用して、リアルタイムでBBBの完全性をモニタリングし、それはBBBの透過性と相関することが示されている。TEERシステムは、複数のカートリッジを立て続けに測定するために電子的多重化を使用し、組織培養二重層の完全性および生存度を迅速にかつ確実に評価する (Cucullo et al., 2002; Cucullo et al., 2010; Santaguida et al., 2006)。操作中に、システムは、管腔区画および管腔外 (extraluminal) 区画において各カートリッジ中に挿入された励起電極を横切る励起電圧 (0.06V) を印加する。マイクロコントローラが、物理的パラメータから関門の (cm^2 あたりの) 抵抗率および静電容量をコンピュータで計算する。静電容量の値は、電圧および電流の波形の比較により算出する。2個の波形のピークからピークまでの遅延は、弓状張力として発現される静電容量値に比例する。TEERを、最初の設定から各実験の過程を通して測定することができる。

20

【0120】

抗SEMA4D結合分子、抗プレキシシンB1結合分子、またはこれらの組み合わせ、例えば、抗体、またはその抗原結合断片、変異体、もしくは誘導体を、神経炎症性障害のための少なくとも1つまたは複数の他の処置と組み合わせて使用することができ；追加的な治療は、抗SEMA4D結合分子、抗プレキシシンB1結合分子、またはこれらの組み合わせ、例えば、抗体、またはその抗原結合断片、変異体、もしくは誘導体の治療の前、その間、またはその後施される。従って、併用療法が、別の治療剤の投与と組み合わせて、抗SEMA4D結合分子、抗プレキシシンB1結合分子、またはこれらの組み合わせ、例えば、抗体、またはその抗原結合断片、変異体、もしくは誘導体の投与を含む場合、本発明の方法は、別々の製剤または単一の薬学的製剤を用いる、同時投与またはいずれかの順番での連続的投与での、共投与を包含する。

30

【0121】

VI. 薬学的組成物および投与法

抗SEMA4D結合分子、抗プレキシシンB1結合分子、またはこれらの組み合わせ、例えば、抗体、またはその抗原結合断片、変異体、もしくは誘導体を調製する方法、およびこれらを必要とする対象に投与する方法は、当業者に周知であるか、または当業者により容易に決定される。抗SEMA4D結合分子、抗プレキシシンB1結合分子、またはこれらの組み合わせ、例えば、抗体、またはその抗原結合断片、変異体、もしくは誘導体の投与の経路は、例えば、経口であるか、非経口であるか、吸入によるか、または局所であることができる。本明細書において使用される非経口という用語は、例えば、静脈内投与、動脈内投与、腹腔内投与、筋肉内投与、皮下投与、直腸投与、または膣投与を含む。投与のこれらの形態のすべてが、本発明の範囲内であると明らかに企図されるが、投与のための形態の例は、注射

40

50

用、特に、静脈内または動脈内の注射または点滴用の溶液であろう。注射に適した薬学的組成物は、緩衝剤（例えば、酢酸緩衝剤、リン酸緩衝剤、またはクエン酸緩衝剤）、界面活性剤（例えばポリソルベート）、任意で安定剤（例えばヒトアルブミン）などを含むことができる。しかしながら、本明細書における教示と適合する他の方法において、抗SEMA4D結合分子、抗プレキシシンB1結合分子、またはこれらの組み合わせ、例えば、抗体、またはその抗原結合断片、変異体、もしくは誘導体を、有害な細胞集団の部位に直接送達し、それにより患部組織の治療剤への曝露を増加させることができる。

【0122】

本明細書において議論される際、抗SEMA4D結合分子、抗プレキシシンB1結合分子、またはこれらの組み合わせ、例えば、抗体、またはその抗原結合断片、変異体、もしくは誘導体は、神経炎症性障害のインビボ処置のための薬学的有効量で投与することができる。この点において、開示される結合分子を、投与を容易にし、かつ活性剤の安定性を促進するように製剤化できることが、認識されるであろう。ある特定の態様において、本発明に従う薬学的組成物は、生理食塩水、非毒性緩衝剤、保存薬などのような、薬学的に許容される非毒性の滅菌担体を含む。本出願の目的で、抗SEMA4D結合分子、抗プレキシシンB1結合分子、またはこれらの組み合わせ、例えば、抗体、またはその抗原結合断片、変異体、もしくは誘導体の薬学的有効量は、標的に対する有効な結合を達成するため、および有益性を達成するため、例えば、神経炎症性障害を有する患者においてBBBの透過性を低下させるために十分な量を意味するように保たれるべきである。

【0123】

本発明において使用される薬学的組成物は、例えば、イオン交換体、アルミナ、ステアリン酸アルミニウム、レシチン、ヒト血清アルブミンなどの血清タンパク質、リン酸塩などの緩衝物質、グリシン、ソルビン酸、ソルビン酸カリウム、飽和植物脂肪酸の部分グリセリド混合物、水、塩または電解質、例えば、硫酸プロタミン、リン酸水素二ナトリウム、リン酸水素カリウム、塩化ナトリウム、亜鉛塩、コロイド状シリカ、三ケイ酸マグネシウム、ポリビニルピロリドン、セルロースベースの物質、ポリエチレングリコール、カルボキシメチルセルロースナトリウム、ポリアクリラート、ワックス、ポリエチレン-ポリオキシプロピレン-ブロックポリマー、ポリエチレングリコール、および羊毛脂を含む、薬学的に許容される担体を含む。

【0124】

非経口投与のための調製物は、滅菌の水性または非水性の溶液、懸濁液、および乳濁液を含む。非水性溶媒の例は、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、オリーブ油などの植物油、およびオレイン酸エチルなどの注射可能な有機エステルである。水性担体は、例えば、水、食塩水および緩衝媒体を含むアルコール性/水性溶液、乳濁液、または懸濁液を含む。本発明において、薬学的に許容される担体は、0.01~0.1 Mおよび好ましくは0.05 Mのリン酸緩衝液または0.8%の食塩水を含むが、これらに限定されない。他の一般的な非経口賦形剤は、リン酸ナトリウム溶液、リンガーデキストロース、デキストロースおよび塩化ナトリウム、乳酸加リンガー溶液、または固定油を含む。静脈内賦形剤は、リンガーデキストロースに基づくものなどのような、流体および栄養補液、電解質補液を含む。例えば、抗微生物薬、抗酸化薬、キレート剤、および不活性ガスなどのような保存薬および他の添加物もまた、存在してもよい。

【0125】

より詳細に、注射可能な使用に適した薬学的組成物は、滅菌の注射可能な溶液または分散液の即時調製のための滅菌水性溶液（水溶性の場合）または分散液および滅菌粉末を含む。そのような場合に、組成物は滅菌でなければならず、かつ、易注射性（easy syringability）が存在する程度に流動性であるべきである。組成物は、製造および貯蔵の条件下で安定であるべきであり、かつ好ましくは、細菌および真菌などの微生物の汚染作用に対して保護されるであろう。担体は、例えば、水、エタノール、ポリオール（例えば、グリセロール、プロピレングリコール、および液体ポリエチレングリコールなど）、およびこれらの適当な混合物を含有する、溶媒または分散媒であることができる。妥当な流動性を

、例えば、レシチンなどのコーティングの使用により、分散液の場合には必要な粒子サイズの維持により、および界面活性剤の使用により、維持することができる。本明細書において開示される治療法における使用に適した製剤は、Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Publishing Co.) 16th ed. (1980)に記載されている。

【0126】

微生物の作用の予防は、種々の抗細菌剤および抗真菌剤、例えば、パラベン、クロロブタノール、フェノール、アスコルビン酸、チメロサルなどにより達成することができる。多くの場合に、等張剤、例えば、糖、ポリアルコール、例えば、マンニトール、ソルビトール、または塩化ナトリウムを組成物中に含むことが好ましいであろう。注射可能な組成物の長期の吸収を、組成物中に吸収を遅延させる剤、例えば、モノステアリン酸アルミニウムおよびゼラチンを含むことによりもたすことができる。

10

【0127】

いずれの場合にも、滅菌の注射可能な溶液を、活性化合物を（例えば、抗SEMA4D抗体、またはその抗原結合断片、変異体、もしくは誘導体をそれ自体でまたは他の活性剤と組み合わせ）、必要に応じて本明細書において列挙される成分の1つまたは組み合わせを有する適切な溶媒中に必要量組み入れ、その後濾過滅菌することにより、調製することができる。概して、分散液は、活性化合物を、基本的な分散媒および上記で列挙されるもの由来の必要な他の成分を含有する滅菌賦形剤中に組み入れることにより、調製する。滅菌の注射可能な溶液の調製のための滅菌粉末の場合、好ましい調製法は、真空乾燥および凍結乾燥であり、活性成分に加えて任意の追加的な望ましい成分の粉末を、事前に濾過滅菌したその溶液から生じる。注射用の調製物を、当技術分野において公知である方法に従って無菌的条件下で、加工処理し、アンプル、袋、瓶、シリンジ、またはバイアルなどの容器中に満たし、密封する。さらに、調製物を、キットの形態でパッケージングして、販売してもよい。そのような製造品は、付随する組成物が、疾患または障害を患うかまたはその素因を有する対象を処置するために有用であることを示す、標識またはパッケージ挿入物を有することができる。

20

【0128】

非経口製剤は、単回ボラス用量、注入、またはその後維持用量が続く負荷ボラス用量であることができる。これらの組成物は、特異的な固定された間隔もしくは可変の間隔で、例えば1日に1回、または「必要に応じて」随時、投与することができる。

30

【0129】

本発明において使用されるある特定の薬学的組成物は、例えば、カプセル剤、錠剤、水性懸濁液、または溶液を含む許容される剤形において経口投与することができる。ある特定の薬学的組成物はまた、鼻エアロゾルまたは吸入によっても投与することができる。そのような組成物は、ベンジルアルコールまたは他の適当な保存薬、生物学的利用能を増強するための吸収促進剤、および/または他の従来の可溶化剤もしくは分散剤を使用して、食塩水中の溶液として調製することができる。

【0130】

単一剤形を産生するために担体材料と組み合わせられるべき抗SEMA4D結合分子、抗プレキシニンB1結合分子、またはこれらの組み合わせ、例えば、抗体、またはその断片、変異体、もしくは誘導体の量は、処置される宿主、および投与の特定の様式に応じて変動すると考えられる。組成物は、単一用量として、複数用量として、または確立された期間にわたって注入において投与することができる。投薬レジメンはまた、最適な望ましい応答（例えば、治療応答または防御応答）を提供するように調整することもできる。

40

【0131】

本開示の範囲に沿って、抗SEMA4D抗体、またはその抗原結合断片、変異体、もしくは誘導体を、前述の処置の方法に従って治療効果を生じるのに十分な量で、ヒトまたは他の動物に投与することができる。抗SEMA4D抗体、またはその抗原結合断片、変異体、もしくは誘導体は、公知の技術に従って本発明の抗体を従来の薬学的に許容される担体または希釈剤と組み合わせることにより調製された従来の剤形において、そのようなヒトまたは他の

50

動物に投与することができる。薬学的に許容される担体または希釈剤の形態および特徴は、それと組み合わせられるべき活性成分の量、投与の経路、および他の周知の変数により規定されることが、当業者により認識されるであろう。当業者はさらに、本発明の抗SEMA4D結合分子、抗プレキシシンB1結合分子、またはこれらの組み合わせ、例えば、抗体、またはその抗原結合断片、変異体、もしくは誘導体の1つまたは複数の種を含むカクテルを使用できることを、認識するであろう。

【0132】

「治療的有效用量もしくは量」または「有効量」により、投与された際に、処置されるべき疾患を有する患者の処置に関して正の治療応答、例えば、BBBの透過性の低下、BBBの抵抗率の増大、BBB上に存在する内皮細胞の数、密度、もしくは濃度の増大、内皮細胞における形態もしくは機能の変化、または、BBBを形成する内皮細胞もしくは星状細胞の間での、または内皮細胞と星状細胞との間の相互作用の変化をもたらす、抗SEMA4D結合分子、抗プレキシシンB1結合分子、またはこれらの組み合わせ、例えば、抗体、またはその抗原結合断片、変異体、もしくは誘導体の量が意図される。

10

【0133】

BBB透過性の低下のための、本発明の組成物の治療的有效用量は、投与の手段、標的部位、患者の生理学的状態、患者がヒトであるかまたは動物であるか、投与される他の薬剤、および処置が防御的であるかまたは治療的であるかを含む、多くの異なる要因に応じて変動する。ある特定の態様において、患者はヒトであるが、遺伝子導入哺乳動物を含む非ヒト哺乳動物もまた、処置することができる。処置投薬量を、安全性および有効性を最適化するように、当業者に公知である日常的な方法を用いて滴定してもよい。

20

【0134】

投与されるべき少なくとも1つの抗SEMA4D結合分子、抗プレキシシンB1結合分子、またはこれらの組み合わせ、例えば、抗体、またはその結合断片、変異体、もしくは誘導体の量は、本発明の開示を考慮して過度の実験を伴わずに、当業者が容易に決定する。投与の様式、および少なくとも1つの抗SEMA4D結合分子、抗プレキシシンB1結合分子、またはこれらの組み合わせ、例えば、抗体、その抗原結合断片、変異体、または誘導体のそれぞれの量に影響を及ぼす要因は、疾患の重症度、疾患の履歴、ならびに治療を受ける個体の年齢、身長、体重、健康、および身体状態を含むが、これらに限定されない。同様に、投与されるべき抗SEMA4D結合分子、抗プレキシシンB1結合分子、またはこれらの組み合わせ、例えば、抗体、またはその断片、変異体、もしくは誘導体の量は、投与の様式、および、対象がこの剤の単一用量を受けるかまたは複数用量を受けるかに依存するであろう。

30

【0135】

本発明はまた、神経炎症性障害を処置するために対象を処置する薬剤であって、少なくとも1つの他の療法で前処置されている対象において使用される薬剤の製造における、抗SEMA4D結合分子、抗プレキシシンB1結合分子、またはこれらの組み合わせ、例えば、本発明の抗体、またはその抗原結合断片、変異体、もしくは誘導体の使用も提供する。「前処置される」または「前処置」により、対象が、抗SEMA4D結合分子、抗プレキシシンB1結合分子、またはこれらの組み合わせ、例えば、抗体、またはその抗原結合断片、変異体、もしくは誘導体を含む薬剤を受ける前に、1つまたは複数の他の治療を受けている（例えば、少なくとも1つの他の神経炎症性療法で処置されている）ことが意図される。「前処置される」または「前処置」とは、抗SEMA4D結合分子、例えば、本明細書において開示されるモノクローナル抗体VX15/2503、またはその抗原結合断片、変異体、もしくは誘導体を含む薬剤での処置の開始の前の2年以内、18か月以内、1年以内、6か月以内、2か月以内、6週間以内、1か月以内、4週間以内、3週間以内、2週間以内、1週間以内、6日以内、5日以内、4日以内、3日以内、2日以内、またはさらに1日以内に少なくとも1つの他の療法で処置されている対象を含む。対象が、1つまたは複数の先の療法での前処置に対して応答者であったことは必要ではない。従って、抗SEMA4D結合分子、抗プレキシシンB1結合分子、またはこれらの組み合わせ、例えば、抗体、またはその抗原結合断片、変異体、もしくは誘導体を含む薬剤を受ける対象は、先の療法での前処置に対して、または前処置が複数の療法

40

50

を含んだ先の療法の1つもしくは複数に対して、応答していてもよく、または応答できていなくてもよい。

【 0 1 3 6 】

本発明の実施は、別の方法で指示されない限り、当技術分野の技能内である、細胞生物学、細胞培養、分子生物学、遺伝子導入生物学、微生物学、組み換えDNA、および免疫学の従来の技術を使用するであろう。そのような技術は、文献において完全に説明されている。例えば、Sambrook et al., ed. (1989) *Molecular Cloning A Laboratory Manual* (2nd ed.; Cold Spring Harbor Laboratory Press); Sambrook et al., ed. (1992) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, (Cold Springs Harbor Laboratory, NY); D. N. Glover ed., (1985) *DNA Cloning*, Volumes I and II; Gait, ed. (1984) *Oligonucleotide Synthesis*; Mullis et al. 米国特許第4,683,195号; Hames and Higgins, eds. (1984) *Nucleic Acid Hybridization*; Hames and Higgins, eds. (1984) *Transcription And Translation*; Freshney (1987) *Culture Of Animal Cells* (Alan R. Liss, Inc.); Immobilized Cells And Enzymes (IRL Press) (1986); Perbal (1984) *A Practical Guide To Molecular Cloning*; 論文である *Methods In Enzymology* (Academic Press, Inc., N.Y.); Miller and Calos eds. (1987) *Gene Transfer Vectors For Mammalian Cells*, (Cold Spring Harbor Laboratory); Wu et al., eds., *Methods In Enzymology*, Vols. 154 and 155; Mayer and Walker, eds. (1987) *Immunochemical Methods In Cell And Molecular Biology* (Academic Press, London); Weir and Blackwell, eds., (1986) *Handbook Of Experimental Immunology*, Volumes I-IV; *Manipulating the Mouse Embryo*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., (1986); および Ausubel et al. (1989) *Current Protocols in Molecular Biology* (John Wiley and Sons, Baltimore, Md.) を参照されたい。

【 0 1 3 7 】

抗体工学の一般原理は、Borrebaeck, ed. (1995) *Antibody Engineering* (2nd ed.; Oxford Univ. Press) に示されている。タンパク質工学の一般原理は、Rickwood et al., eds. (1995) *Protein Engineering, A Practical Approach* (IRL Press at Oxford Univ. Press, Oxford, Eng.) に示されている。抗体および抗体-ハプテン結合の一般原理は、Nisoff (1984) *Molecular Immunology* (2nd ed.; Sinauer Associates, Sunderland, Mass.); および Steward (1984) *Antibodies, Their Structure and Function* (Chapman and Hall, New York, N.Y.) に示されている。さらに、当技術分野において公知であり、かつ具体的に記載されていない免疫学における標準的な方法は、概して、*Current Protocols in Immunology*, John Wiley & Sons, New York; Stites et al., eds. (1994) *Basic and Clinical Immunology* (8th ed; Appleton & Lange, Norwalk, Conn.)、および Mishell and Shiigi (eds) (1980) *Selected Methods in Cellular Immunology* (W.H. Freeman and Co., NY) におけるように従う。

【 0 1 3 8 】

免疫学の一般原理を示す標準的な参照著作物は、*Current Protocols in Immunology*, John Wiley & Sons, New York; Klein (1982) J., *Immunology: The Science of Self-Non self Discrimination* (John Wiley & Sons, NY); Kennett et al., eds. (1980) *Monoclonal Antibodies, Hybridoma: A New Dimension in Biological Analyses* (Plenum Press, NY); Campbell (1984) "Monoclonal Antibody Technology" in *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology*, ed. Burden et al., (Elsevier, Amsterdam); Goldsby et al., eds. (2000) *Kuby Immunology* (4th ed.; H. Freeman & Co.); Roitt et al. (2001) *Immunology* (6th ed.; London: Mosby); Abbas et al. (2005) *Cellular and Molecular Immunology* (5th ed.; Elsevier Health Sciences Division); Kontermann and Dubel (2001) *Antibody Engineering* (Springer Verlag); Sambrook and Russell (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Press); Lewin (2003) *Genes VIII* (Prentice Hall 2003); Harlow and Lane (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Press); Dieffenbach and Dveksler (2003) *PCR*

Primer (Cold Spring Harbor Press)を含む。

【0139】

上記で引用された参考文献のすべて、および本明細書において引用されるすべての参考文献は、全体として参照により本明細書に組み入れられる。

【0140】

以下の実施例は、例証として提供され、限定としては提供されない。

【実施例】

【0141】

以下の実施例は、BBBの崩壊を低減させるかまたは予防する際、すなわちBBBの透過性の低下における抗SEMA4D抗体 (VX15/2503) の有効性を、インビトロDIV-BBBモデルおよびインビボEAEモデルにおいて実証する。インビボアルツハイマー病モデルの実験もまた、本明細書において開示される。インビトロDIV-BBBモデルについての詳細な記載を、例えば、Cucullo et al., Brain Research. 951 243-254 (2002); およびCucullo et al., Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism. 1-11 (2010)において見出すことができる。インビボEAEモデルおよびインビボアルツハイマー病モデルは、それぞれ、例えば、Miller et al., Curr Protoc Immunol. CHAPTER: Unit-15.1, 2007; Colton et al., J Alzheimers Dis 15:571-587, 2008、およびWilcock et al., J. Neuroscience, 29:7957-7965, 2009において開示されている。

【0142】

実施例1: インビトロDIV-BBBモデルにおける、SEMA4Dにより誘導されるBBBの崩壊後にBBBの完全性を回復する、抗SEMA4D結合分子、例えば、抗体、またはその抗原結合断片、変異体、もしくは誘導体、例えばVX15/2503の能力の試験
実験設計

動的インビトロBBB (「DIV-BBB」) モデルを行って、BBBの完全性に対する組み換えヒトSEMA4D (huSEMA4D-his) およびVX15/2503 (全体として参照により本明細書に組み入れられる米国特許出願公開第2010/0285036 A1号において詳細に記載されている) の作用を研究した。2個のDIV-BBBカートリッジを、モデルにおいて試験した。基本的な実験設計を、図1に示す。増大する濃度の組み換えSEMA4D (rSEMA4D) を、12時間間隔で管腔中に添加し、平衡化させた (およそ12時間 / 濃度)。rSEMA4Dを、時間0で0.05 µg/mlの濃度で管腔中に最初に添加した。rSEMA4Dの濃度を、各間隔で10倍に、例えば、12時間で0.5 µg/ml、24時間で5.0 µg/ml、36時間で50.0 µg/mlに増大させた。TEER測定値を、変動する濃度のrSEMA4DでのBBBの透過性の変化の反映として、各間隔の間に取得した。36時間で50.0 µg/mlの最終用量のrSEMA4Dの添加後に、VX15/2503を、48時間で250 µg/mlの濃度で管腔中に添加した。VX15/2503の添加の24時間後である72時間で、BBBの透過性を再び測定した。

【0143】

経内皮電気抵抗測定 (TEER) を使用して、リアルタイムでBBBの完全性をモニタリングした。上述のように、TEERシステムは、複数のカートリッジを立て続けに測定するために電子的多重化を使用し、組織培養二重層の完全性および生存度を迅速にかつ確実に評価する (Cucullo et al., 2002; Santaguida et al, 2006)。この動的インビトロモデルにおいて、カートリッジ、または中空管を、血液脳関門の血液側を表すカートリッジの内側、および血液脳関門の脳側を表すカートリッジの外側を有する、血液脳関門を表すように設定した。カートリッジの内側は、成体ヒト脳微小血管内皮細胞で裏打ちされ、外側は、ヒト成体星状細胞で裏打ちされていた。SEMA4Dなどの血液脳関門修飾剤をカートリッジの管腔中に導入した際に、管の内側と外側との間の電流を、TEERを用いてモニタリングした。操作中に、TEERシステムは、管腔区画および管腔外区画において各カートリッジ中に挿入された励起電極を横切る励起電圧 (0.06V) を印加する。マイクロコントローラが、物理的パラメータから関門の (cm²あたりの) 抵抗率および静電容量をコンピュータで計算する。静電容量の値は、電圧および電流の波形の比較により算出する。2個の波形のピークからピークまでの遅延は、弓状張力として発現される静電容量値に比例する。TEERを、最初の設定から各実験の過程を通して測定した。

【 0 1 4 4 】

BBBの透過性のrSEMA4Dにより誘導される増大

BBBの形成後に、BBBの完全性に対するrSEMA4Dの作用を、増大する濃度の組み換えSEMA4D (rSEMA4D) を2個のカートリッジの管腔中に添加することにより測定した。rSEMA4Dを、時間0で0.05 $\mu\text{g/ml}$ の濃度で管腔中に最初に添加した。rSEMA4Dの濃度を、各12時間間隔で10倍に、例えば、12時間で0.5 $\mu\text{g/ml}$ 、24時間で5 $\mu\text{g/ml}$ 、および36時間で50.0 $\mu\text{g/ml}$ に増大させた。TEER測定値を、変動する濃度のrSEMA4DでのBBBの透過性の変化の反映として、各間隔の間および各間隔中に取得した。全体的に、BBBの透過性は、0.05 $\mu\text{g/ml}$ のrSEMA4Dで相対的に安定のままであった。0.5 $\mu\text{g/ml}$ から開始して、増大する濃度のrSEMA4D (すなわち、0.5 $\mu\text{g/ml}$ 、5 $\mu\text{g/ml}$ 、および50 $\mu\text{g/ml}$) は、内皮細胞層の透過性の増大を反映するTEER測定値の低下を結果としてもたらした。これらの結果を、図2に示す。

10

【 0 1 4 5 】

rSEMA4Dで処置したBBBの透過性の抗体により誘導される低下

段階的に増加する投薬量のrSEMA4Dへの曝露後のBBBに対する抗SEMA4D抗体の作用を測定するために、VX15/2503を、48時間で250 $\mu\text{g/ml}$ の濃度で添加した。TEER測定値を、72時間で取得した。VX15/2503での処置は、2個のカートリッジにおいて全体的なBBBの透過性の低下 (または抵抗率の増大) を結果としてもたらした。この透過性の低下は、BBBの回復を反映する。結果を、図2に示す。

【 0 1 4 6 】

実施例2：インビトロDIV-BBBモデルにおける、SEMA4Dにより誘導されるBBBの崩壊後にBBBの完全性を回復する、抗SEMA4D結合分子、例えば、抗体、またはその抗原結合断片、変異体、もしくは誘導体、例えばVX15/2503の能力の試験

20

実験設計

インビトロDIV-BBBモデルを使用する第2の実験を行って、BBBの完全性に対するSEMA4DおよびVX15/2503の作用を研究した。基本的な実験設計は、上記の実施例1および図1において示されるものと同様であった。2週間、DIV-BBBカートリッジは、内皮細胞区画および星状細胞区画におけるBBB形成を受けた。TEER中に反映されるBBBの形成を、図3および図4に示す。

【 0 1 4 7 】

BBBの透過性のrSEMA4Dにより誘導される増大

30

BBBの形成後に、BBBの完全性に対するrSEMA4Dの作用を、増大する濃度の組み換えSEMA4D (rSEMA4D) を12時間間隔で3個のカートリッジのセットのうちの第1のカートリッジの管腔中に添加し、平衡化させることにより (およそ12時間 / 濃度) 測定した。rSEMA4Dを、時間0で0.5 $\mu\text{g/ml}$ の濃度で管腔中に最初に添加した。rSEMA4Dの濃度を、各間隔で10倍に、例えば、12時間で5 $\mu\text{g/ml}$ 、および24時間で50.0 $\mu\text{g/ml}$ に増大させた。TEER測定値を、変動する濃度のrSEMA4DでのBBBの透過性の変化の反映として、各間隔の間に取得した。全体的に、増大する濃度のrSEMA4Dは、BBBの透過性の増大を反映するTEER測定値の低下を結果としてもたらした。これらの結果を、図3に示す。

【 0 1 4 8 】

内皮細胞層を標的としない抗原の存在下でBBBの完全性を試験するために、同様に調製した組み換えタンパク質対照 (CTRL、C35タンパク質) を、同一の12時間間隔で等モル濃度で (すなわち、時間0で0.25 $\mu\text{g/ml}$ 、12時間で2.5 $\mu\text{g/ml}$ 、および24時間で25.0 $\mu\text{g/ml}$) 、2個の追加的な対照カートリッジに添加した。rSEMA4Dの作用と対照的に、CTRLタンパク質はTEERの有意な変化を誘導せず、BBBの透過性の有意な変化を反映しなかった。しかしながら、最高濃度のCTRLタンパク質の添加の12時間後に50.0 $\mu\text{g/ml}$ のrSEMA4Dを添加した場合は、段階的に増加した用量のrSEMA4Dで観察されたものと同様のTEERの迅速な低下が誘導された。結果を、図4に示す。

40

【 0 1 4 9 】

rSEMA4Dで処置したBBBの透過性の抗体により誘導される低下

24時間で50.0 $\mu\text{g/ml}$ の最終用量のrSEMA4Dの添加後に、TEERおよびBBBの透過性に対する

50

VX15/2503の作用を測定した。図3において、VX15/2503抗体を、36時間で250 μ g/mlの濃度で、段階的に増加した用量のrSEMA4Dを受け取った3個のカートリッジのうちの2個に添加し、他方、同一濃度のアイソタイプ対照抗体を、段階的に増加した用量のrSEMA4Dを受け取った残りの1個のカートリッジに添加した。TEER測定値を、種々のその後の時点で取得した。VX15/2503での処置は、実験の開始時のピークレベルに戻るTEERの増大を結果としてもたらし、全体的なBBBの透過性の低下（すなわち、BBBの回復）を反映した。アイソタイプ対照抗体を受け取った1個のカートリッジにおいて、TEERレベルは、rSEMA4Dでの処置により誘導された相対的に低減したレベルのままであり、BBBの透過性の有意な低下を示さなかった。同様の結果を、図4に示す。図4において、VX15/2503抗体を、48時間で250 μ g/mlの濃度で、最初に対照組み換えC35タンパク質を、その後50 μ g/mlのrSEMA4Dを12時間受け取った2個のカートリッジに添加した。VX15/2503での処置は、実験の開始時のピークレベルに戻るTEERの増大を結果としてもたらし、全体的なBBBの透過性の低下（すなわちBBBの回復）を反映した。

10

【0150】

実施例3：インビトロDIV-BBBモデルにおける、SEMA4Dにより誘導されるBBBの崩壊後にBBBの完全性を回復する、抗プレキシン-B1結合分子、例えば、抗体、またはその抗原結合断片、変異体、もしくは誘導体の能力の試験

別の研究を実施して、BBBの完全性に対する抗プレキシン-B1抗体（MAB37491 Human Plexin-B1 MAb (Clone 559830), R&D Systems）の作用を測定した。この抗体は、SEMA4Dのプレキシン-B1受容体に対する結合を遮断する。この研究の結果を、図5に示す。図5に示すように、4個のDIV-BBBカートリッジ中のヒト内皮細胞および星状細胞は、上記の実験と同様のBBB形成を受けた。BBB形成後、rSEMA4Dを、BBB透過性の増大（すなわちBBBの破壊）を誘導する50.0 μ g/mlの濃度で添加した。rSEMA4Dの添加後、抗プレキシン-B1抗体を、6時間で、125 μ g/mlの濃度で4個のカートリッジのうちの2個に添加し、VX15/2503抗体を、250 μ g/mlの濃度で4個のカートリッジのうちの1個に添加し、アイソタイプ対照抗体を、250 μ g/mlの濃度で残りのカートリッジに添加した。TEER測定値を、種々のその後の時点で取得した。VX15/2503または抗プレキシン-B1抗体いずれかでの処置は、両方の作用物質でのTEERレベルの増大を結果としてもたらし、VX15/2503での処置は、最後の時点で、抗プレキシン-B1抗体での処置よりもいくらか大きいTEERの増大を結果としてもたらし、2種の抗体の作用は、すべての他の時点では区別不能である。TEERの増大は、VX15/2503または抗プレキシン-B1抗体いずれかの存在下で、全体的なBBBの透過性の低下（すなわちBBBの回復）を反映する。アイソタイプ対照抗体を受け取った1個のカートリッジにおいて、TEERレベルは、rSEMA4Dでの処置により誘導された相対的に低減したレベルのままであり、BBBの透過性の有意な低下を示さなかった。処置がまた、VX15/2503および抗プレキシン-B1の組み合わせを用いて実施できることも、認識されるべきである。

20

30

【0151】

実施例4：インビトロDIV-BBBモデルにおける、活性化PBMCおよびフロー停止により誘導されるBBBの崩壊後にBBBの完全性を回復する、抗SEMA4D結合分子、例えば、抗体、またはその抗原結合断片、変異体、もしくは誘導体の能力の試験

実験設計

インビトロDIV-BBBモデルを使用する別の実験を行って、活性化末梢血単核細胞（PBMC）およびフロー停止により誘導されるBBBの崩壊後のBBBの完全性の回復に対するVX15/2503の作用を研究した。2週間、2個のDIV-BBBカートリッジは、内皮細胞区画および星状細胞区画におけるBBB形成を受けた。

40

【0152】

BBBの透過性の活性化PBMCにより誘導される増大

BBBの形成後に、BBBの完全性に対する活性化PBMCの作用を測定した。PBMCを、PMA / イオノマイシンで2時間活性化させ、次に、 10^6 /mlの濃度で2個のカートリッジの管腔中に添加した。TEER測定値を、BBBの透過性の変化の反映として、活性化PBMCの添加前および添加後に取得した。全体的に、活性化PBMCを 10^6 /mlでカートリッジに添加することは、BBB

50

の透過性の増大を反映するTEER測定値の低下を結果としてもたらしした。これらの結果を、図6に示す。

【0153】

活性化PBMCのカートリッジへの添加のおよそ2~4時間後に、フロー停止を1時間行った。TEER測定値を、BBBの透過性の変化の反映として、フロー停止の前および後に取得した。全体的に、フロー停止は、BBBの透過性の増大を反映するTEER測定値のさらなる低下を結果としてもたらしした。これらの結果を、図6に示す。

【0154】

活性化PBMCに曝露されたBBBの透過性の抗体により誘導される低下

活性化PBMCおよびフロー停止への曝露後に、TEERおよびBBBの透過性に対するVX15/2503の作用を測定した。VX15/2503抗体を、250 µg/mlの濃度で、活性化PBMCを受け取った2個のカートリッジのうちの1個に添加し、他方、同一濃度のアイソタイプ対照抗体 (Isotype Control Ig, 2269) を、残りのカートリッジに添加した。TEER測定値を、種々のその後の時点で取得した。図6に示すように、VX15/2503での処置は、実験の開始時のピークレベルに戻るTEERの増大を結果としてもたらし、全体的なBBBの透過性の低下 (すなわちBBBの回復) を反映した。アイソタイプ対照抗体を受け取ったカートリッジにおいて、TEERレベルは、活性化PBMCおよびフロー停止での処置により誘導された相対的に低減したレベルのままであり、BBBの透過性の有意な低下を示さなかった。

【0155】

実施例5: インビボEAEモデルにおける、BBBの完全性を保護する、抗SEMA4D結合分子、例えば、抗体、またはその抗原結合断片、変異体、もしくは誘導体、例えばVX15/2503、の能力の試験

抗SEMA4D結合分子、例えば、抗体、またはその抗原結合断片、変異体、もしくは誘導体、例えばVX15/2503を、インビボ実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAE) モデルにおいて試験した。

【0156】

インビボEAEモデルにおいて、BBBの崩壊を、血液から脳実質中へのフィブリノーゲンの浸透に反映される脳透過性の変化を検討することにより、およびクロードイン-5を含む内皮密着結合タンパク質の検討を通して、調査した。このモデルにおいて、EAEを、PLPペプチド (139-151) での免疫処置によりマウス中で誘導させた。当然、当業者は、他のEAE誘導タンパク質 (例えば、ミエリン抗原、例えば、ミエリン-オリゴデンドロサイト糖タンパク質ペプチド35-55) を同様に使用してもよいこと、ならびに、より高い効率のために、これらの誘導タンパク質またはペプチドが、種によって、およびマウスの系統によって変動してもよいことを、認識するであろう (Steinman, L. Neuron 24:511-514 (1999))。疾患の様々な段階での動物の中樞神経系 (CNS) 由来の組織切片を、次に、タンパク質 (BBB破壊のマーカーとして働くフィブリノーゲンおよびクロードイン-5) について免疫染色した。

【0157】

実験設計

インビボEAEモデルにおいて、EAEを、CFA (完全フロイントアジュバント) 中のPLPペプチド (139-151) での免疫処置により、12週齢のSJL/Jマウス (1群あたり10匹) 中で誘導させた。マウスを、次に、誘導後7日目から1週間に1回、600 µgの抗SEMA4D抗体 (VX15/2503抗体) または対照IgGで処置した。神経学的兆候を、誘導後11日目に最初に観察した (dpi)。誘導後13日目、疾患の急性期中に、1群あたり4匹のマウスを屠殺し、組織病理学的解析のために腰髄試料を調製した。試料中のBBB破壊を検出するために、これらの試料をフィブリノーゲンおよびクロードイン-5について免疫染色した。免疫染色の手順は以下である: 切片をPBS中で2回すすぎ、次にPBS 0.1%グリシン中で10分間インキュベーションし、PBS 0.3%Triton X-100 10%ヤギ血清中で1時間ブロッキングし、ブロッキング緩衝液中の一次抗体と一晩4でインキュベーションした。クロードイン-5 (CLN-5) については、ブロッキングの前に、切片を100 のEDTA、pH8中に浸した。使用した一次抗体は、抗

CLN-5 (1:50) および抗フィブリノーゲン (1:1,000) であった。PBS 0.3% Triton X-100 中で3回洗浄した後、切片を次に、ブロッッキング緩衝液中のAlexaFluor 488および/またはAlexaFluor 594と結合した関連する種特異的な二次抗体 (1/100; Molecular Probes) において1時間25℃でインキュベーションし、再び3回洗浄し、4,6-ジアミジノ-2-フェニルインドール (DAPI) で対比染色した。すべての試料を、Axiovert 200倒立蛍光顕微鏡に付属したZeiss LSM 510 METAレーザー走査共焦点システムを用いて検討し、撮影した。

【0158】

マウスにおける臨床疾患を、以下のように採点した：0 = 症候なし；1 = 尾が垂れている；2 = 後肢が弱い；4 = 前肢および後肢が弱い；5 = 死亡。神経学的兆候を、誘導後11日目に最初に観察した。VX15/2503抗体で処置したマウスにおいては、臨床疾患が0.75の平均重症度スコアに達し、軽度の尾の弱さを示したが、対照群のマウスにおける臨床疾患は2.25の平均重症度スコアに達し、不全対麻痺を示した。

10

【0159】

誘導後13日目の免疫染色の結果を、図7A～図7Cに示す。フィブリノーゲンは通常、血液脳関門 (BBB) を浸透しない。EAEにおいては、BBBが損なわれ、緑色のフィブリノーゲン染色が、脳質 (brain matter) において検出された (左パネル)。さらに、BBBを作り上げる密着結合の構成要素であるクロードイン-5 (CLN-5、赤色染色) の発現が低減した。対照群におけるマウスは、クロードイン-5の発現の低減、およびフィブリノーゲンの血管外漏出のレベルの増大を示し、BBBの破壊と関連した。他方、VX15/2503抗体で処置したマウスにおいては、クロードイン-5の発現が維持され、フィブリノーゲンの漏出が有意に低減した。これらの結果は、これらの処置したマウスにおける、BBBの破壊に対するVX15/2503抗体の保護的作用を実証し、および、いかに抗SEMA4D抗体がBBB崩壊を予防し、フィブリノーゲンの血管外漏出を予防し (図7Aの左パネルおよび図7Bにおける定量化)、かつ赤色染色により検出されるようにクロードイン-5を保存するか (図7Aの右パネルおよび図7Cにおける定量化) を具体的に実証した。

20

【0160】

実施例6：脳内皮細胞の培養物における密着結合タンパク質に対するSEMA4Dの作用
実験設計

CNSに由来する内皮細胞の可溶性組み換えSEMA4Dでの処置後の、鍵となる内皮密着結合タンパク質であるクロードイン-5の発現を調査した。このモデルにおいては、初代マウス中枢神経系 (CNS) 内皮培養物を単離し、6ウェルのマトリゲルでコーティングしたプレート上にプレーティングした (10個の脳から単離したMBCECを、3 mlの初代内皮細胞培養培地中に再懸濁して、ウェルあたり250 μ lでプレーティングした)。培養物を、単離後7日目に使用した。培養物を、1ng/ml、10ng/ml、または100ng/mlの組み換えマウスSEMA4Dまたは100ng/mlのマウスVEGF-A (陽性対照) で24時間処置した。動物の内皮培養物を次に、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE)、ならびに、クロードイン-5密着結合タンパク質およびアクチンをローディングした対照についての免疫プロットングに供した。データを走査し、ImageJソフトウェア (NIH) を用いた濃度測定に供した。

30

【0161】

免疫プロットングの結果を、図8に示す。図8に提供されるように、100ng/mlの組み換えSEMA4Dで処置した内皮細胞培養物は、クロードイン-5タンパク質発現の有意な低減を示した。100ng/mlのVEGF-Aで処置した内皮細胞培養物を、クロードイン-5の下方制御についての陽性対照として試験した。これは、鍵となるBBBの密着結合タンパク質の発現を制御するSEMA4Dの重要な役割を実証する。

40

【0162】

実施例7：インビボアルツハイマー病 (AD) モデルにおける、BBBの透過性を低下させる、抗SEMA4D結合分子または抗プレキシンB1結合分子、例えば、抗体、またはその抗原結合断片、変異体、もしくは誘導体の能力の試験

抗SEMA4D結合分子または抗プレキシンB1結合分子、例えば、抗体、またはその抗原結合断片、変異体、もしくは誘導体、例えばMAb 67 (全体として参照により本明細書に組み入

50

れられる米国特許出願公開第2010/0285036 A1号に詳細に記載されている)を、インビボ実験的アルツハイマー病(AD)遺伝子導入マウスモデルAPPSwDI/NOS^{C-/-}を含むがこれに限定されない、神経炎症性障害の種々のモデルシステムにおいて試験する。これらのマウスは、APP-Swedish-Dutch-Iowa変異体マウスを酸化窒素合成酵素2ノックアウトマウスと交配することにより作製された(Colton et al., J Alzheimers Dis.15:571-587, 2008; Van Nostrand et al., Stroke 41:S135-S138, 2010)。APPSwDI/NOS^{C-/-}マウスは、BBB機能の破壊、実質内アミロイド班、マウスtauの過剰なリン酸化、神経炎症、神経細胞死、および認知欠損を伴う、年齢に関連した神経血管アミロイド症を発症する。Wilcockらは、アミロイド⁻に向けた能動免疫療法でのAPPSwDI/NOS^{C-/-}マウスの処置が、アミロイド沈着の著しい低減をもたらすが、微出血の発生率の増大を伴うことを示している(Wilcock et al., J Neurosci. 29:7957-7965, 2009)。

10

【0163】

インビボADモデルにおいて、ADの進行を、アミロイド沈着、tauの過剰なリン酸化、およびBBB漏出(フィブリノーゲン)の免疫組織化学的サインを検討することにより、ならびに空間記憶に基づく行動範例において認知能力を評価することにより、調査する。このモデルにおいて、遺伝子導入マウスに、MAb 67または対照Ig(Mab 2B8)を、30mg/kgの濃度で26週齢から38週齢まで、合計で13用量、静脈内に投与する。

【0164】

マウスを、10~12週齢で、ベースラインの行動試験、例えば、オープンフィールド、RA WnおよびBarnes Maze試験に最初に供し、活動および学習/記憶の基準に達したマウスを、追跡調査に含める。38、39、および40週齢で行動欠損を再び測定し、体重を記録する。研究登録の基準に達しないマウスは、屠殺する。41週齢の終点で、動物を安楽死させ、可溶性および不溶性のアミロイド レベルおよび沈着についての生化学的解析および免疫組織学的解析のために脳を加工処理する。10、25、および41週齢で、血清を、投薬前、投薬中、および終点でPKのために収集する。疾患の様々な段階での動物の中樞神経系(CNS)由来の組織切片を、BBB破壊のマーカーとして用いることができるフィブリノーゲンについて免疫染色してもよい。

20

【0165】

本明細書において示される本発明の多くの修飾物および他の態様が、前述の説明および関連する図面において提示される教示の恩恵を受ける、本発明が属する技術分野における当業者には、思い浮かぶであろう。従って、本発明は開示される具体的な態様に限定されるべきではないこと、ならびに、修飾物および他の態様は添付の特許請求の範囲および本明細書において開示される態様の列挙の範囲内に含まれるように意図されることが、理解されるべきである。具体的な用語が本明細書において使用されるが、それらは、総称的意味および説明的意味のみにおいて使用され、限定の目的では使用されない。

30

Experimental timeline diagram showing the sequence of events for the study. The timeline starts with 'DIV-BBB' and 'TERR' at time 0. It then shows four 12-hour intervals, each with a '+S4D' treatment at the start and a '+抗-S4D = VX15/2503' treatment at the end. The treatments are: 0.05 µg/ml, 0.5 µg/ml, 5 µg/ml, and 50 µg/ml. The timeline ends at 24 hours.

Figure 1 is a line graph showing the time course of TEER (Ohm x cm²) in the BBB after LPS-induced damage. The graph is divided into two phases: 'BBB 崩壊' (BBB Collapse) from 0 to 48 hours and 'BBB の回復' (BBB Recovery) from 48 to 72 hours. Two groups are compared: '回復1' (Recovery 1, open squares) and '回復2' (Recovery 2, open diamonds). Both groups show a decrease in TEER over time, with Recovery 2 generally maintaining higher TEER values than Recovery 1. At 48 hours, both groups reach a minimum TEER value. After adding antibodies (抗体添加) at 48 hours, both groups show a significant increase in TEER by 72 hours. The graph includes horizontal bars indicating the concentration of anti-LPS antibody added at different time points: 0.05 µg/ml at 0-6h, 0.5 µg/ml at 12-24h, 5 µg/ml at 27-36h, and 50 µg/ml at 48-72h.

時間 (時間)	回復1 (Ohm x cm ²)	回復2 (Ohm x cm ²)
0	~1680	~1880
2	~1750	~1950
6	~1680	~1830
12	~1750	~1700
24	~1570	~1460
27	~1470	~1470
36	~1330	~1420
48	~1220	~1320
72	~1430	~1590

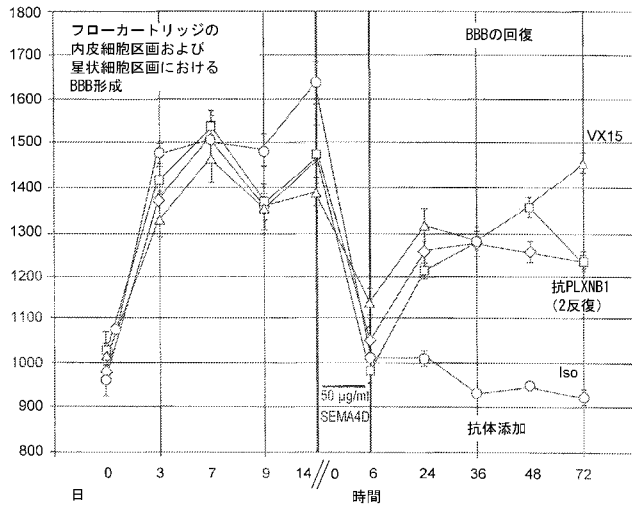
Figure 1 is a line graph showing the TEER (Ohm x cm²) over time (days) for three cell lines: BBE (squares), VX15 (circles), and Iso (triangles). The graph is divided into three phases: BBB 崩壊 (BBB breakdown) from day 0 to 14, BBB の回復 (BBB recovery) from day 14 to 132, and 抗体添加 (antibody addition) from day 14 to 132. The TEER values generally increase over time, peaking around day 14 and then fluctuating. The addition of anti-SEMA4D antibody at day 14 causes a sharp drop in TEER for all three cell lines, followed by a recovery. The recovery is more pronounced in BBE and VX15 than in Iso.

日 (Day)	BBE (Ohm x cm ²)	VX15 (Ohm x cm ²)	Iso (Ohm x cm ²)
0	850	1050	1020
3	1250	1300	1250
7	1400	1350	1300
9	1450	1250	1350
14	1600	1650	1600
12	1650	1450	1400
24	1400	1250	1200
36	1150	1100	1150
60	1550	1400	1150
84	1650	1600	1200
108	1680	1550	1150
132	1600	1500	1100

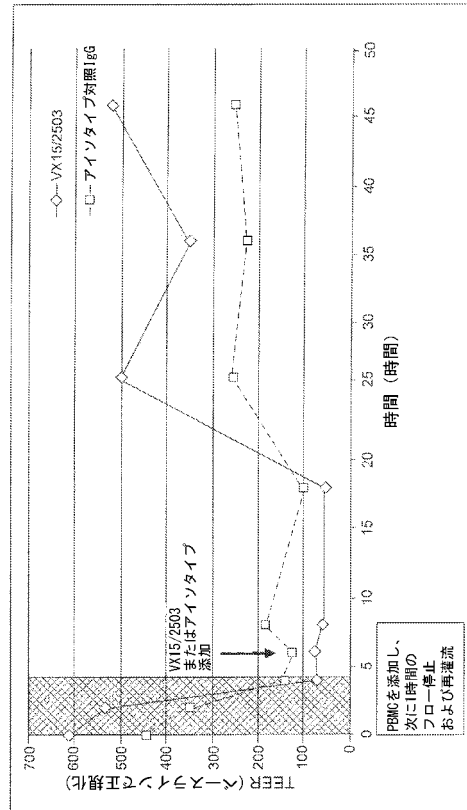
Figure 1 is a line graph showing the TEER (Ohm x cm²) over time (days) for a BBB model. The graph is divided into three phases: 'BBB形成' (BBB formation) from day 0 to 14, 'BBBの回復' (BBB recovery) from day 14 to 48, and 'BBBの回復' (BBB recovery) from day 48 to 144. The graph shows two data series: '0.25 µg/ml CTRL' (open circles) and '25 µg/ml CTRL' (open squares). Both series show a decrease in TEER during the formation phase, followed by a recovery phase. The recovery phase is divided into '抗原添加' (antigen addition) from day 14 to 48 and 'VX15抗体添加' (VX15 antibody addition) from day 48 to 144. The graph also shows a significant drop in TEER at day 48, labeled '50 µg/ml SEMA4D'.

日	0.25 µg/ml CTRL (Ohm x cm ²)	25 µg/ml CTRL (Ohm x cm ²)
0	1000	1000
3	1250	1250
7	1380	1480
9	1400	1520
14	1600	1600
12	1620	1620
24	1580	1480
36	1550	1550
48	1200	1200
72	1480	1580
96	1450	1450
120	1480	1480
144	1650	1580

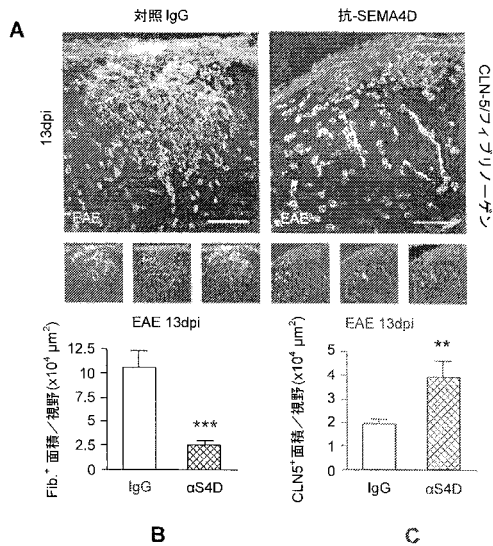
【図 5】



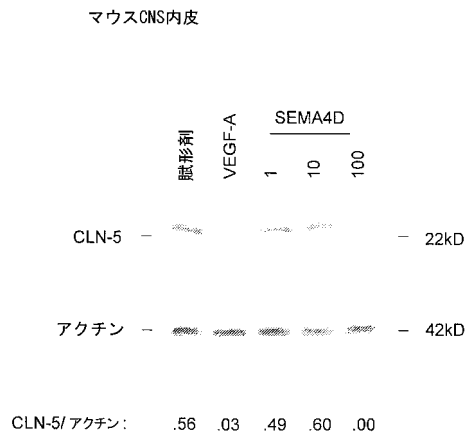
【図 6】



【図 7】



【図 8】



【配列表】

2017193569000001.app

【手続補正書】

【提出日】平成29年7月27日(2017.7.27)

【手続補正 1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

神経炎症性障害を有する対象において血液脳関門透過性を低下させるための、セマフォリン-4D (SEMA4D) のSEMA4D受容体との相互作用を特異的に阻害する単離された結合分子の有効量を含む薬学的組成物であって、該結合分子が該対象において血液脳関門透過性を低下させる、薬学的組成物。

【請求項 2】

神経炎症性障害を有する対象においてクローディン-5の発現を維持するかまたは増加させるための、セマフォリン-4D (SEMA4D) のSEMA4D受容体との相互作用を特異的に阻害する単離された結合分子の有効量を含む薬学的組成物であって、該結合分子が該対象においてクローディン-5の発現を維持するかまたは増加させる、薬学的組成物。

【請求項 3】

SEMA4D受容体がプレキシシン-B1である、請求項1または2記載の薬学的組成物。

【請求項 4】

結合分子が、SEMA4Dまたはプレキシシン-B1に特異的に結合する、請求項1～3のいずれか一項記載の薬学的組成物。

【請求項 5】

1) SEQ ID NO 9を含むVH、および、SEQ ID NO 17を含むVL、または、2) SEQ ID NO 10を含むVH、および、SEQ ID NO 18を含むVLを含む抗SEMA4D抗体がSEMA4Dに特異的に結合することを、前記結合分子が競合的に阻害する、請求項4記載の薬学的組成物。

【請求項 6】

結合分子が、1) SEQ ID NO 9を含むVH、および、SEQ ID NO 17を含むVL、または、2) SEQ ID NO 10を含むVH、および、SEQ ID NO 18を含むVLを含む抗SEMA4D抗体と同一のSEMA4Dエピトープに特異的に結合する、請求項4記載の薬学的組成物。

【請求項 7】

結合分子が、プレキシシン-B1に特異的に結合する、請求項4記載の薬学的組成物。

【請求項 8】

SEMA4Dがプレキシシン-B1に結合することを、前記結合分子が競合的に阻害する、請求項4記載の薬学的組成物。

【請求項 9】

結合分子が、抗体またはその抗原結合断片である、請求項1～8のいずれか一項記載の薬学的組成物。

【請求項 10】

抗体またはその抗原結合断片が、抗SEMA4D抗体またはその抗原結合断片である、請求項9記載の薬学的組成物。

【請求項 11】

抗体またはその抗原結合断片が、SEQ ID NO 6、7、および8をそれぞれ含むVHCDR1～3を含むVH、ならびに、SEQ ID NO 14、15、および16をそれぞれ含むVLCDR1～3を含むVLを含む、請求項9記載の薬学的組成物。

【請求項 12】

抗体またはその抗原結合断片が、1) SEQ ID NO 9を含むVH、および、SEQ ID NO 17を含

むVL、または、2) SEQ ID NO 10を含むVH、および、SEQ ID NO 18を含むVLを含む抗SEMA4D抗体である、請求項9記載の薬学的組成物。

【請求項13】

抗体またはその抗原結合断片が、抗プレキシン-B1抗体またはその抗原結合断片である、請求項9記載の薬学的組成物。

【請求項14】

神経炎症性障害を有する対象を処置するための、セマフォリン-4D (SEMA4D) に特異的に結合する単離された結合分子およびプレキシン-B1に特異的に結合する単離された結合分子の有効量を含む薬学的組成物であって、該SEMA4D結合分子およびプレキシン-B1結合分子が血液脳関門の透過性を低下させ、それにより該対象を処置する、薬学的組成物。

【請求項15】

神経炎症性障害を有する対象を処置するための、セマフォリン4D (SEMA4D) のSEMA4D受容体との相互作用の阻害物質の有効量を含む薬学的組成物であって、該阻害物質が血液脳関門の透過性を低下させ、それにより該対象を処置する、薬学的組成物。

【請求項16】

阻害物質が、抗SEMA4D結合分子、抗プレキシンB1結合分子、SEMA4Dの低分子阻害物質、またはSEMA4D受容体の低分子阻害物質からなる群より選択される、請求項15記載の薬学的組成物。

【請求項17】

神経炎症性障害が、多発性硬化症、筋萎縮性側索硬化症、てんかん、アルツハイマー病、パーキンソン病、髄膜炎、脳浮腫、および脳外傷からなる群より選択される、請求項1~16のいずれか一項記載の薬学的組成物。

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0012

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0012】

本明細書において例証される局面に従って、神経炎症性障害を有する対象を処置する方法であって、セマフォリン4D (SEMA4D) のSEMA4D受容体との相互作用の阻害物質の有効量を該対象に投与する段階を含み、該阻害物質が血液脳関門の透過性を低下させ、それにより該対象を処置する方法が、提供される。

[本発明1001]

神経炎症性障害を有する対象において血液脳関門透過性を低下させる方法であって、セマフォリン-4D (SEMA4D) に特異的に結合する単離された結合分子の有効量を該対象に投与する段階を含み、それにより該対象において血液脳関門透過性を低下させる、方法。

[本発明1002]

神経炎症性障害を有する対象においてクローディン-5の発現を維持するかまたは増加させる方法であって、セマフォリン-4D (SEMA4D) に特異的に結合する単離された結合分子の有効量を該対象に投与する段階を含み、該結合分子が該対象においてクローディン-5の発現を維持するかまたは増加させる、方法。

[本発明1003]

結合分子が、SEMA4Dのプレキシン-B1との相互作用を阻害する、本発明1001または1002の方法。

[本発明1004]

神経炎症性障害を有する対象において血液脳関門透過性を低下させる方法であって、セマフォリン4D (SEMA4D) のSEMA4D受容体との相互作用を特異的に阻害する単離された結合分子の有効量を該対象に投与する段階を含み、それにより該対象において血液脳関門透過性を低下させる、方法。

[本発明1005]

神経炎症性障害を有する対象を処置する方法であって、セマフォリン4D (SEMA4D) のSEMA4D受容体との相互作用を特異的に阻害する単離された結合分子の有効量を該対象に投与する段階を含み、該結合分子が血液脳関門の透過性を低下させ、それにより該対象を処置する、方法。

[本発明1006]

SEMA4D受容体がプレキシン-B1である、本発明1004または1005の方法。

[本発明1007]

結合分子が、SEMA4Dまたはプレキシン-B1に特異的に結合する、本発明1004～1006のいずれかの方法。

[本発明1008]

VX15/2503または67からなる群より選択される参照モノクローナル抗体がSEMA4Dに特異的に結合することを、前記結合分子が競合的に阻害する、本発明1001～1007のいずれかの方法。

[本発明1009]

神経炎症性障害を有する対象において血液脳関門透過性を低下させる方法であって、SEMA4Dに特異的に結合する単離された結合分子の有効量を該対象に投与する段階を含み、VX15/2503または67からなる群より選択される参照モノクローナル抗体がSEMA4Dに特異的に結合することを、該結合分子が競合的に阻害し、それにより該対象において血液脳関門透過性を低下させる、方法。

[本発明1010]

結合分子が、VX15/2503または67からなる群より選択される参照モノクローナル抗体と同一のSEMA4Dエピトープに特異的に結合する、本発明1001～1009のいずれかの方法。

[本発明1011]

結合分子が、抗体またはその抗原結合断片を含む、本発明1001～1010のいずれかの方法。

[本発明1012]

抗体またはその抗原結合断片が、SEQ ID NO 6、7、および8をそれぞれ含むVHCDR1～3を含む可変重鎖 (VH)、ならびに、SEQ ID NO 14、15、および16をそれぞれ含むVLCDR1～3を含む可変軽鎖 (VL) を含む、本発明1011の方法。

[本発明1013]

抗体またはその抗原結合断片が、モノクローナル抗体VX15/2503または67である、本発明1012の方法。

[本発明1014]

結合分子が、プレキシン-B1に特異的に結合する、本発明1007の方法。

[本発明1015]

SEMA4Dがプレキシン-B1に結合することを、前記結合分子が競合的に阻害する、本発明1014の方法。

[本発明1016]

結合分子が、抗プレキシン-B1抗体またはその抗原結合断片である、本発明1014または1015の方法。

[本発明1017]

神経炎症性障害を有する対象を処置する方法であって、セマフォリン-4D (SEMA4D) に特異的に結合する単離された結合分子およびプレキシン-B1に特異的に結合する単離された結合分子の有効量を該対象に投与する段階を含み、該SEMA4D結合分子およびプレキシン-B1結合分子が血液脳関門の透過性を低下させ、それにより該対象を処置する、方法。

[本発明1018]

神経炎症性障害を有する対象を処置する方法であって、セマフォリン4D (SEMA4D) のSEMA4D受容体との相互作用の阻害物質の有効量を該対象に投与する段階を含み、該阻害物質が血液脳関門の透過性を低下させ、それにより該対象を処置する、方法。

[本発明1019]

阻害物質が、抗SEMA4D結合分子、抗プレキシシンB1結合分子、SEMA4Dの低分子阻害物質、またはSEMA4D受容体の低分子阻害物質からなる群より選択される、本発明1018の方法。

[本発明1020]

神経炎症性障害が、多発性硬化症、筋萎縮性側索硬化症、てんかん、アルツハイマー病、パーキンソン病、髄膜炎、脳浮腫、および脳外傷からなる群より選択される、本発明1001～1019のいずれかの方法。

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P 25/08 (2006.01)	A 6 1 P 25/08	
A 6 1 P 25/28 (2006.01)	A 6 1 P 25/28	
A 6 1 P 25/16 (2006.01)	A 6 1 P 25/16	
(74)代理人 100148699 弁理士 佐藤 利光		
(74)代理人 100128048 弁理士 新見 浩一		
(74)代理人 100129506 弁理士 小林 智彦		
(74)代理人 100114340 弁理士 大関 雅人		
(74)代理人 100121072 弁理士 川本 和弥		
(72)発明者 スミス アーネスト エス . アメリカ合衆国 ニューヨーク州 オンタリオ ポストン ロード 3 2 8		
(72)発明者 ザウデレル モーリス アメリカ合衆国 ニューヨーク州 ビッツフォード ウッドランド ロード 4 4		
F ターム(参考) 4C084 AA17 NA14 ZA01 ZA06 ZA15 ZA16 ZA94 4C085 AA14 EE01		

【外国語明細書】

2017193569000001.pdf

2017193569000002.pdf

2017193569000003.pdf

2017193569000004.pdf