



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104619341 A

(43) 申请公布日 2015. 05. 13

(21) 申请号 201380037262. 9

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2013. 05. 10

A61K 39/395(2006. 01)

(30) 优先权数据

61/646, 119 2012. 05. 11 US

13/842, 523 2013. 03. 15 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2015. 01. 12

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2013/040661 2013. 05. 10

(87) PCT国际申请的公布数据

W02013/170221 EN 2013. 11. 14

(71) 申请人 瓦西尼斯公司

地址 美国纽约州

(72) 发明人 E · S · 史密斯 M · 佐德勒

(74) 专利代理机构 北京市金杜律师事务所

11256

代理人 陈文平 马慧

权利要求书1页 说明书26页

序列表9页 附图7页

(54) 发明名称

脑信号蛋白-4D结合分子在促进中风后的神经发生中的用途

(57) 摘要

本发明提供了一种在表现出至少一种中枢神经系统疾病症状的患者中促进神经组织的神经发生的方法,该方法包括向有需要的受试者给药有效量的分离的结合分子,其特异性地结合至脑信号蛋白-4D(SEMA4D)。

1. 一种促进表现出至少一种中枢神经系统疾病的症状的患者中神经组织的神经发生的方法,该方法包括向有需要的受试者给药有效量的特异性结合脑信号蛋白-4D(SEMA4D)的分离的结合分子。

2. 根据权利要求1的方法,其中所述经分离的结合分子抑制SEMA4D活性。

3. 权利要求1的方法,其中所述抑制的SEMA4D活性是二聚活性。

4. 权利要求1的方法,其中所述经分离的结合分子抑制SEMA4D与受体或该受体一部分的相互作用。

5. 权利要求4的方法,其中所述受体选自神经丛蛋白-B1、神经丛蛋白-B2或CD72。

6. 权利要求1的方法,其中所述经分离的结合分子竞争性地抑制选自VX15/2503或67的参比单克隆抗体与SEMA4D的特异性结合。

7. 权利要求1的方法,其中所述分离的结合分子特异性地结合至与选自VX15/2503或67的参比单克隆抗体相同的SEMA4D表位。

8. 权利要求1的方法,其中所述分离的结合分子包括抗体或其抗原结合片段。

9. 权利要求8的方法,其中所述抗体或其抗原结合片段是或者衍生自单克隆抗体VX15/2503或67。

10. 权利要求8的方法,其中所述抗体是嵌合抗体、人抗体或人源化抗体。

11. 权利要求8的方法,其中所述抗体包括单克隆抗体VX15/2503或67的六个CDR。

12. 权利要求1的方法,其中所述中枢神经系统病症选自神经退行性疾病、急性脑损伤和一些中枢神经系统功能障碍。

13. 权利要求12的方法,其中所述神经退行性疾病选自阿尔茨海默氏病、亨廷顿氏病、肌萎缩性脊髓侧索硬化症、帕金森氏病和多发性硬化。

14. 权利要求12的方法,其中所述中枢神经系统功能障碍选自抑郁症、癫痫症和精神分裂症。

15. 权利要求1的方法,其中所述方法增加了祖细胞的数量、增强了祖细胞的分化,和/或增加了祖细胞的存活。

16. 一种增加具有中枢神经系统疾病的受试者中祖细胞数量的方法,包括向所述受试者给药有效量的分离的结合分子,其特异性地结合脑信号蛋白-4D(SEMA4D)。

17. 权利要求16的方法,其中所述方法降低了受试者的中枢神经系统疾病的负担。

18. 一种治疗患者中风的方法,包括向有需要的受试者给药有效量的分离的结合分子,其特异性地结合脑信号蛋白-4D(SEMA4D)。

19. 权利要求18的方法,其中所述分离的结合分子特异性地结合SEMA4D。

20. 权利要求18的方法,其中所述分离的结合分子抑制SEMA4D与受体或该受体一部分的相互作用。

21. 权利要求18的方法,其中所述分离的结合分子是抗体或其抗原结合片段。

22. 权利要求17的方法,其中特异性地结合SEMA4D的所述抗体或其抗原结合片段包括具有如SEQ ID NO:1或3所示序列的可变区重链结构域,以及具有如SEQ ID NO:2或4所示序列的可变区轻链结构域。

23. 权利要求12的方法,其中所述急性脑损伤选自中风、头部损伤、脑性麻痹、脑梗塞、脊髓损伤、和创伤性损伤。

脑信号蛋白 -4D 结合分子在促进中风后的神经发生中的用途

[0001] 相关申请的相互参引

[0002] 本申请要求 2013 年 3 月 15 日提交的美国非临时申请 No. 13/842, 523 以及 2012 年 5 月 11 日提交的美国临时申请 No. 61/646, 119 的优先权, 各申请的内容以引证的方式整体纳入本文。

[0003] 电子方式提交的序列表参引

[0004] 随本申请提交的以 ASCII text 文件 (文件名: “1843072PC01_SequenceListing.txt”, 大小 7, 562 字节; 生成日期: 2013 年 5 月 10 日) 电子提交的序列表的内容通过引证的方式整体纳入本文。

背景技术

[0005] 脑信号蛋白 4D (SEMA4D), 也称为 CD100, 是属于脑信号蛋白基因家族的一种跨膜蛋白 (例如, SEQ ID NO:1 (人); SEQ ID NO:2 (小鼠))。SEMA4D 以同型二聚体在细胞表面上表达, 但在细胞活化时, SEMA4D 可以经由蛋白水解裂解而从细胞表面释放, 以产生 sSEMA4D, 其为该蛋白质的一种可溶形式, 也是具有生物活性的。参见 Suzuki et al, Nature Rev. Immunol. 5:159-167 (2003); Kikutani et al, Nature Immunol. 9:17-23 (2008)。

[0006] SEMA4D 以高水平在淋巴器官 (包括脾、胸腺和淋巴结) 以及非淋巴器官 (如脑、心脏、和肾脏) 中表达。在淋巴器官中, SEMA4D 大量表达于静息 T 细胞, 但仅微弱表达在静息 B 细胞和抗原呈递细胞 (APC), 例如树突细胞 (DC) 中。但是, 其在这些细胞中的表达在通过各种刺激活化后被上调。可溶性 SEMA4D 从免疫细胞的释放也被细胞活化增加。

[0007] SEMA4D 与自身免疫性脱髓鞘疾病、如多发性硬化症和某些癌症的进展有关。哺乳动物神经系统从损伤后的崩溃至完全再生是一个重大的临床问题。由于中风或脑部的外伤, 以及神经变性疾病如阿尔茨海默氏病所导致的神经损伤的结果, 是死亡和残疾的首要原因。虽然 SEMA4D 通过其受体 (如神经丛蛋白 -B1) 的信号转导对血管生成的作用是已知的, 但 SEMA4D 信号转导对于促进神经再生的作用尚不清楚。因此, 仍然需要提供一种方案来解决对于神经再生治疗手段的未满足的医疗需要。

发明内容

[0008] 本文公开了使用脑信号蛋白 -4D 结合分子用于促进神经再生的方法。本文给出了证据证明 SEMA4D 会损害神经细胞再生的能力。根据本文中示例的本发明的方面, 提供了促进表现出至少一种中枢神经系统病症症状的患者的神经组织中神经发生的方法, 该方法包括向有需要的受试者给药有效量的分离的结合分子, 其特异性地结合至和 / 或抑制脑信号蛋白 -4D (SEMA4D)。

[0009] 根据本文中示例的本发明的方面, 提供了一种增加患有中枢神经系统病症人受试者中祖细胞数量的方法, 包括向受试者给药有效量的分离的结合分子, 其特异性地结合至脑信号蛋白 -4D (SEMA4D), 其中与 SEMA4D 的结合起到增加祖细胞数量的作用。

[0010] 根据本文中示例的本发明的方面,提供了一种促进表现出至少一种中枢神经系统病症症状的患者中神经组织神经再生的方法,包括向受试者给药有效量的分离的结合分子,其特异性地结合 SEMA4D,其中所述结合分子竞争性地抑制选自 VX15/2503 或 67 的参比单克隆抗体与 SEMA4D 的特异性结合。

[0011] 根据本文中示例的本发明的方面,提供了一种缓解患者的中枢神经系统的疾病或病症(例如中风)的症状的方法,包括向受试者给药有效量的分离的结合分子,其特异性地结合至和/或抑制脑信号蛋白-4D(SEMA4D),其中与 SEMA4D 的结合起到缓解所述症状的作用。

[0012] 附图简要说明

[0013] 图 1:示意性地示出了实施例中描述的大脑中动脉(MCA)阻塞的实验方案。

[0014] 图 2A-2E:示出了在大脑中动脉阻塞(MCAO)后,用同型对照(“对照 IgG”,2A 和 2C)或 MAb 67-2(“抗-Sema4D-Ab”,2B 和 2D)治疗的如 2E 中所示区域的巢蛋白/Sox2 被染色的脑样品中神经干细胞/祖细胞。脑样品在 MCAO 之后的 7 天制备。

[0015] 图 3A-3D:示出了用同型对照(“对照 IgG”)或 MAb 67-2(“抗-SEMA4D”)处理的 MCAO 小鼠脑组织的(A)RT-PCR 的 mRNA 表达,以及(B)Sox2、(C)巢蛋白和(D)PLP 相对于肌动蛋白对照的定量分析。脑组织在 MCAO 后 7 天分离。巢蛋白和 Sox2 是神经干前体细胞的标志物。PLP 是髓鞘形成的标志物。

[0016] 图 4A-4D:示出了用同型对照或 MAb 67-2 处理的 MCAO 小鼠中,大脑和纹状体在经处理的和未处理的半球体中的相对总体积。测量在 MCAO 之后的 30 天进行。图 4A-4B 示出了用 NeuN 染色的大脑切片,其来自(A)1 种代表性的同型对照(“对照 IgG”)小鼠,和(B)1 种代表性的用抗-SEMA4D 抗体处理的(“抗-SEMA4D”)小鼠。脑体积由纹状体(实线)和半球体(虚线)的体积表示。图 4C-4D 分别示出了同型对照(“IgG”)小鼠和抗 SEMA4D 抗体处理的(“SEMA”)小鼠的纹状体与半球体体积的计算比例(L/R)。

[0017] 图 5A-5B 示出 MCAO 后 30 天,成熟神经细胞标志物 NeuN 在(A)MAb 67-2(“Sema4D-Ab”)或(B)同型对照(“对照 IgG”)的 MCAO 小鼠中的表达情况。脑梗死的边缘部分的纹状体用箭头标记。

[0018] 图 6A-C 示出了在 MCAO 后的第 30 天,在 MCAO 小鼠和用同型对照(“IgG”)或 MAb 67-2(“SEMA4D”)处理之后的小鼠,或用假手术治疗的(“SHAM”)小鼠在明亮和黑暗状态下在敞箱实验中的活动能力。图 6A-6B 分别示出了在明亮和黑暗状态下的活动能力。图 6C 示出了活动能力的明亮/黑暗状态比(D/L)。

[0019] 图 7 示出了实施例 6 中描述的实验方案的示意图。

具体实施方式

[0020] I. 定义

[0021] 应理解,术语“一个”或“一种”实体是指一种或多种所述的实体;例如“一种抗-SEMA4D 抗体”应理解为代表一种或多种抗-SEMA4D 抗体。因此,在本文中术语“一个”(或“一种”)、“一种或多种”以及“至少一种”可以互换使用。

[0022] 术语“神经发生”在本文中定义为神经细胞在体内或体外的增殖、分化、迁移和/或存活。在不同的实施方案中,神经细胞是成人、胎儿、或胚胎的神经干细胞或细胞群。细

胞可以位于动物或人类的中枢神经系统或其他地方。细胞也可以位于组织、例如神经组织中。在一些实施方案中,神经细胞是成人、胎儿、或胚胎的祖细胞或细胞群,或者包含干细胞和祖细胞的细胞群。神经细胞包括所有脑干细胞、所有脑祖细胞,以及所有脑前体细胞。神经发生包括在正常发育期间发生的神经发生,以及在疾病、损伤或治疗性干预(例如本文中所描述的治疗)之后发生的神经再生。

[0023] 术语“神经细胞”、“干细胞”、“神经干细胞”、“前体细胞”、“神经干 / 前体细胞 (NSPC)”或“神经干 / 祖细胞 (NSPC)”可以互换使用,是指能够自我更新和分化成神经元、星形胶质细胞和 / 或少突胶质细胞的未分化细胞。

[0024] 本文中使用的术语“祖细胞”(例如神经祖细胞)是指来自于干细胞但本身不是干细胞的细胞。一些祖细胞可以产生能够分化成多于一种细胞类型的后代。神经祖细胞包括神经元祖细胞,其产生神经元,以及神经胶质祖细胞,其产生星形胶质细胞和 / 或少突胶质细胞。

[0025] 本文中使用的术语“中枢神经系统疾病”或“CNS 疾病”是指神经退行性疾病、急性脑损伤(例如中风、头部伤、脑性瘫痪、脑梗死、脊髓损伤、外伤)和一些中枢神经系统“CNS”功能障碍(例如抑郁、癫痫和精神分裂症)。

[0026] 本文中使用的术语“神经退行性疾病”是指阿尔茨海默氏病、亨廷顿氏病、肌萎缩性脊髓侧索硬化症、帕金森氏病和多发性硬化。应注意 CNS 疾病也可能是神经炎性病症。然而,在缺少明显的神经炎症的情况下也有可能存在神经退行性疾病。例如,在晚期的继发进展型多发性硬化的情况下就是如此。

[0027] 本文中使用的术语“急性脑损伤”是指中风、头部伤、脑性瘫痪、脑梗死、脊髓损伤、和外伤。

[0028] 本文中使用的术语“CNS 功能障碍”是指抑郁、癫痫和精神分裂症。

[0029] 术语“治疗有效量”是指有效“治疗”受试者或哺乳动物的疾病或病症的抗体、多肽、多核苷酸、有机小分子、或其他药物的量。对于神经炎性病症的情况,药物的治疗有效量可以通过如下方式促进神经发生:增加例如神经干细胞 / 前体细胞的增殖、分化、迁移和 / 或存活;减少、延缓或停止神经细胞的减少;抑制例如遏止、延缓、防止、停止或逆转神经细胞的减少;增加神经细胞的数量、密度和 / 或浓度;改变神经细胞的形态或功能;或者改变神经细胞间的相互作用;一定程度地缓解与神经细胞减少相关的一种或多种症状,例如神经炎你通过病症;减少发病率和死亡率;改进生活质量;或者这些作用的结合。

[0030] 诸如“治疗”、“缓解”的各种形式的术语是指(1)治愈、减缓、缓解症状、逆转和 / 或遏止所诊断的病理症状或疾病进展的治疗性措施,以及(2)阻止和 / 或减缓目标病理学症状或疾病进展的预防措施。因此,需要治疗的人包括已患有疾病;倾向于患有疾病;以及需要预防疾病的人。有利的或期望的临床结果包括但不限于缓解症状、疾病程度的减轻、疾病状态被稳定(即不会变坏)、延迟或减缓疾病的进展、缓解或减轻疾病状态、以及退行(无论是部分还是完全),无论是否可检测到。“治疗”也可以指相比于不接受治疗情况下预期的存活时间延长生存。需要治疗的人包括已患有疾病或病症的,以及倾向于患有疾病或病症的,或者待预防疾病或病症的人。

[0031] “受试者”或“个人”或“动物”或“患者”或“哺乳动物”是指任何需要诊断、预防或治疗的个体,特别是哺乳动物个体。哺乳动物个体包括人类、家畜、农场动物、以及动物园动

物、比赛动物或宠物,例如狗、猫、豚鼠、兔、大鼠、小鼠、马、牛、奶牛、熊等。

[0032] 本文中使用的短语“受益于给药抗-SEMA4D 抗体的受试者”以及“需要治疗的动物”包括这样的个体,例如哺乳动物个体:其会受益于给药抗-SEMA4D 抗体或所使用的其他 SEMA4D 结合分子,用于例如检测 SEMA4D 多肽(例如诊断操作),和/或会受益于用抗-SEMA4D 抗体或其他 SEMA4D 结合分子治疗,即减轻或预防疾病。

[0033] 本发明的“结合分子”或“抗原结合分子”最广义地是指特异性地结合抗原决定簇的分子。在一个实施方案中,结合分子特异性地结合 SEMA4D,例如结合大约 150kDa 的跨膜 SEMA4D 多肽或者大约 120kDa 的可溶性 SEMA4D(通常被称作 sSEMA4D)。在另一个实施方案中,本发明的结合分子是抗体或其抗原结合片段。在另一个实施方案中,本发明的结合分子包含抗体分子的至少一个重链或轻链 CDR。在另一个实施方案中,本发明的结合分子包含一个或多个抗体分子的至少两个 CDR。在另一个实施方案中,本发明的结合分子包含来自一个或多个抗体分子的至少三个 CDR。在另一个实施方案中,本发明的结合分子包含来自一个或多个抗体分子的至少四个 CDR。在另一个实施方案中,本发明的结合分子包含来自一个或多个抗体分子的至少五个 CDR。在另一个实施方案中,本发明的结合分子包含来自一个或多个抗体分子的至少六个 CDR。

[0034] 本发明涉及一种促进患有神经退行性疾病、神经炎性疾病、急性脑损伤,以及一些 CNS 功能障碍的受试者中神经发生的方法,包括向该受试者给药抗 SEMA4D 结合分子,例如抗体或其抗原结合片段、变体或衍生物。除非特别指全长的抗体例如天然存在的抗体,否则术语“抗-SEMA4D 抗体”涵盖全长抗体以及该抗体的抗原结合片段、变体、类似物或衍生物,例如天然存在的抗体或免疫球蛋白分子,或人工抗体分子或以类似于抗体分子的方式结合抗原的片段。

[0035] 本文中使用的“人”或“全人(fully human)”抗体包括具有人免疫球蛋白的氨基酸序列的抗体,并且包括从人免疫球蛋白库中分离出的抗体,或从不表达内源性免疫球蛋白的一种或多种人免疫球蛋白的转基因动物中分离出的抗体,例如描述于下文以及例如 Kucherlapati 等人的美国专利 No. 5,939,598 中。“人”或“全人(fully human)”抗体还包括包含至少重链可变区,或至少重链和轻链可变区的抗体,其中所述可变区具有人免疫球蛋白可变区的氨基酸序列。

[0036] “人”或“全人”抗体也包括这样的上文所述“人”或“全人”抗体:其包含本文所描述抗体分子(例如 VH 区和/或 VL 区)的变体(包括衍生物)、基本上由本文所描述抗体分子(例如 VH 区和/或 VL 区)的变体(包括衍生物)组成,或者由本文所描述抗体分子(例如 VH 区和/或 VL 区)的变体(包括衍生物)组成,所述的抗体或其片段免疫特异性地结合 SEMA4D 多肽或其片段或变体。可以使用本领域技术人员已知的标准技术向编码人抗-SEMA4D 抗体的核苷酸序列中引入突变,包括但不限于,引起氨基酸置换的定点突变和 PCR 介导的突变。优选地,相比于参比的 VH 区、VHCDR1、VHCDR2、VHCDR3、VL 区、VLCDR1、VLCDR2 或 VLCDR3,变体(包括衍生物)编码少于 50 个氨基酸置换、少于 40 个氨基酸置换、少于 30 个氨基酸置换、少于 25 个氨基酸置换、少于 20 个氨基酸置换、少于 15 个氨基酸置换、少于 10 个氨基酸置换、少于 5 个氨基酸置换、少于 4 个氨基酸置换、少于 3 个氨基酸置换,或少于 2 个氨基酸置换。

[0037] 在一些实施方案中,氨基酸置换是保守的氨基酸置换,如下文将要进一步讨论的。

或者,突变可以沿全部或部分编码序列被随机地引入,例如通过饱和突变,并且可以筛选所得突变体的活性以确定保留活性(例如结合 SEMA4D 多肽的能力,例如人、鼠或人和鼠 SEMA4D)的突变体。“人”或“全人”抗体的这种变体(或其衍生物)也可被称作被“优化”或“抗原结合优化”的人或全人抗体,并且包括具有改进的抗原亲和性的抗体。

[0038] 术语“抗体”和“免疫球蛋白”在本文中可以互换使用。抗体或免疫球蛋白至少包含重链可变区,并且通常至少包含重链和轻链的可变区。脊椎动物系统的基础免疫球蛋白结构较为广泛已知。参见例如 Harlow 等人,(1988) *Antibodies: A Laboratory Manual* (第 2 版, Cold Spring Harbor Laboratory Press)。

[0039] 本文中使用的术语“免疫球蛋白”包括多种生物化学上有区别的宽泛类别的多肽。本领域技术人员会理解,重链被分为 γ 、 μ 、 α 、 δ 或 ϵ 几种,其中一些具有亚类(例如 $\gamma 1$ – $\gamma 4$)。这些链本身的性质决定了抗体的“类别”分别为 IgG、IgM、IgA、IgG 或 IgE。免疫球蛋白亚类(同种型),例如 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1 等已被很好地表征,并且已知其具有特定的功能。对于本领域技术人员而言,这些类别各自的修饰物和同种型根据本发明公开的内容是易于区分的,并且属于本发明的范围内。所有的免疫球蛋白类别明确地属于本发明的范围内,下文中的论述一般性地基于 IgG 类的免疫球蛋白分子。对于 IgG,标准的免疫球蛋白分子包括分子量约为 23000 道尔顿的两个相同的轻链多肽,以及分子量约为 53,000–70,000 道尔顿的两个相同的重链多肽。四个链通常通过二硫键以“Y”构型连接,其中从“Y”的口部开始,轻链将重链包含在内并继续穿过可变区。

[0040] 轻链被分为 κ 或 λ 链。每一种重链类别可以与一个 κ 或一个 λ 轻链结合。一般而言,轻链和重链彼此共价结合,并且两个重链的“尾”部通过共价二硫连接键彼此结合,或者当免疫球蛋白由杂交瘤、B 细胞或基因工程的宿主细胞产生时由非共价连接彼此结合。在重链中,氨基酸序列由在 Y 构型的分叉末端的 N 端直到每个链的底部的 C 端。

[0041] 轻链和重链均被分成结构同源区 and 功能同源区。术语“恒定”和“可变”以其功能定义使用。对此,应理解轻链(VL 或 VK)和重链(VH)部分的可变区决定抗原识别和特异性。相反,轻链(CL)和重链(CH1、CH2 或 CH3)的恒定区赋予重要的生物学特性,例如分泌、经胎盘迁移、Fc 受体结合、补体结合等。常规而言,恒定区的编号随着其与抗体的抗原结合位点或氨基末端越远而越大。N 端部分是可变区,C 末端部分是恒定区,CH3 和 CL 结构域事实上分别包含重链和轻链的羧基末端。

[0042] 如上文中所述,可变区允许抗体选择性地识别和特异性地结合抗原上的表位。也即,抗体的 VL 结构域和 VH 结构域,或者这些可变结构域中的互补决定区(CDR)的子集结合形成限定三维的抗原结合位点的可变区。这种四级抗体结构形成了存在于 Y 的每个臂末端的抗原结合位点。更具体地,抗原结合位点由 VH 和 VL 链每一个上的三个 CDR 限定。在一些情况下,例如在来源于骆驼品种或基于骆驼的免疫球蛋白工程化的某些免疫球蛋白分子中,完整的免疫球蛋白分子可仅由重链构成,而没有轻链。参见,例如 Hamers–Casterman 等人的 *Nature* 363:446–448(1993)。

[0043] 在天然存在的抗体中,存在于每个抗原结合结构域中的六个“互补决定区”或“CDR”是短的、非毗邻的氨基酸序列,其具有特殊的位置以针对抗体在含水环境中会具有的三维构型形成抗原结合结构域。抗原结合域中的其余氨基酸被称作“骨架”区域,显示出更少的分子间变异性。骨架区域大部分采用 β –折叠构型,CDR 形成连接 β –折叠结构的环,

并且在一些情况下形成所述 β -折叠结构的一部分。因此,骨架区域通过链间非共价相互作用形成支架为 CDR 提供正确定位。由定位的 CDR 形成的抗原结合结构域限制了与免疫反应性抗原的表位表面互补的表面。该互补的表面促进抗体与其关联表位非共价结合。本领域技术人员可以容易地确定任意给定重链或轻链可变结构域的各 CDR 和框架区域的氨基酸,因为它们是被精确限定的(见下文)。

[0044] 除非另有明确说明,在一个术语在本领域使用和/或认可两种或多种定义的情况下,本文所用的该术语的定义应包括所有这些含义。一个具体例子是使用术语“互补决定区(CDR)”描述在重链和轻链多肽的可变区内发现的非毗连抗原结合位点。这一特定区域的描述可参见通过引用全文纳入本文的 Kabat 等人(1983)Dept. of Health and Human Services, “Sequences of Proteins of Immunological Interest”(“具有免疫学重要性的蛋白质序列”),以及 Chothia 和 Lesk, J. Mol. Biol. 795:901-917(1987), 其中在对其进行互相比较时,所述定义包括重叠的氨基酸残基或氨基酸残基亚组。尽管如此,应用任一定义指代抗体或其变体的 CDR 均应落入本文所定义和使用的术语的范围。合适氨基酸残基包括上文引用的各参考文献中定义的 CDR,如下表 1 所示以作比较。包括特定 CDR 的准确残基编号取决于 CDR 的序列和大小。在给定抗体的可变区氨基酸序列的情况下,本领域技术人员可常规确定哪些残基包括哪个具体 CDR。

[0045] 表 1:CDR 定义¹

[0046]

	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

[0047] ¹表 1 中所有 CDR 定义的编号均根据 Kabat 等所述的编号规则(见下)。

[0048] Kabat 等也定义了适用于任何抗体的可变区序列的编号系统。本领域普通技术人员可毫无疑问地将“Kabat 编号”系统应用于任何可变区序列,而不依赖除序列本身外的任何实验数据。本文所用的“Kabat 编号”指 Kabat 等(1983)美国健康和公共服务部(U. S. Dept. of Health and Human Services), “Sequence of Proteins of Immunological Interest.” (“具免疫学重要性的蛋白质序列”)中所述的编号系统。除非另有说明,提到本发明抗-SEMA4D 抗体或其抗原结合片段、变体或衍生物中具体氨基酸残基的编号时,均指按照 Kabat 编号系统的编号。

[0049] 本发明的抗体或其抗原结合片段、变体、或衍生物包括但不限于:多克隆、单克隆、多特异性、人、人源化、灵长化或嵌合抗体,单链抗体,表位结合片段如 Fab、Fab' 和 F(ab')₂、

Fd、Fv、单链 Fv(scFv)、二硫键连接的 Fv(sdFv)、包含 VL 或 VH 结构域的片段、Fab 表达文库产生的片段和抗-个体基因型(抗-Id)抗体(包括例如,本文所述抗-SEMA4D 抗体的抗-Id 抗体)。scFv 分子是本领域已知的,参见例如,美国专利号 5,892,019。本发明抗体可以是任何类型(如 IgG、IgE、IgM、IgD、IgA 和 IgY)、类别(如 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1 和 IgA2 等)或亚类的免疫球蛋白分子。

[0050] 本文所用术语“重链部分”包括衍生自免疫球蛋白重链的氨基酸序列。在一些实施方案中,包含重链部分的多肽包括下组中的至少一个:VH 结构域、CH1 结构域、铰链(如上部、中部和/或下部铰链区)结构域、CH2 结构域、CH3 结构域或者其变体或片段。例如,本发明所用的结合多肽可包括含有 CH1 结构域的多肽链;含有 CH1 结构域、铰链区的至少一部分和 CH2 结构域的多肽链;含有 CH1 结构域和 CH3 结构域的多肽链;含有 CH1 结构域、铰链区的至少一部分和 CH3 结构域的多肽链,或者含有 CH1 结构域、铰链区的至少一部分、CH2 结构域和 CH3 结构域的多肽链。在另一实施方式中,本发明多肽包括含有 CH3 结构域的多肽链。另外,本发明所用的结合多肽可能缺少 CH2 结构域的至少一部分(例如,所有 CH2 结构域或其部分)。如上所述,本领域技术人员应理解,可修饰这些结构域(例如重链部分),以使它们的氨基酸序列不同于天然产生的免疫球蛋白分子。

[0051] 在本文公开的某些抗-SEMA4D 抗体,或其抗原结合片段、变体或衍生物中,多聚体的一条多肽链的重链部分与该多聚体的第二条多肽链的相同。或者,本发明含有重链部分的单体不同。例如,各单体可包含不同的靶结合位点,由此形成例如双特异性抗体。

[0052] 本发明方法中所用结合分子的重链部分可衍生自不同的免疫球蛋白分子。例如,多肽的重链部分可包含衍生自 IgG1 分子的 CH1 结构域和衍生自 IgG3 分子的铰链区。在另一个实例中,重链部分可包含部分衍生自 IgG1 分子、部分衍生自 IgG3 分子的铰链区。在另一个实例中,重链部分可包含部分衍生自 IgG1 分子、部分衍生自 IgG4 分子的嵌合铰链。

[0053] 本文所用术语“轻链部分”包括衍生自免疫球蛋白轻链,如 κ 或 λ 轻链的氨基酸序列。优选地,所述轻链部分包含 VL 或 CL 结构域中的至少一个。

[0054] 本文所述的抗-SEMA4D 抗体,或其抗原结合片段、变体或衍生物可根据它们识别或特异性结合的抗原,如本文所述的靶多肽(如 SEMA4D)的表位或部分进行描述或说明。靶多肽与抗体的抗原结合域特异性相互作用的部分是“表位”或“抗原决定簇”。靶多肽可包含单个表位,但通常包含至少两个表位,并可包括任意数量的表位,这取决于抗原的大小、构象和类型。而且,应该注意到,靶多肽上的“表位”可以是或可包括非多肽元件,例如表位可包括糖侧链。

[0055] 据信,抗体的肽或多肽表位最小大约是 4-5 个氨基酸。肽或多肽表位优选包含至少七个,更优选至少九个,最优选至少约 15 个至约 30 个氨基酸。由于 CDR 能以其三级形式识别抗原性肽或多肽,所以形成表位的氨基酸不一定是毗连的,在某些情况下甚至不一定在同一肽链上。本发明抗-SEMA4D 抗体识别的肽或多肽表位可包含 SEMA4D 中至少 4 个、至少 5 个、至少 6 个、至少 7 个、更优选至少 8 个、至少 9 个、至少 10 个、至少 15 个、至少 20 个、至少 25 个、或约 15 至约 30 个毗连或非毗连的氨基酸的序列。

[0056] “特异性结合”通常指该抗体通过其抗原结合域结合于表位,并且该结合必然伴随着抗原结合域和表位之间的某种程度的互补。按照这一定义,抗体通过其抗原结合域与表位的结合比与随机的无关表位的结合更容易时,称该抗体“特异性结合”该表位。本文术语

“特异性”用于定性分析某种抗体与某种表位结合的相对亲和力。例如,可认为抗体“A”对某给定表位的特异性高于抗体“B”,或者说抗体“A”结合表位“C”的特异性高于它对相关表位“D”的特异性。

[0057] “优先结合”指与结合相关的、相似的、同源的或类似的表位相比,该抗体更容易特异性结合某表位。因此,与相关表位相比,“优先结合”给定表位的抗体更可能结合该表位,即便这种抗体可能与相关表位发生交叉反应。

[0058] 作为非限制性示例,如果抗体与第一表位结合的解离常数 (K_D) 低于抗体与第二表位的 K_D ,则可认为抗体优先结合第一表位。在另一个非限制性例子中,如果抗体与第一表位结合的亲和力使 K_D 比抗体与第二表位的 K_D 低至少一个数量级,则可认为抗体优先结合第一抗原。在另一个非限制性例子中,如果抗体与第一表位结合的亲和力使 K_D 比抗体与第二表位的 K_D 低至少两个数量级,则可认为抗体优先结合第一表位。

[0059] 在另一个非限制性例子中,如果抗体与第一表位结合的解离速率 ($k(\text{off})$) 比抗体与第二表位的 $k(\text{off})$ 低,则可认为抗体优先结合第一表位。在另一个非限制性例子中,如果抗体与第一表位结合的亲和力使 $k(\text{off})$ 比抗体与第二表位的 $k(\text{off})$ 低至少一个数量级,则可认为抗体优先结合第一表位。在另一个非限制性例子中,如果抗体与第一表位结合的亲和力使 $k(\text{off})$ 比抗体与第二表位的 $k(\text{off})$ 低至少两个数量级,则可认为抗体优先结合第一表位。在解离速率 ($k(\text{off})$) 小于或等于 $5 \times 10^{-2} \text{sec}^{-1}$ 、 10^{-2}sec^{-1} 、 $5 \times 10^{-3} \text{sec}^{-1}$ 或 10^{-3}sec^{-1} 时,可以说本文所述的抗体或其抗原结合片段、变体或衍生物与本文公开的靶多肽(如 SEMA4D,如人、鼠或者人和鼠的 SEMA4D)或其片段或变体结合。更优选地,在解离速率 ($k(\text{off})$) 小于或等于 $5 \times 10^{-4} \text{sec}^{-1}$ 、 10^{-4}sec^{-1} 、 $5 \times 10^{-5} \text{sec}^{-1}$ 或 10^{-5}sec^{-1} 、 $5 \times 10^{-6} \text{sec}^{-1}$ 、 10^{-6}sec^{-1} 、 $5 \times 10^{-7} \text{sec}^{-1}$ 或 10^{-7}sec^{-1} 时,可以说本发明抗体与本文所述的靶多肽(如 SEMA4D,如人、鼠、或者人和鼠的 SEMA4D)或其片段或变体结合。

[0060] 在结合速率 ($k(\text{on})$) 大于或等于 $10^3 \text{M}^{-1} \text{sec}^{-1}$ 、 $5 \times 10^3 \text{M}^{-1} \text{sec}^{-1}$ 、 $10^4 \text{M}^{-1} \text{sec}^{-1}$ 或 $5 \times 10^4 \text{M}^{-1} \text{sec}^{-1}$ 时,可以说本文所述的抗体或其抗原结合片段、变体或衍生物与本文公开的靶多肽(如 SEMA4D,如人、鼠或者人和鼠 SEMA4D)或其片段或变体结合。更优选地,在结合速率 ($k(\text{on})$) 大于或等于 $10^5 \text{M}^{-1} \text{sec}^{-1}$ 、 $5 \times 10^5 \text{M}^{-1} \text{sec}^{-1}$ 、 $10^6 \text{M}^{-1} \text{sec}^{-1}$ 或 $5 \times 10^6 \text{M}^{-1} \text{sec}^{-1}$ 或 $5 \times 10^7 \text{M}^{-1} \text{sec}^{-1}$ 时,可以说本发明抗体与本文公开的靶多肽(如 SEMA4D,如人、鼠或者人和鼠的 SEMA4D)或其片段或变体结合。

[0061] 如果抗体优先结合给定表位以至于在某种程度上阻断参比抗体与该表位的结合,则可以说该抗体能竞争性抑制参比抗体与给定表位的结合。竞争性抑制可通过本领域已知的任何方法确定,例如竞争 ELISA 实验在参比抗体与给定表位的结合被抑制至少 90%、至少 80%、至少 70%、至少 60%或至少 50%时可以说抗体竞争性地抑制参比抗体与给定表位的结合。

[0062] 本文所用术语“亲和力”是单独表位与免疫球蛋白分子的 CDR 结合强度的衡量。参见例如 Harlow 等人 (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual* (《抗体:实验室手册》)(冷泉港实验室出版社 (Cold Spring Harbor Laboratory Press), 第 2 版), 第 27-28 页。本文所用术语“亲合力 (avidity)”指免疫球蛋白群体和抗原间复合物的总体稳定性,即免疫球蛋白混合物与抗原的功能性结合强度。参见例如, Harlow 等人, 第 29-34 页。亲合力既与群体中单个免疫球蛋白分子与特定表位的亲和力相关,也与免疫球蛋白分子和抗原的价

态相关。例如，二价单克隆抗体和具有高度重复表位结构的抗原，例如多聚体之间的相互作用是高亲合力的一个例子。

[0063] 本发明的抗-SEMA4D 抗体或其抗原结合片段、变体或其衍生物也可按照其交叉反应性进行描述或说明。本文所用术语“交叉反应性”指对某一种抗原具有特异性的抗体与第二种抗原发生反应的能力；它是两种不同抗原性物质之间相关性的衡量。因此，如果抗体与诱导其形成的表位以外的其他表位结合，则它具有交叉反应性。交叉反应性表位通常含有许多与诱导表位相同的互补结构特征，在某些情况下甚至比原始表位更适用。

[0064] 例如，某些抗体具有一定程度的交叉反应性，因为它们结合相关但不相同的表位，例如，与参比表位至少 95%、至少 90%、至少 85%、至少 80%、至少 75%、至少 70%、至少 65%、至少 60%、至少 55% 和至少 50% 同一性（按照本领域已知方法和本文所述方法计算）的表位。如果抗体不结合那些与参比表位具有少于 95%、少于 90%、少于 85%、少于 80%、少于 75%、少于 70%、少于 65%、少于 60%、少于 55% 和少于 50% 同一性（按照本领域已知方法和本文所述方法计算）的表位，则可以说该抗体具有很小的交叉反应性或不具有交叉反应性。如果某抗体不结合某表位的任何其它类似物、直向同源物或同源物，则可认为该抗体对该表位“高度特异”。

[0065] 本发明的抗-SEMA4D 结合分子，例如如抗体或其抗原结合片段、变体或衍生物可根据与本发明多肽（例如 SEMA4D，如人、鼠或者人和鼠的 SEMA4D）的结合亲和力进行描述或说明。优选的结合亲和力包括解离常数或 K_d 小于 $5 \times 10^{-2}M$ 、 $10^{-2}M$ 、 $5 \times 10^{-3}M$ 、 $10^{-3}M$ 、 $5 \times 10^{-4}M$ 、 $10^{-4}M$ 、 $5 \times 10^{-5}M$ 、 $10^{-5}M$ 、 $5 \times 10^{-6}M$ 、 $10^{-6}M$ 、 $5 \times 10^{-7}M$ 、 $10^{-7}M$ 、 $5 \times 10^{-8}M$ 、 $10^{-8}M$ 、 $5 \times 10^{-9}M$ 、 $10^{-9}M$ 、 $5 \times 10^{-10}M$ 、 $10^{-10}M$ 、 $5 \times 10^{-11}M$ 、 $10^{-11}M$ 、 $5 \times 10^{-12}M$ 、 $10^{-12}M$ 、 $5 \times 10^{-13}M$ 、 $10^{-13}M$ 、 $5 \times 10^{-14}M$ 、 $10^{-14}M$ 、 $5 \times 10^{-15}M$ 或 $10^{-15}M$ 的那些。在一些实施方式中，本发明的抗-SEMA4D 结合分子，如抗体或其抗原结合片段结合人 SEMA4D 的 K_d 为约 $5 \times 10^{-9}M$ 至约 $6 \times 10^{-9}M$ 。在另一实施方式中，本发明的抗-SEMA4D 结合分子，如抗体或其抗原结合片段结合鼠 SEMA4D 的 K_d 为约 $1 \times 10^{-9}M$ 至约 $2 \times 10^{-9}M$ 。

[0066] 本文所用术语“嵌合抗体”指免疫反应性区域或位点获自或衍生自第一物种，而恒定区（根据本发明，其可能是完整的、一部分或经修饰的）获自第二物种的任何抗体。在优选实施方式中，靶结合区域或位点来自非人来源（如小鼠或灵长动物）而恒定区是人的。

[0067] 本文所用术语“工程抗体”指重链或轻链或二者中的可变区的至少部分被来自已知特异性抗体的一个或多个 CDR 置换——以及如果必要，通过部分框架区置换和序列变化——而改变的抗体。虽然 CDR 可衍生自与产生框架区的抗体属于同一类别或亚类的抗体，但考虑到 CDR 衍生自不同类的抗体，优选衍生自不同物种的抗体。将已知特异性的非人抗体的一个或多个“供体”CDR 移植到人重链或轻链框架区内形成的工程抗体在本文中称为“人源化抗体”。可能不一定需要用来自供体可变区的完整 CDR 代替所有 CDR 就能将一种可变区的抗原结合能力转移给另一可变区。相反，可能只需要转移维持靶结合位点活性所必需的那些残基。

[0068] 进一步认识到，人源化抗体的重链或轻链或二者中可变区内的框架区可仅包含人来源的残基，在这种情况下人源化抗体的这些框架区称为“完全人框架区”（例如，MAb VX 15/2503，其以 MAb 2503 公开于美国专利申请 US 2010/0285036A1 中，该申请以引证的方式全部并入本文）。或者，如果需要，可以在人源化抗体的重链或轻链或二者的可变区的人框

架区的相应位置内工程改造供体可变区的框架区的一个或多个残基,以维持适当的结合或提高与 SEMA4D 抗原的结合。因此,以此方式工程改造的人框架区包含人和供体框架区残基的混合物,在本文中称为“部分人框架区”。

[0069] 例如,抗 -SEMA4D 抗体的人源化过程可基本按照 Winter 和同事所述方法进行(Jones 等, Nature 321:522-525(1986); Riechmann 等, Nature 332:323-327(1988); Verhoeyen 等, Science 239:1534-1536(1988)),即用啮齿动物或突变型啮齿动物 CDR 或 CDR 序列置换人抗 -SEMA4D 抗体的相应序列。也参见美国专利 No. 5, 225, 539、5, 585, 089、5, 693, 761、5, 693, 762、5, 859, 205, 其通过引用纳入本文。所得的人源化抗 -SEMA4D 抗体在人源化抗体的重链和 / 或轻链的可变区的全人框架区内,包含至少一个啮齿动物或突变型啮齿动物 CDR。在一些情况下,人源化抗 -SEMA4D 抗体的一个或多个可变区的框架区内的残基被相应非人(例如,啮齿动物)残基代替(参见例如,美国专利 No. 5, 585, 089、5, 693, 761、5, 693, 762 和 6, 180, 370),在这种情况下所得的人源化抗 -SEMA4D 抗体将在重链和 / 或轻链的可变区内包含部分人框架区。

[0070] 而且,人源化抗体可包含在受体抗体或供体抗体中没有的残基。进行这些修饰,以进一步改善抗体性能(例如,获得所需亲和力)。通常,人源化抗体将基本上包含至少一个、通常两个可变区的全部,其中全部或基本上全部的 CDR 对应于非人免疫球蛋白的 CDR,全部或基本上全部的框架区是人免疫球蛋白序列的框架区。人源化抗体还任选包含至少一部分免疫球蛋白恒定区(Fc),一般是人免疫球蛋白的 Fc。更多的细节参见 Jones 等, Nature, 331:522-525(1986); Riechmann 等, Nature, 332:323-329(1988); 和 Presta, Curr. Op. Struct. Biol., 2:593-596(1992),通过引用全文纳入本文。因此,这类“人源化”抗体可包括其中明显小于完整的人可变区被来自非人物种的相应序列所置换的抗体。实践中,人源化抗体通常是一些 CDR 残基和可能的一些框架残基被啮齿动物抗体中相似位点的残基所置换的人抗体。参见例如,美国专利 No. 5, 225, 539、5, 585, 089、5, 693, 761、5, 693, 762、5, 859, 205。也参见美国专利 No. 6, 180, 370 和国际公开号 W001/27160,其中公开了人源化抗体和用于产生对预定抗原具有提高的亲和力的人源化抗体的技术。

[0071] II. 神经干 / 前体细胞或神经干 / 祖细胞 (NSPC)

[0072] 神经发生一般是指产生新的神经元。神经发生传统地被认为仅在胚胎期和出生后早期发生,在成人脑中并没有显著的作用。然而,近年来有人推断神经发生出现在成年哺乳动物大脑的特定区域,并且在这些以及其他区域可能响应于损伤而被刺激。

[0073] 在中枢神经系统 and 外周神经系统的发育期间,神经干细胞增殖并分裂成祖细胞,其最终分化成构成成人大脑的细胞类型。来源于神经管的细胞产生中枢神经系统 (CNS) 的神经元和神经胶质细胞,而来源于神经嵴的细胞产生外周神经系统 (PNS) 的细胞。

[0074] 神经干 / 祖细胞及其治疗用途已在现有技术中有描述,例如参见 Bjorason 等的美国专利 No. 6, 638, 501; Snyder 等的美国专利 No. 6, 541, 255; Carpenter 等的美国专利 No. 6, 498, 018; Goldman 等的美国专利申请 20020012903; Palmer 等的 (2001) Nature 411(6833):42-3; Palmer 等的 (1997) Mol Cell Neurosci. 8(6):389-404; Svendsen 等的 (1997) Exp. Neurol. 148(1):135-46; 和 Shihabuddin (1999) Mol Med Today. 5(11):474-80。分离和培养神经干细胞的方法是现有技术中已知的,参见美国专利 No. 6, 777, 233; 美国专利 No. 6, 497, 872, 和美国专利申请 20030143737A1。所有这些文献均通过引证的方式具体

纳入本文。

[0075] 神经干细胞和前体细胞通过如下方式参与正常发育：其沿完善的迁移途径迁移至播散性 CNS 区域，分化成响应于微环境线索的细胞类型，并与宿主祖细胞及其后代分散排布。人的神经干细胞能够在这些播散地点体内表达外源基因。因此，这些细胞有可能用于治疗多种影响 CNS 的疾病，包括退行性疾病（如阿尔茨海默氏症和帕金森氏症），急性脑损伤（如中风，头部损伤，脑性麻痹）和大量的 CNS 功能障碍（例如抑郁症，癫痫症和精神分裂症）。

[0076] 近年来由于患病风险最大的老年人口数扩大，神经退行性疾病已经成为一个重要的问题。这些疾病——包括阿尔茨海默氏病、亨廷顿氏病、肌萎缩性脊髓侧索硬化和帕金森氏病——与神经细胞在 CNS 特定位置的退化有关，从而导致这些细胞或大脑区域丧失执行其预定功能的能力。

[0077] 在称为基底神经节的脑区域的退化可导致具有多种认知和运动症状的疾病，这取决于其确切位置。基底神经节由许多分开的区域组成，包括纹状体（其由尾和壳核组成）、苍白球、黑质 (substantia nigra)、质无名 (substantia innominate)、腹面钹 (ventral palladium)、Meynert 基底核 (nucleus basalis of Meynert)，腹侧被盖区和底丘脑核。

[0078] 例如，在阿尔茨海默氏病中，在前脑和大脑皮层存在细胞退化。此外，在基底神经节、Meynert 基底核区域似乎存在局部退化。这种核通常发送胆碱突起到大脑皮层，这被认为参与认知功能，包括记忆。另一方面，对于亨廷顿氏舞蹈病，在纹状体中存在神经元的退化，这导致宿主不自主的痉挛动作。此外，对于帕金森氏病，退化被认为是发生在基底神经节的另一个区域，黑质致密部。一般来说，这个区域将多巴胺能连接 (dopaminergic connection) 送至背侧纹状体，这对于调节运动是重要的。帕金森氏病的治疗方法都集中在恢复多巴胺能在这种通路中的活性。在基底神经节的其它区域的退化也是可能的。例如，一个被称为底丘脑核的小区域的变性与被称为投掷样运动 (ballismus) 的病症中四肢剧烈运动相关，而壳核和苍白球的退化与缓慢扭动运动或手足徐动症的病症相关。

[0079] 除了神经退行性疾病以外，急性脑损伤经常会导致神经细胞损失，受影响的脑区域的不当运转，和随之而来的行为异常。除了细胞损失以外，个体还可能遭受现有神经细胞的功能异常。这可能是由于神经元的不适当发射或神经递质的异常合成、释放和加工所导致的。这些功能障碍可能是已被充分研究和表征的疾病（如抑郁和癫痫）或更少被了解的障碍（如神经官能症和精神病）的结果。其他形式的神经损伤可能由于神经退行（例如肌萎缩性侧索硬化和大脑性麻痹）而产生，或是更急性的 CNS 创伤（如发生在创伤性脑损伤 (TBI) 和中风情况下）的结果。

[0080] III. 靶多肽的描述

[0081] 如本文中所使用的术语“脑信号蛋白-4D”、“SEMA4D”和“SEMA4D 多肽”可以互换使用，如“SEMA4D”和“Sema4D”。在一些实施方案中，SEMA4D 在细胞的表面表达或被细胞分泌。在另一个实施方案中，SEMA4D 是膜结合的。在另一个实施方案中，SEMA4D 是可溶的，例如 sSEMA4D。在其他实施方案中，SEMA4D 可以包括全长的 SEMA4D 或其片段，或者 SEMA4D 变体多肽，其中 SEMA4D 片段或 SEMA4D 变体多肽保留全长 SEMA4D 的一些或全部功能性质。

[0082] 全长的人 SEMA4D 蛋白是由两个 150kDa 的多肽链组成的同源二聚体跨膜蛋白。SEMA4D 属于细胞表面受体的脑信号家族，也被称作 CD100。人和小鼠的 SEMA4D/Sema4D 均

从它们的跨膜形式以蛋白水解的方式裂解以生成 120-kDa 的可溶形式,这表明存在两种 Sema4D 异构体 (Kumanogoh 等人, *J. Cell Science* 116(7):3464(2003))。脑信号蛋白包括可溶的和膜结合的蛋白,其在发育过程中原先被定义为轴突引导因子,其在确定神经元及其合适的靶点之间的精确连接时具有重要的作用。从结构上看为 IV 类脑信号蛋白的 SEMA4D 由氨基末端的信号序列以及随后的特征性“Sema”结构域(其含有 17 个保守的半胱氨酸残基)、Ig 类结构域、富含赖氨酸的臂、疏水跨膜区和胞质尾组成。

[0083] SEMA4D 的各多肽链包含约 13 个氨基酸的信号序列,之后是约 512 个氨基酸的脑信号蛋白域,约 65 个氨基酸的免疫球蛋白样(Ig 样)结构域,104 个氨基酸的富含赖氨酸的臂,约 19 个氨基酸的疏水跨膜区,和 110 个氨基酸的胞质尾。在达成共识的胞质尾的酪氨酸磷酸化位点支持所预测的 SEMA4D 与酪氨酸激酶相连 (Schlossman 等, Eds. (1995) *Leucocyte Typing V* (牛津大学出版社,牛津))。

[0084] 已知 SEMA4D 具有至少三个受体:神经丛蛋白 (Plexin)-B1、神经丛蛋白 -B2 和 CD72。受体之一神经丛蛋白 -B1 在非淋巴组织表达,并已被证明是 SEMA4D 的一种高亲和力 (1nM) 受体 (Tamagnone 等人, *Cell* 99:71-80(1999))。在一些实施方案中,内皮细胞表达神经丛蛋白 -B1。已证明,SEMA4D 刺激神经丛蛋白 -B1 信号转导能诱导神经元的生长锥塌陷,并诱导少突胶质细胞的突起延伸破坏 (process extension collapse) 和细胞凋亡 (Giraudon 等人, *J Immunol.* 772:1246-1255(2004) ;Giraudon 等人, *NeuroMolecular Med.* 7:207-216(2005))。结合至 SEMA4D 后,神经丛蛋白 -B1 信号转导调节 R-Ras 的失活,导致整联蛋白调节的至胞外基质的粘附减少,并且也可能导致 RhoA 的失活,导致由细胞骨架的重组而引起的细胞塌陷。参见 Kruger 等人, *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* (5:789-800(2005) ;Pasterkamp, *TRENDS in Cell Biology* 75:61-64(2005))。神经丛蛋白 -B2 对于 SEMA4D 具有中间体亲和性,近来的报道指出 PLXNB2 在角质成形细胞中表达,并且活化 SEMA4D- 正 $\gamma \delta$ T 细胞以促进上皮修复 (Witherden 等人, *Immunity.* 2012Aug 24 ; 37(2):314-25)。

[0085] 在淋巴组织中,CD72 用作低亲和性 (300nM) SEMA4D 受体 (Kumanogoh 等, *Immunity* 13:621-631(2000))。B 细胞和 APC 表达 CD72,抗 -CD72 抗体具有许多与 sSEMA4D 相同的作用,如增强 CD40 诱导的 B 细胞应答和 B 细胞排出 CD23。认为 CD72 可通过征集能结合很多抑制性受体的酪氨酸磷酸酶 SHP-1 用作 B 细胞应答的负调节物。SEMA4D 与 CD72 的相互作用导致 SHP-1 的解离,从而丢失该负激活信号。已证明,SEMA4D 能在体外促进 T 细胞刺激以及 B 细胞的聚集和存活。加入表达 SEMA4D 的细胞或 sSEMA4D 能够在体外增强 CD40 诱导的 B 细胞增殖和免疫球蛋白产量,并在体内加速抗体应答 (Ishida 等, *Inter. Immunol.* 15:1027-1034(2003) ;Kumanogoh 和 H. Kukutani, *Trends in Immunol.* 22:670-676(2001))。sSEMA4D 增强 CD40 诱导的 DC 成熟,包括上调共同刺激分子和增加 IL-12 分泌。此外,sSEMA4D 可抑制免疫细胞迁移,这种抑制作用可通过加入阻断性抗 -SEMA4D 抗体得以逆转 (Elhabazi 等, *J. Immunol.* 166:4341-4347(2001) ;Delaire 等, *J. Immunol.* 166:4348-4354(2001))。

[0086] Sema4D 在淋巴器官和非淋巴器官中高水平表达,所述淋巴器官包括脾脏、胸腺和淋巴结,所述非淋巴器官包括例如,脑、心和肾。在淋巴器官中, Sema4D 在静息 T 细胞上大量表达,但在静息 B 细胞和抗原提呈细胞 (APC),如树突细胞 (DC) 上表达很弱。细胞活化能

提高 SEMA4D 的表面表达,以及可溶性 SEMA4D(sSEMA4D) 的产生。

[0087] SEMA4D 的表达模式提示,它在免疫系统中起到重要的生理学和病理学作用。已证明,SEMA4D 能促进 B 细胞活化、聚集和存活;增加 CD40- 诱导的增殖和抗体产生;增强对 T 细胞依赖性抗原的抗体应答;增加 T 细胞增殖;增强树突细胞的成熟和刺激 T 细胞的能力;并且与脱髓鞘和轴突变性直接相关联 (Shi 等, *Immunity* 13:633-642(2000);Kumanogoh 等, *J Immunol* 169:1175-1181(2002);和 Watanabe 等, *J Immunol* 167:4321-4328(2001))。

[0088] SEMA4D 敲除 (SEMA4D^{-/-}) 小鼠已提供额外证据证明 SEMA4D 在体液免疫和细胞免疫应答中均起到重要作用。尚不了解 SEMA4D^{-/-} 小鼠中非淋巴组织的任何异常。来自 SEMA4D^{-/-} 小鼠的树突细胞 (DC) 具有较差的同种异体刺激 (allostimulatory) 能力,并显示共同刺激分子的表达有缺陷,该缺陷可通过加入 sSEMA4D 加以挽救。SEMA4D 缺失小鼠 (SEMA4D^{-/-}) 无法产生髓磷脂少突胶质细胞糖蛋白肽诱导的实验性自身免疫性脑脊髓炎,因为在不存在 SEMA4D 时不产生髓磷脂少突胶质细胞糖蛋白 - 特异性 T 细胞 (Kumanogoh 等, *J Immunol* 169:1175-1181(2002))。在易生自身免疫病的 MRL/lpr 小鼠 (全身性自身免疫病如 SLE 的模型) 的血清中也检测到显著量的可溶性 SEMA4D,但在正常小鼠中检测不到。另外, sSEMA4D 水平与自身抗体水平相关,并随年龄增加 (Wang 等, *Blood* 97:3498-3504(2001))。还证明,可溶性 SEMA4D 能在脱髓鞘疾病患者的脑脊液和血清中累积,而 sSEMA4D 能诱导人全能神经前体 (Dev 细胞) 凋亡,二者在体外都抑制突起延伸并诱导大鼠少突胶质细胞的凋亡 (Giraudon 等, *J Immunol* 172(2):1246-1255(2004))。此种凋亡被抗 -SEMA4D MAbs 阻断。

[0089] IV. 抗 -SEMA4D 抗体

[0090] 本领域记载了结合 SEMA4D 的抗体。参见例如,美国公开号 US2008/0219971A1、US2010/0285036A1 和 US2006/0233793A1,国际专利申请 W093/14125、W0 2008/100995 和 W0 2010/129917,以及 Herold 等, *Int. Immunol.* 7(1):1-8(1995),各自通过引用全文纳入本文。

[0091] 本发明总体上涉及一种促进具有神经退行性疾病、神经炎性疾病、急性脑损伤和一些 CNS 功能障碍的受试者 (例如人患者) 的神经再生的方法,包括给药特异性地结合 SEMA4D 的抗体或其抗原结合片段、变体或衍生物。在一些实施方案中,抗体阻断 SEMA4D 与一种或多种其受体,例如神经丛蛋白 -B1 的相互作用。具有这些特性的抗 -SEMA4D 抗体可以用于本文提供的方法中。可以使用的抗体包括但不限于 MAbs VX15/2503、67 和 76,及其抗原结合片段、变体或衍生物,它们被充分地描述在 US2010/0285036A1。可用于本文所提供的方法中的其他抗体包括描述在 US2006/0233793A1 中的 BD16 和 BB18,以及其抗原结合片段、变体或衍生物;或者描述于 US2008/0219971A1 中的 MAbs 301、MAbs 1893、MAbs 657、MAbs 1807、MAbs 1656、MAbs 1808、MAbs 59、MAbs 2191、MAbs 2274、MAbs 2275、MAbs 2276、MAbs 2277、MAbs 2278、MAbs 2279、MAbs 2280、MAbs 2281、MAbs 2282、MAbs 2283、MAbs 2284 和 MAbs 2285 中任一种或其任意片段、变体或衍生物。在一些实施方案中,用于本文提供的方法中的抗 -SEMA4D 抗体结合人、鼠或人和鼠的 SEMA4D。还可以使用与上述抗体相同的表位结合的抗体和 / 或竞争性抑制上述抗体任一种的抗体。

[0092] MAbs 67VH 和 VK 基因的氨基酸序列如下所示,其中 CDR1、CDR2 和 CDR3 区域用下划线示出。

[0093] MA b 67VH :

[0094] QVQLQQSGPELVKPGASVKISCKASGYSFSDYYMHWVKQSPENSLEWIGQINPTTGGASYNQKFKGKAT
LTVDKSSSTAYMQLKSLTSEESAVYYCTRYYYGRHFDVWGQGT TTVTVSS (SEQ ID NO :1)

[0095] MA b 67VK :

[0096] DIVMTQSPASLAVSLGQRATISCKAAQSVDDYDGDSYMNWYQQKPGQPPKLLIYAASNLESGIPARFSGS
GSGTDFTLNIGPVEEEDAATYYCQQSNEDPYTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO :2)

[0097] 人源化 MA b 67VH (H2160) 和 VK (L553) (“MA b VX15/2503”) 的氨基酸序列如下所示, 其中 CDR1、CDR2 和 CDR3 区域用下划线示出。

[0098] H2160 序列 :

[0099] QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYSFSDYYMHWVRQAPGQGLEWMGQINPTTGGASYNQKFKGKAT
ITVDKSTSTAYMELSSLRSED TAVYYCARYYYGRHFDVWGQGT TTVTVSS (SEQ ID NO :3)

[0100] L553 序列 :

[0101] DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKASOSVDYDGDSYMNWYQQKPGQPPKLLIYAASNLESGVPDRFSGS
GSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQSNEDPYTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO :4)

[0102] 在一些实施方式中, 可用于本文所提供的方法中的抗 -SEMA4D 抗体或其抗原结合片段、变体或衍生物具有与参比抗 -SEMA4D 抗体分子 (例如上文所述的 VX15/2503 和 67) 相比, 至少约 80%、约 85%、约 88%、约 89%、约 90%、约 91%、约 92%、约 93%、约 94% 或约 95% 的序列同一性的氨基酸序列。在其他实施方案中, 结合分子具有与参比抗体相比至少约 96%、约 97%、约 98%、约 99% 或 100% 的序列同一性。

[0103] 在另一个实施方案中, 可用于本文所提供的方法中的抗 -SEMA4D 抗体或其抗原结合片段、变体或衍生物包含如下、基本上由如下组成, 或者由如下组成: 免疫球蛋白重链可变区 (VH 结构域), 其中 VH 结构域的至少一个 CDR 具有与 SEQ ID NO:1 或 3 的 CDR1、CDR2 或 CDR3 至少约 80%、约 85%、约 90%、约 95%、约 96%、约 97%、约 98%、约 99% 同一性或相同的氨基酸序列。

[0104] 在另一个实施方案中, 可用于本文提供的方法中的抗 -SEMA4D 抗体或其抗原结合片段、变体或衍生物包含如下、基本上由如下组成, 或者由如下组成: 免疫球蛋白重链可变区 (VH 结构域), 其中 VH 结构域的至少一个 CDR 具有与 SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6 或 SEQ ID NO:7 至少约 80%、约 85%、约 90%、约 95%、约 96%、约 97%、约 98%、约 99% 同一性或相同的氨基酸序列。

[0105] 在另一个实施方案中, 可用于本文提供的方法中的抗 -SEMA4D 抗体或其抗原结合片段、变体或衍生物包含如下、基本上由如下组成, 或者由如下组成: 免疫球蛋白重链可变区 (VH 结构域), 其中 VH 结构域的至少一个 CDR 具有与 SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6 或 SEQ ID NO:7 相同的氨基酸序列, 除了 1、2、3、4 或 5 个保守的氨基酸置换。

[0106] 在另一个实施方案中, 可用于本文提供的方法中的抗 -SEMA4D 抗体或其抗原结合片段、变体或衍生物包含如下、基本上由如下组成, 或者由如下组成: VH 结构域, 其具有与 SEQ ID NO:1 或 SEQ ID NO:3 具有至少约 80%、约 85%、约 90%、约 91%、约 92%、约 93%、约 94%、约 95%、约 96%、约 97%、约 98%、约 99% 或约 100% 的序列同一性的氨基酸序列, 其中抗 -SEMA4D 抗体包括编码特异性结合或优先结合 SEMA4D 的 VH 结构域。

[0107] 在另一个实施方案中, 可用于本文所提供的方法中的抗 -SEMA4D 抗体或其抗原结

合片段、变体或衍生物包含如下、基本上由如下组成,或者由如下组成:免疫球蛋白轻链可变区(VL 结构域),其中 VL 结构域的至少一个 CDR 具有与 SEQ ID NO:2 或 4 的 CDR1、CDR2 或 CDR3 至少约 80%、约 85%、约 90%、约 95%、约 96%、约 97%、约 98%、约 99% 同一性或相同的氨基酸序列。

[0108] 在另一个实施方案中,可用于本文所提供的方法中的抗-SEMA4D 抗体或其抗原结合片段、变体或衍生物包含如下、基本上由如下组成,或者由如下组成:免疫球蛋白轻链可变区(VL 结构域),其中 VL 结构域的至少一个 CDR 具有与 SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9 或 SEQ ID NO:10 至少约 80%、约 85%、约 90%、约 95%、约 96%、约 97%、约 98%、约 99% 同一性或相同的氨基酸序列。

[0109] 在另一个实施方案中,可用于本文所提供的方法中的抗-SEMA4D 抗体或其抗原结合片段、变体或衍生物包含如下、基本上由如下组成,或者由如下组成:免疫球蛋白轻链可变区(VL 结构域),其中 VL 结构域的至少一个 CDR 具有与 SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9 或 SEQ ID NO:10 相同的氨基酸序列,除了 1、2、3、4 或 5 个保守氨基酸置换。

[0110] 在另一个实施方案中,可用于本文所提供的方法中的抗-SEMA4D 抗体或其抗原结合片段、变体或衍生物包含如下、基本上由如下组成,或者由如下组成:VL 结构域,其具有与 SEQ ID NO:2 或 SEQ ID NO:4 具有至少约 80%、约 85%、约 90%、约 91%、约 92%、约 93%、约 94%、约 95%、约 96%、约 97%、约 98%、约 99% 或约 100% 的同一性的氨基酸序列,其中抗-SEMA4D 抗体包括编码特异性结合或优先结合 SEMA4D 的 VL 结构域。

[0111] 可用于本文所提供的方法中的还包括编码本文所述抗-SEMA4D 抗体、其抗原结合片段、变体或衍生物的多肽,编码该多肽的多核苷酸、包含该多核苷酸的质粒、以及包含这种质粒或多核苷酸的宿主细胞,其均用于产生本文描述方法中使用的抗-SEMA4D 抗体、其抗原结合片段、变体或衍生物。

[0112] 本发明抗-SEMA4D 抗体的合适的生物活性变体可用于本发明方法。这种变体将保留母体的抗-SEMA4D 抗体的所需结合性质。制备抗体变体的方法是本领域通常可获得的。

[0113] 诱变和改变核苷酸序列的方法是本领域众所周知的。参见例如, Walker 和 Gastra 编 (1983) *Techniques in Molecular Biology* (《分子生物学技术》) (纽约麦克米兰出版公司 (MacMillan Publishing Company)); Kunkel, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:488-492 (1985); Kunkel 等, *Methods Enzymol.* 154:367-382 (1987); Sambrook 等 (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (《分子克隆:实验室手册》) (纽约州冷泉港 (Cold Spring Harbor, N.Y.)); 美国专利 No. 4,873,192; 和其中引用的参考文献; 通过引用全文纳入本文。有关不影响感兴趣多肽生物学活性的合适氨基酸置换的指南可参见下述文献中的模型: Dayhoff 等 (1978), *Atlas of Protein Sequence and Structure* (《蛋白质序列和结构图册》) (华盛顿特区的国家生物医学研究基金会 (Natl. Biomed. Res. Found., Washington, D.C.)), 第 345-352 页, 通过引用全文纳入本文。Dayhoff 等的模型利用点接受突变 (Point Accepted Mutation, PAM) 氨基酸相似矩阵 (PAM 250 矩阵) 来确定合适的保守性氨基酸置换。可以优选保守置换, 如用具有相似特性的另一氨基酸置换某种氨基酸。Dayhoff 等的模型中 PAM 250 矩阵教导的保守氨基酸置换的例子包括但不限于: Gly↔Ala、Val↔Ile↔Leu、Asp↔Glu、Lys↔Arg、Asn↔Gln 和

Phe↔Trp↔Tyr。

[0114] 在构建抗-SEMA4D 结合分子,如抗体或其抗原结合片段、感兴趣的多肽的过程中,进行的修饰应使变体仍具有所需特性,例如,能够特异性结合 SEMA4D,如人、鼠或者人和鼠的 SEMA4D,例如在细胞表面表达或由细胞分泌的 SEMA4D,以及具有 SEMA4D 阻断活性,如本文所述。显然,编码变体多肽的 DNA 中出现的任何突变一定不能将序列置于阅读框外,优选不产生可能产生二级 mRNA 结构的互补区。参见欧洲专利申请公开 No. 75, 444。

[0115] 测定抗-SEMA4D 结合分子,如抗体或其抗原结合片段、变体或衍生物的结合特异性的方法包括但不限于:标准竞争结合实验、T 细胞或 B 细胞的免疫球蛋白分泌的监测实验、T 细胞增殖实验、凋亡实验、ELISA 实验等。参见例如 W093/14125 ;Shi 等, Immunity 13:633-642(2000) ;Kumanogoh 等, J Immunol 169:1175-1181(2002) ;Watanabe 等, J Immunol 167:4321-4328(2001) ;Wang 等, Blood 97:3498-3504(2001) ;和 Giraudon 等, J Immunol 172(2):1246-1255(2004) 公开的实验,通过引用将其全文纳入本文。

[0116] 本文在讨论本文公开的任何具体多肽,包括恒定区、CDR、VH 结构域或 VL 结构域是否与另一多肽至少约 65%、约 70%、约 75%、约 80%、约 85%、约 90%、约 91%、约 92%、约 93%、约 94%、约 95%、约 96%、约 97%、约 98%、约 99%或甚至约 100%相同时,同一性%可采用本领域已知的方法和计算机程序/软件测定,例如但不限于 BESTFIT 程序(威斯康星序列分析软件包,用于 Unix 系统的第 8 版,遗传学计算机团队(Genetics Computer Group),大学研究园区(University Research Park),科学大道 575 号(575Science Drive),威斯康星州麦迪逊),53711)。BESTFIT 利用 Smith 和 Waterman(1981)Adv. Appl. Math. 2:482-489 的局部同源性算法,找到两条序列之间的最佳同源性区段。使用 BESTFIT 或任何其它序列比对程序来确定某具体序列是否与本发明参比序列(例如)95%相同时,当然要设定参数使得在参比多肽序列的全长上计算同一性百分数,并且在参比序列的氨基酸总数中允许至多有 5%的同源性缺口。

[0117] 出于本发明目的,可采用史密斯-沃特曼(Smith-Waterman)同源性搜索算法测定序列同一性百分数,该算法使用仿射缺口搜索,其中缺口开放罚 12 分,缺口延伸罚 2 分,BLOSUM 矩阵计 62 分。Smith 和 Waterman(1981)Adv. Appl. Math. 2:482-489 中公开了史密斯-沃特曼同源性搜索算法。变体与参比抗-SEMA4D 抗体(如 MAbs VX15/2503、67 或 76)可以相差,例如,少至 1-15 个氨基酸残基,少至 1-10 个氨基酸残基,如 6-10 个,少至 5 个,少至 4、3、2、或者甚至 1 个氨基酸残基。

[0118] 可以多种方式使抗-SEMA4D 抗体的恒定区突变以改变效应物功能。例如,参见美国专利 No. 6, 737, 056B1 和美国专利申请公开 No. 2004/0132101A1,其公开了优化抗体与 Fc 受体结合的 Fc 突变。

[0119] 在可用于本文所提供的方法中的某些抗-SEMA4D 抗体或其片段、变体或衍生物中,可利用本领域已知技术突变 Fc 部分以降低效应物功能。例如,恒定区结构域的缺失或失活(通过点突变或其它方式)可降低循环的修饰抗体与 Fc 受体的结合,从而提高肿瘤定位。在其它情况下,可能是与本发明相一致的恒定区修饰调节互补物结合,从而缩短所血清半衰期。可利用恒定区的其它修饰来改变二硫键连接或寡糖部分,以便因抗原特异性或抗体柔性提高而加强定位。无需过多实验,即可容易地利用熟知的免疫学技术测定或定量分析修饰所得的生理学概况、生物利用度和其它生化作用,如肿瘤定位、生物分布和血清半衰

期。

[0120] 用于本文提供的方法中的抗-SEMA4D 抗体也包括修饰的衍生物,例如通过将任何类型的分子共价连接到抗体上,使得该共价连接不会防止抗体特异性结合其关联表位的衍生物。例如但不限于,抗体衍生物包括通过,例如糖基化、乙酰化、PEG 化、磷酸化、酰胺化、通过已知保护/封闭基团衍生化、蛋白水解切割、连接于细胞配体或其它蛋白质等方法修饰的抗体。通过已知技术可进行多种化学修饰中的任何一种,包括但不限于:特异性化学切割、乙酰化、甲酰化等。此外,衍生物可包含一种或多种非经典氨基酸。

[0121] “保守性氨基酸置换”是氨基酸残基被具有带相似电荷的侧链的氨基酸残基置换。本领域已定义具有带相似电荷的侧链的氨基酸残基家族。这些家族包括,具有碱性侧链的氨基酸(如赖氨酸、精氨酸、组氨酸)、具有酸性侧链的氨基酸(如天冬氨酸、谷氨酸)、具有不带电的极性侧链的氨基酸(如甘氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸、半胱氨酸)、具有非极性侧链的氨基酸(如丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸、色氨酸)、具有 β -分支侧链的氨基酸(如苏氨酸、缬氨酸、异亮氨酸)和具有芳族侧链的氨基酸(如酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、组氨酸)。或者,也可沿所有或部分编码序列随机引入突变(例如通过饱和诱变),可筛选所得突变体的生物学活性,以鉴定保持活性(例如,结合抗-SEMA4D 多肽的能力、阻断 SEMA4D 与其受体相互作用的能力、或者促进受试者神经发生的能力)的突变体。

[0122] 例如,可能仅在抗体分子的框架区内或仅在 CDR 区内引入突变。引入的突变可能是沉默或中性错义突变,即对抗体的抗原结合能力没有影响或影响很小。可使用这些突变类型来优化密码子使用,或提高杂交瘤的抗体产量。或者,非中性错义突变可改变抗体的抗原结合能力。本领域技术人员能够设计和检测具有所需特性,例如抗原结合活性无改变或结合活性有改变(如抗原结合活性提高或抗体特异性改变)的突变分子。诱变后,可通过常规方式表达编码蛋白,并可利用本文所述技术或本领域已知的常规修饰技术测定该编码蛋白的功能和/或生物学活性(例如,免疫特异性结合 SEMA4D 多肽的至少一个表位的能力)。

[0123] 在某些实施方式中,用于本文提供的方法的抗-SEMA4D 抗体包含至少一个优化的互补决定区(CDR)。“优化 CDR”指该 CDR 已被修饰和优化,以赋予包含该优化 CDR 的抗-SEMA4D 抗体的维持或提高的结合亲和力和/或抗-SEMA4D 活性。“抗-SEMA4D 活性”或“SEMA4D 阻断活性”可包括调节一种或多种与 SEMA4D 相关的下述活性的活性: B 细胞活化、聚集和存活; CD40- 诱导的增殖和抗体生产; 对 T 细胞依赖性抗原的抗体应答; T 细胞或其它免疫细胞增殖; 树突细胞成熟; 髓鞘和轴突变性; 全能神经前体和/或少突胶质细胞的凋亡; 诱导内皮细胞迁移; 抑制自发性单核细胞迁移; 结合细胞表面神经丛蛋白-B1 或其他受体; 或与可溶性 SEMA4D 或 SEMA4D+ 细胞表面上表达的 SEMA4D 相关的任何其它活性。抗-SEMA4D 活性也可用于解释与 SEMA4D 表达相关的疾病的发病率或严重程度降低,这些疾病包括但不限于: 包括淋巴瘤的某些类型的癌症、自身免疫病、炎性疾病(包括中枢神经系统(CNS)和外周神经系统(PNS)炎性疾病),移植物排斥和侵袭性血管新生。基于鼠抗-SEMA4D MAbs BD16 和 BB18 的优化抗体的例子可参见美国公开 No. 2008/0219971A1, 国际专利申请 W093/14125 和 Herold 等, Int. Immunol. 7(1):1-8(1995), 其通过引用全文纳入本文。所述修饰可包括置换 CDR 内的氨基酸残基,以使抗-SEMA4D 抗体保持对 SEMA4D 抗原的特异性并具有提高的结合亲和力和/或提高抗-SEMA4D 活性。

[0124] 在一些实施方案中,本申请的结合分子,例如抗-SEMA4D 抗体或其抗原结合片段抑制 SEMA4D 活性和/或 SEMA4D 与 SEMA4D 受体或其部分的相互作用。在一些实施方案中,抑制的 SEMA4D 活性包括如下的一种或多种: B 细胞活化、聚集和存活; CD40- 诱导的增殖和抗体生产; 对 T 细胞依赖性抗原的抗体应答; T 细胞或其它免疫细胞增殖; 树突细胞成熟; 脱髓鞘和轴突变性; 全能神经前体和/或少突胶质细胞的凋亡; 诱导内皮细胞迁移; 抑制自发性单核细胞迁移; SEMA4D 二聚化; 结合细胞表面神经丛蛋白-B1 或其他受体; 或与可溶性 SEMA4D 或 SEMA4D+ 细胞表面上表达的 SEMA4D 相关的任何其它活性。

[0125] 本文中使用的“抑制”可包括部分或全部阻断例如结合、活性、功能、相互作用、或其他可测定的特征。

[0126] V. 使用治疗性抗-SEMA4D 抗体的治疗方法

[0127] 本发明的方法涉及使用抗-SEMA4D 结合分子,例如抗体,包括其抗原结合片段、变体和衍生物,来促进具有神经退行性疾病、神经炎性疾病、急性脑损伤和某些 CNS 功能障碍的受试者的神经发生。虽然以下描述是指给药抗-SEMA4D 抗体,但本文中描述的方法也适用于这些抗-SEMA4D 抗体的保留了本发明抗-SEMA4D 抗体期望特性的抗原结合片段、变体和衍生物,所述期望特征例如能够特异性结合 SEMA4D,例如人、鼠、或人和鼠的 SEMA4D,具有 SEMA4D 中和活性,和/或阻断 SEMA4D 与其受体,例如神经丛蛋白-B1 的相互作用。

[0128] 在一个实施方案中,治疗包括向患者施用或给药本文描述的抗-SEMA4D 结合分子,例如抗体或其抗原结合片段,其中所述患者患有神经退行性疾病、神经炎性疾病、急性脑损伤和某些 CNS 功能障碍,或者具有发展出这些病症的风险。在另一个实施方案中,治疗还包括向患者施用或给药包含抗-SEMA4D 结合分子,例如抗体或其抗原结合片段的药物组合物,其中所述患者患有神经退行性疾病、神经炎性疾病、急性脑损伤和某些 CNS 功能障碍,或者具有发展出这些病症的风险。

[0129] 在一个实施方案中,给药至患者的包括抗-SEMA4D 结合分子(例如抗体或其抗原结合片段)的药物组合物可以以任何常规的形式递送,包括本领域中已知的可以通过血脑屏障(即作用于脑部)的任何形式。由于 SEMA4D 与受体在星形胶质细胞(其为对于保持血脑屏障完整性而言重要的脑固有细胞)上的相互作用,抗-SEMA4D 结合分子的施用或给药可以发生在血脑屏障的脑一侧,以阻止 SEMA4D 与其受体在星形胶质细胞上的相互作用。允许因子穿过血脑屏障的方法包括最小化因子的大小,提供一种可更容易穿过的疏水性因子,将调节剂缀合至具有跨越血脑屏障的显著渗透系数的载体分子。

[0130] 在另一个实施方案中,给药至患者的包括抗-SEMA4D 结合分子(例如抗体或其抗原结合片段)的药物组合物可以以任何常规的形式递送,包括本领域中已知的可以绕过血脑屏障(即作用于血液侧)的任何形式。由于 SEMA4D 与受体在星形胶质细胞(其为对于保持血脑屏障完整性而言重要的脑固有细胞)上的相互作用,抗-SEMA4D 结合分子的施用或给药可以发生在血脑屏障的血液侧。通过将抗-SEMA4D 结合分子暴露至血液侧的途径而给药抗-SEMA4D 结合分子,例如,包括但不限于静脉内给药,所述抗-SEMA4D 结合分子将能够抑制 SEMA4D 与 SEMA4D 受体或该受体在内皮细胞上表达的一部分的相互作用。在另一个实施方案中,血脑屏障可以被绕过,例如通过用含有编码生长因子的基因的表达质粒体内转染细胞,以使得细胞本身产生该因子。任何有用的对该细胞的基因修饰属于本发明的范围。例如,除了基因修饰细胞以表达生长因子以外,细胞也可被修饰以表达其他类型的神经

剂,例如神经递质。优选地,基因修饰通过用重组逆转录病毒感染排列在脑室区域的细胞,或者使用本领域已知的方法转染而实施。

[0131] 本文中描述的抗-SEMA4D 结合分子(例如抗体或其抗原结合片段)可用于治疗多种中枢神经系统疾病,例如神经退行性疾病、神经炎性疾病、急性脑损伤、以及某些 CNS 功能障碍。在一些实施方案中,中枢神经系统疾病——例如神经退行性疾病、神经炎性疾病、急性脑损伤、以及某些 CNS 功能障碍——的治疗包括促进神经发生。在其他实施方案中,中枢神经系统疾病——例如神经退行性疾病、神经炎性疾病、急性脑损伤、以及某些 CNS 功能障碍——的治疗包括增加祖细胞的增殖。在其他实施方案中,中枢神经系统疾病——例如神经退行性疾病、神经炎性疾病、急性脑损伤、以及某些 CNS 功能障碍——的治疗包括增强祖细胞的分化。在其他实施方案中,中枢神经系统疾病——例如神经退行性疾病、神经炎性疾病、急性脑损伤、以及某些 CNS 功能障碍——的治疗包括增加前体细胞或祖细胞的存活。

[0132] 在一个实施方案中,本发明涉及使用抗-SEMA4D 结合分子,例如抗体或其抗原结合片段、变体或衍生物作为药剂,特别是用于治疗或预防中枢神经系统疾病,例如神经退行性疾病、神经炎性疾病、急性脑损伤、以及某些 CNS 功能障碍,从而通过增加前体或祖细胞的增殖、增强其分化和/或增加其存活而促进神经发生。在一些实施方案中,本申请的方法增加了祖细胞的数量、增强了祖细胞的分化和/或增加了祖细胞的存活。

[0133] 根据本发明的方法,在本文其他地方限定的至少一种抗-SEMA4D 结合分子,例如抗体或其抗原结合片段、变体或衍生物可被用于促进中枢神经系统疾病的积极的治疗响应,所述中枢神经系统疾病例如神经退行性疾病、神经炎性疾病、急性脑损伤、以及某些 CNS 功能障碍。

[0134] 中枢神经系统疾病的“积极的治疗响应”想要包括与疾病中这些抗体的与抗炎性活性、抗血管生成活性、抗细胞凋亡活性等相关的改善,和/或与疾病相关的症状的改进。也即,可以观察到抗增殖作用、防止表达 SEMA4D 细胞或表达 SEMA4D 受体细胞的进一步增殖,减少炎症应答,包括但不限于减少炎症细胞因子、粘附分子、蛋白酶、免疫球蛋白(在含有 SEMA4D 或 SEMA4D 受体的细胞为 B 细胞时)及其组合等的分泌,增加抗炎性蛋白的产生、减少自身反应性细胞的数量、增加免疫耐受、抑制自身反应性细胞的存活、减少细胞凋亡、减少内皮细胞迁移、增加自发的单核细胞迁移、降低和/或减少被 sSEMA4D 或表达 SEMA4D 的细胞的刺激介导的一种或多种症状。这种积极治疗响应不限于给药途径,并且可能包括给药至供体、供体组织(例如器官灌注)、宿主、其任意组合等等。特别地,本文提供的方法涉及抑制、防止、减少、缓解或减轻患者的神经炎性疾病的发展。因此,例如疾病改善的特点在于不存在临床上可以观察到的症状、增殖/分化的增加、和/或前体或祖细胞的存活。抗-SEMA4D 结合分子,例如抗体或其抗原结合片段、变体或衍生物可以与至少一种或多种神经炎性疾病的其他治疗方法组合使用;其中所述其他疗法在抗-SEMA4D 结合分子,例如抗体或其抗原结合片段、变体或衍生物的疗法治疗之前、期间或之后进行。因此,当组合疗法包括给药抗-SEMA4D 结合分子,例如抗体或其抗原结合片段、变体或衍生物以及给药另一种治疗剂时,本发明的方法涵盖了共同给药、以先后顺序同时或连续地使用单独的制剂或单一的药物制剂。

[0135] VI. 药物组合物和给药方法

[0136] 本领域技术人员熟知或容易确定制备和向有需要的受试者给予本发明抗-SEMA4D

结合分子,如抗体或其抗原结合片段、变体或衍生物的方法。抗-SEMA4D 结合分子,如抗体或其抗原结合片段、变体或衍生物的给药途径可以是例如口服、胃肠道外、吸入或外用。本文所用术语“胃肠道外”包括例如,静脉内、动脉内、腹膜内、肌肉内、皮下、直肠或阴道给药。虽然所有这些给药形式均明确落入本发明范围,但给药形式的例子是注射液,特别是用于静脉内或动脉内注射或滴注。通常,合适的注射用药物组合物可包含缓冲剂(如乙酸盐、磷酸盐或柠檬酸盐缓冲剂)、表面活性剂(如聚山梨酯),以及任选的稳定剂(如人白蛋白)等。然而,在与本文内容相容的其它方法中,本发明抗-SEMA4D 结合分子,如抗体或其抗原结合片段、变体或衍生物可直接递送到不良细胞群的部位,从而提高患病组织与治疗剂的接触。

[0137] 如本文所用,本发明抗-SEMA4D 结合分子,如抗体或其抗原结合片段、变体或衍生物可以药理学有效量给予,用于在体内治疗神经炎性病症。在这方面,应理解,将配制本发明公开的结合分子,以利于给药并提高活性物质的稳定性。在一些实施方案中,本发明的药物组合物包含药理学上可接受的无毒无菌运载体,如生理盐水、无毒缓冲液、防腐剂等。出于本申请目的,抗-SEMA4D 结合分子,如抗体或其抗原结合片段、变体或衍生物的药理学有效量应被认为是足以实现有效靶点结合或足以实现例如改善具有中枢神经系统疾病(如神经退行性疾病、神经炎性疾病、急性脑损伤和一些 CNS 功能障碍)的神经发生的益处的量。

[0138] 本发明所用的药物组合物包含药理学上可接受的运载体,包括例如,离子交换物质、氧化铝、硬脂酸铝、卵磷脂,血清蛋白质如人血清白蛋白,缓冲物质如磷酸盐、甘氨酸、山梨酸、山梨酸钾、饱和植物脂肪酸的部分甘油酯混合物、水、盐或电解质,如硫酸鱼精蛋白、磷酸氢二钠、磷酸氢钾、氯化钠、锌盐、胶体二氧化硅、三硅酸镁、聚乙烯吡咯烷酮、纤维素基物质、聚乙二醇、羧甲基纤维素钠、聚丙烯酸酯、蜡、聚乙烯-聚氧丙烯-嵌段聚合物、聚乙二醇和羊毛脂。

[0139] 胃肠道外给药制剂包括无菌的水性或非水性溶液、混悬液和乳液。非水性溶剂的例子是丙二醇、聚乙二醇、植物油如橄榄油和可注射有机酯如油酸乙酯。水性载体包括例如,水、醇/水溶液、乳液或悬液,包括盐水和缓冲介质。在本发明中,药理学上可接受的运载体包括但不限于:0.01-0.1M 并优选 0.05M 的磷酸盐缓冲液或 0.8% 盐水。其它常见的胃肠道外载体包括磷酸钠溶液、林格右旋糖、右旋糖和氯化钠、乳酸林格溶液或不挥发油。静脉内运载体包括液体和营养补充剂、电解质补充剂,例如基于林格右旋糖的那些物质等。也可包含防腐剂和/或其它添加剂,例如,抗微生物剂、抗氧化剂、螯合剂和惰性气体等。

[0140] 更具体说,适用于注射使用的药物组合物包括无菌水溶液(水溶性时)或分散体,以及用于临用前配制无菌注射液或分散体的无菌粉末。在这种情况下,该组合物必须无菌,并应该是存在注射容易性(easy syringability)的流体。它应该在制造和储存条件下稳定,并且优选在保存过程中能够抵抗微生物如细菌和真菌的污染作用。载体可以是包含如水、乙醇、多元醇(例如甘油、丙二醇和液体聚乙二醇等)及其合适混合物的溶剂或分散介质。可通过使用涂覆材料如卵磷脂、如果是分散体则保持所需粒度以及使用表面活性剂,来维持合适的流动性。适用于本文所述治疗方法的制剂可参见 Remington's Pharmaceutical Sciences(《雷明顿药物科学》)(马克出版公司(Mack Publishing Co.))第 16 版(1980)。

[0141] 也可通过各种抗细菌剂和抗真菌剂,如对羟基苯甲酸酯类、氯丁醇、苯酚、抗坏血酸、硫柳汞等实现防止微生物的作用。在许多情况下,组合物中优选包含等张剂,例如糖、多

元醇如甘露醇、山梨醇或氯化钠。组合物中可包含延迟吸收的试剂如单硬脂酸铝和明胶以延长可注射组合物的吸收。

[0142] 在任何情况下,可按照需要,将所需量的活性化合物(如抗-SEMA4D 抗体或其抗原结合片段、变体或衍生物,本身或与其它活性剂联合)掺入含有本文所列的一种成分或多种成分的组合适溶剂,然后进行过滤除菌制得无菌注射溶液。通常,将活性化合物掺入含有碱性分散介质和上述其它所需成分的无菌载体中制备分散体。对于用于制备无菌注射液的无菌粉末,优选的制备方法是真空干燥和冷冻干燥,由之前无菌过滤的溶液得到活性组分和任何其它所需组分的粉末。注射制剂在无菌条件下按照本领域已知方法加工、装入容器,如安瓿、袋、瓶、注射器或小管中,并密封。另外,可包装该制剂,并以药盒形式出售。这类制品优选具有标签或药品说明书,表明相关组合物可用于治疗患有或倾向于患有疾病或病症的受试者。

[0143] 胃肠道外制剂可以是单一推注剂量,输注或起始推注剂量,随后给予维持剂量。这些组合物可以特定的固定间隔或可变间隔给予,例如每天一次,或“按需”给予。

[0144] 本发明的某些药物组合物可以用可接受的剂型口服给予,包括例如,胶囊、片剂、水性悬液或溶液。某些药物组合物也可通过鼻喷雾或吸入方式给予。这类组合物可制备成盐水溶液,其中采用苣醇或其它合适的防腐剂、吸收促进剂以提高生物利用度,和/或采用其它常规的增溶剂或分散剂。

[0145] 可与载体材料组合后得到单一剂量形式的抗-SEMA4D 结合分子,如抗体或其片段、变体或衍生物的量可以根据治疗时宿主以及具体的给药模式而变化。该组合物可作为单一剂量、多个剂量或在确定时间段通过输注给予。也可调整给药方案,以提供最优所需响应(例如,治疗或预防响应)。

[0146] 在本发明范围内,抗-SEMA4D 抗体或其抗原结合片段、变体或衍生物可按照上述治疗方法给予人或其它动物,其给予量足以产生疗效。本发明抗-SEMA4D 抗体,或其抗原结合片段、变体或衍生物可以常规剂型给予所述人或其它动物,该剂型是通过已知技术将本发明抗体与常规的药学上可接受的运载体或稀释剂混合制备的。本领域技术人员应认识到,药学上可接受的运载体或稀释剂的形式和特点是由等混合的活性成分含量、给药途径和其它已知变量决定的。本领域技术人员还应理解,可以使用包含一种或多种抗-SEMA4D 结合分子(如本发明抗体或其抗原结合片段、变体或衍生物)的混合物。

[0147] “治疗有效剂量或治疗有效量”或者“有效量”指在给药时,在患有待治疗疾病患者的治疗中带来阳性治疗响应(例如增加增殖、增强分化、和/或增加前体细胞或祖细胞的存活率)的抗-SEMA4D 结合分子,如抗体或其抗原结合片段的用量。

[0148] 用于促进神经再生时的本发明组合物的治疗有效剂量取决于多种不同因素,包括给药方式、目标部位、患者生理状态、患者是人或是动物、给予的其它药物和该治疗是预防性治疗或是治疗性治疗。在一些实施方式中,患者是人,但也可治疗非人哺乳动物,包括转基因哺乳动物。可采用本领域技术人员已知的常规方法确定治疗剂量,以优化安全性和效能。

[0149] 在给出本发明公开内容的情况下,本领域普通技术人员无需过多实验即可确定至少一种抗-SEMA4D 结合分子,如抗体或其结合片段、变体或衍生物的给予量。影响给药方式以及至少一种抗-SEMA4D 结合分子,如抗体或其抗原结合片段、变体或衍生物各自用量的

因素包括但不限于：接受治疗的个体的疾病严重程度、病史、年龄、身高、体重、健康状况和身体状况。类似地，抗-SEMA4D 结合分子，如抗体或其片段、变体或衍生物的给予量取决于给药方式、受试者是否接受单一剂量或多剂量的此种药剂。

[0150] 本发明还提供抗-SEMA4D 结合分子，如本发明抗体或其抗原结合片段、变体或衍生物在制备治疗受试者的神经炎性病症的药物中的应用，其中所述药物用于已用至少一种其它治疗预先治疗的受试者。“预先治疗”或“预治疗”指该受试者在接受包含抗-SEMA4D 结合分子，如抗体或其抗原结合片段、变体或衍生物的药物之前，接受过一种或多种其它治疗（例如，已用至少一种其它神经炎性病症疗法治疗）。“预先治疗”或“预治疗”包括在用包含抗-SEMA4D 结合分子，例如，本文所述的单克隆抗体 VX15/2503 或其抗原结合片段、变体或衍生物的药物开始治疗前 2 年内、18 个月内、1 年内、6 个月内、2 个月内、6 周内、1 个月内、4 周内、3 周内、2 周内、1 周内、6 天内、5 天内、4 天内、3 天内、2 天内、或者甚至 1 天内，用至少一种其它疗法治疗受试者。受试者不一定是一种或多种在先疗法预治疗的响应者。因此，接受包含抗-SEMA4D 结合分子，如抗体或其抗原结合片段、变体或衍生物的药物受试者可以对在先疗法的预治疗或者对一种或多种在先疗法（预治疗包括多种疗法时）有响应或无响应。

[0151] 除非另有说明，本发明的实施将采用细胞生物学、细胞培养、分子生物学、转基因生物学、微生物学、重组 DNA 和免疫学的常规技术，它们均在本领域技术范围内。这些技术在文献中已有充分描述。参见例如，Sambrook 等编 (1989)Molecular Cloning A Laboratory Manual(《分子克隆：实验室手册》)(第 2 版；冷泉港实验室出版社 (Cold Spring Harbor Laboratory Press))；Sambrook 等编 (1992)Molecular Cloning:A Laboratory Manual(《分子克隆：实验室手册》，(纽约州冷泉港实验室出版社 (Cold Springs Harbor Laboratory, NY))；D. N. Glover 编，(1985)DNA Cloning(《DNA 克隆》)，第 I 和 II 卷；Gait 编 (1984)Oligonucleotide Synthesis(《寡核苷酸合成》)；Mullis 等，美国专利 No. 4, 683, 195；Hames 和 Higgins 编 (1984)Nucleic Acid Hybridization(《核酸杂交》)；Hames 和 Higgins 编 (1984)Transcription And Translation(《转录和翻译》)；Freshney(1987)Culture Of Animal Cells(《动物细胞培养》)(ARL 公司 (Alan R. Liss, Inc.))；Immobilized Cells And Enzymes(《固定的细胞和酶》)(IRL 出版社) (1986)；Perbal(1984)A Practical Guide To Molecular Cloning(《分子克隆实践指南》)；论文，Methods In Enzymology(《酶学方法》)(学术出版社公司 (Academic Press, he.)，纽约州)；Miller 和 Calos 编 (1987)Gene Transfer Vectors For Mammalian Cells(《哺乳动物细胞的基因转移载体》)(冷泉港实验室出版社 (Cold Spring Harbor Laboratory))；Wu 等编，Methods In Enzymology(《酶学方法》)，第 154 和 155 卷；Mayer 和 Walker 编 (1987)Immunochemical Methods In Cell And Molecular Biology(《细胞和分子生物学中的免疫化学方法》)(伦敦的学术出版社 (Academic Press, London))；Weir 和 Blackwell 编 (1986)Handbook Of Experimental Immunology(《实验免疫学手册》)，第 I-IV 卷；Manipulating the Mouse Embryo(《小鼠胚胎操作》)，纽约州冷泉港的冷泉港实验室出版社 (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y.)，(1986)；以及 Ausubel 等 (1989)Current Protocols in Molecular Biology(《新编分子生物学实验指南》)(马里兰州巴尔的摩的约翰韦利父子公司 (John Wiley & Sons, Baltimore, Md.))。

[0152] 抗体工程的通用方法可参见 Borrebaeck 编辑 (1995) Antibody Engineering (《抗体工程》) (第 2 版; 牛津大学出版社 (Oxford Univ. Press))。蛋白质工程的通用方法可参见 Rickwood 等编 (1995) Protein Engineering, A Practical Approach; 《蛋白质工程, 实践方法》, (英国牛津, 牛津大学出版社的 IRL 出版公司 (IRL Press at Oxford Univ. Press, Oxford, Eng.))。抗体和抗体-半抗原结合的总体方法可参见: Nisonoff (1984) Molecular Immunology (《分子免疫学》) (第 2 版; 马萨诸塞州桑德兰的辛奥尔联合公司 (Sinauer Associates, Sunderland, Mass.)); 和 Steward (1984) Antibodies, Their Structure and Function (《抗体的结构和功能》) (Chapman and Hall, 纽约州纽约市)。此外, 本领域已知且没有特别描述的免疫学标准方法通常按照下述文献所述进行 Current Protocols in Immunology (《新编免疫学实验指南》), John Wiley & Sons; Stites 等编 (1994), Basic and Clinical Immunology (《基础和临床免疫学》) (第 8 版; Appleton 和 Lange, 康涅狄格州诺沃克 (Norwalk, Conn.)) 和 Mishell 和 Shiigi (编) (1980) Selected Methods in Cellular Immunology (《细胞免疫学中的所选方法》) (W. H. Freeman and Co., NY)。

[0153] 公开免疫学通用原理的标准参考文献包括: Current Protocols in Immunology (《新编免疫学实验指南》), John Wiley & Sons, New York; Klein (1982) J., Immunology: The Science of Self-Nonself Discrimination 《免疫学: 自身-非自身区别的科学的》(John Wiley & Sons, New York); Kermet 等编 (1980) Monoclonal Antibodies, Hybridoma: A New Dimension in Biological Analyses (《单克隆抗体, 杂交瘤: 生物学分析的新领域》) (纽约州普莱努公司 (Plenum Press, NY)); Campbell (1984) “Monoclonal Antibody Technology” in Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology (《生化和分子生物学实验室技术》中的“单克隆抗体技术”), Burden 等编 (阿姆斯特丹的埃尔斯威尔公司 (Elsevier, Amsterdam)); Goldsby 等编 (2000) Kuby Immunology (第 4 版; H. 弗里曼公司 (H. Freeman & Co.)); Roitt 等 (2001) Immunology (《免疫学》) (第 6 版; 伦敦: 摩兹比公司 (Mosby)); Abbas 等 (2005) Cellular and Molecular Immunology (《细胞和分子免疫学》) (第 5 版; Elsevier Health Sciences Division); Kontermann 和 Dubel (2001) Antibody Engineering (《抗体工程》) (Springer Verlag); Sambrook 和 Russell (2001) Molecular Cloning: A Laboratory Manual (《分子克隆: 实验室手册》) (冷泉港出版社 (Cold Spring Harbor Press)); Lewin (2003) Gene VIII 《基因 VIII》(普伦蒂斯霍尔出版社 (Prentice Hall) 2003); Harlow 和 Lane (1988) Antibodies: A Laboratory Manual (《抗体: 实验室手册》) (冷泉港出版社); Dieffer Aach 和 Dveksler (2003) PCR Primer (《PCR 引物》) (冷泉港出版社)。

[0154] 将上文中引用的所有参考文献以及其中引用的参考文献全文纳入本文作参考。

[0155] 通过说明的方式、而非限制的方式提供以下实施例。

[0156] 实施例

[0157] 实施例 1: 实验设计

[0158] 基础的实验设计如图 1 所示。6 周大的雄性 CB-17/1cr-1/1Jc1 小鼠 (“CB-17 小鼠”) 被用来评价抗-SEMA4D 抗体对于中风损伤后神经发生的作用。对小鼠进行大脑中动脉 (MCA) 阻塞 (MCAO)。简言之, 使动物处于由含 4% 三氟溴氯乙烷的 30% 氧/70% 笑气

混合物诱发的深度麻醉中,并且麻醉平面保持具有 1-2%三氟溴氯乙烷。永久的局灶性脑缺血通过连接和断开左侧大脑中动脉(MCA)的远端部分产生,如其他文献所述(Taguchi 等,2004,2007)。左 MCA 被从三氟溴氯乙烷麻醉的动物中跨过嗅束的远端(远端 M1 部分)分离、电灼和切断。MCA 区的脑血流量(CBF)如先前描述(Matsushita 等,1998)的方式监测。该小鼠株系产生的脑梗塞是高度可再现的,并且限于同侧大脑皮层(Taguchi 等,2004,2007)。

[0159] 阻塞后,小鼠被分成两组:治疗组用抗-SEMA4D 抗体 MA b 67-2 注射,对照组用 IgG 同型对照 MA b 2B8 注射。小鼠在 MCAO 后的 1 小时、3 小时、3 天、7 天、14 天和 21 天接受 0.6mg/kg 单克隆抗体的腹膜内(IP)注射。

[0160] 在 MCAO 后第 7 天,每个抗体注射组中的一个动物亚组被处死,取出脑,并通过免疫组织化学和逆转录-聚合酶链式反应(RT-PCR)进行分析。

[0161] 为进行脑切片的免疫组织化学分析,将动物灌注 2%的多聚甲醛赖氨酸高碘酸盐(PLP)固定液(0.75M 赖氨酸-HCl/0.01M 高碘酸盐/0.075M 磷酸盐缓冲液),并在低温恒温器中将脑切割成 20 μ m 厚的系列切片。将脑切片用 0.1%的 H₂O₂浸没,用磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤,并用如下稀释缓冲液(0.3% Triton-X-100/5% 马血清/PBS)中的一种或多种一抗过夜温育:神经元抗-NeuN(anti-NeuN)、神经干/前体细胞的抗-巢蛋白(anti-Nestin)和抗-Sox2(anti-Sox2)。在 PBS 中洗涤 3 次以后,将切片用合适的二抗温育 3 小时,对于 NeuN 染色,随后通过使用过氧化物酶 ABC Elite Kit(Vector Laboratories, Burlingame, CA)和二氨基联苯胺(DAB;Sigma)的 ABC 反应可以看到。为进行巢蛋白/Sox2 双免疫细胞化学,使用 FITC-(Sox2)和 Cy3-标记的(巢蛋白)二抗。荧光显微照片使用激光共聚焦显微镜获得。结果示于图 2A-E 中,并且在下文中详细讨论。

[0162] 为进行 RT-PCR 分析,在 MCAO 后 7 天从显微镜解剖的脑组织中分离出总 RNA,并制备 cDNA。cDNA 在如下条件下进行 PCR 扩增:94℃下 15 秒,56℃下 30 秒,68℃下 1 分钟(40 个循环)。引物序列如下:巢蛋白正向 CACTAGAAAGCAGGAACCAG(SEQ ID NO:11)和巢蛋白反向,AGATGGTTCACAATCCTCTG(SEQ ID NO:12)(扩增子大小,307bp);Sox2 正向,TTGGGAGGGGTGCAAAAAGA(SEQ ID NO:13)和 Sox2 反向,CCTGCGAAGCGCCTAACGTA(SEQ ID NO:14)(扩增子大小,312bp);蛋白脂质蛋白(PLP)正向,TGAGCGCAACGGTAACAGG(SEQ ID NO:15)和 PLP 反向,GGGAGAACACCATACATTCTGG(SEQ ID NO:16)(扩增子大小,295bp); β -肌动蛋白正向,GCTCGTCGTCGACAAGGGCTC(SEQ ID NO:17)和 β -肌动蛋白反向,CAAACATGATCTGGGTCATCTTCTC(SEQ ID NO:18)(扩增子大小,353bp)。结果示于图 3A-D 中,并在下文中详细讨论。

[0163] 对各组剩余的小鼠在 MCAO 后的第 14 天和 30 天进行行为评估。为了评估皮质功能,通过采用敞箱实验进行行为测试来分析小鼠。简言之,动物被允许在一个方形的丙烯酸盒(30×3×30 厘米)进行 20 分钟的自由搜索。在外壳的顶的光源是在最开始的 10 分钟(明亮阶段)是打开的,并在随后的 10 分钟内(黑暗阶段)关闭。在开放区域的 X 与 Y-边,两个红外光束被安装在地板上方 2cm 处,以 10 厘米的间隔隔开,在它们之间形成触发器电路。光束交叉由动物的总数进行计数,得分为移动行为(运动)。其结果示于图 6A-C,并在下面详细讨论。

[0164] 在 MCAO 后的 30 天,剩余的组中的小鼠被处死,将脑处理以进行 NeuN 免疫组织化

学分析。对小鼠经心灌注 4% 的多聚甲醛, 除去脑, 并将冠状切片 (14 μ m) 用 NeuN 的小鼠抗体染色, 之后与生物素化的羊抗鼠 IgG (Chemicon, Temecula, CA ;1/500) 反应, ABC Elite Kit (Vector Laboratories, Burlingame, CA) 和 DAB (Sigma) 作为色素原。被神经元核标记物 NeuN 占据的同侧和对侧大脑半球的面积使用 Image J 测定。同侧和对侧大脑半球的体积通过对冠状取向的同侧和对侧大脑半球的面积积分而计算出。同侧和对侧大脑半球体积的对合以 (同侧 / 对侧大脑半球体积) 计算。结果示于图 4A-D 和图 5A-B 中, 并在下文详细讨论。

[0165] 实施例 2 : 抗 -SEMA4D 抗体对于 MCAO 脑中神经干 / 前体细胞存在的作用。

[0166] 在 MCAO 后的 7 天, 考察抗 -SEMA4D 抗体对于神经干 / 前体细胞存在情况的影响。图 2 示出了在梗死边缘 (在图 2E 中标出) 的 2 个代表性区域的缺血组织的免疫细胞化学染色图像, 为用同型对照 (左图, A 和 C) 和抗 -SEMA4D 抗体处理的小鼠 (右栏, B 和 D)。这些结果示出, 与用对照抗体处理的小鼠相比, 用抗 -SEMA4D 抗体处理的小鼠具有增加的神经干 / 祖细胞标记物蛋白表达。这些数据表明, 抗 -SEMA4D 抗体可以保护神经干 / 前体细胞的数量和 / 或诱导缺血性脑的神经发生。

[0167] 在 MCAO 后 7 天, 通过常规的 RT-PCR 检测缺血组织中用抗 -SEMA4D 抗体和同型对照处理的神经干 / 前体细胞中 mRNA 的表达。这些结果示于图 3A-D 中。结果示出, 与用同型对照抗体处理的小鼠相比, 用抗 -SEMA4D 抗体处理的小鼠 Sox2、巢蛋白和 PLP 相对于管家基因 β -肌动蛋白的表达具有显著的增加 ($p < 0.05$)。由于 Sox2 和巢蛋白是神经干 / 前体细胞的标志物, 这些标志物在抗 -SEMA4D 抗体处理之后的表达增加表明抗 -SEMA4D 抗体可以促进神经发生。在抗 -SEMA4D 抗体处理后观察到的缺血性脑中神经发生的增加可以是神经干 / 前体细胞增殖增加的结果, 和 / 或是新形成的神经干 / 前体细胞的存活增加的结果。

[0168] 实施例 3 : 抗 -SEMA4D 抗体对于脑梗塞后脑体积的作用

[0169] MCAO 后 30 天时, 测定抗 -SEMA4D 抗体对于脑体积的作用。图 4A-4B 示出了用对成熟神经元标志物 NeuN 特异性的抗体染色的脑切片, 其中 1 个来源于代表性的同型对照小鼠 (左, 4A), 一个来源于代表性的用抗 -SEMA4D 抗体处理的小鼠 (右, 4B)。脑体积由纹状体 (实线) 和半球体 (虚线) 的体积表示。图 4C-4D 示出了每组经处理的小鼠各自的纹状体和半球体体积的计算比例 (L/R)。虽然在用抗 -SEMA4D 抗体处理的小鼠和用同型对照处理的小鼠之间, 总的脑半球体积 (短划线) 没有统计学显著的差异, 但用抗 -SEMA4D 抗体处理的小鼠比用对照抗体处理的小鼠具有显著更大的纹状体体积 (实线)。这些数据表明接近缺血焦点部位的纹状体区域可以由抗 -SEMA4D 抗体处理保护。

[0170] 实施例 4 : 抗 -SEMA4D 抗体对于 MCAO 大脑中神经元存在的作用

[0171] 在 MCAO 后 30 天, 测定了抗 -SEMA4D 抗体对于神经元在脑中存在情况的影响。图 5 示出了缺血脑组织的 NeuN- 染色的图像, 一个来源于代表性的同型对照小鼠 (下图, 5B), 一个来源于代表性的抗 -SEMA4D 抗体处理的小鼠 (上图, 5A)。这些结果示出, 相比于用对照抗体处理的小鼠, 用抗 -SEMA4D 抗体处理的小鼠中, 纹状体的脑梗塞 (箭头) 边缘处, 成熟神经元细胞标志物 NeuN 的表达增加。这些数据表明抗 -SEMA4D 抗体处理促进了成熟神经元的发育, 可以通过保护神经干 / 前体细胞的数量和 / 或诱导缺血性脑中的神经发生。

[0172] 实施例 5 : 抗 -SEMA4D 抗体对于 MCAO 小鼠行为活动的作用

[0173] MCAO 后第 30 天, 测定了抗 -SEMA4D 抗体对于小鼠行为活动的影响。用抗 -SEMA4D

抗体和对照 IgG 处理的小鼠在明亮和黑暗的环境中进行 10 分钟的敞箱实验。图 6A-6B 示出了与假处理的小鼠相比, MCAO 小鼠 (用对照 IgG 和抗 -SEMA4D 抗体处理的小鼠) 如何在明亮阶段具有显著更高 ($p < 0.05$) 的活性, 而在黑暗阶段并非如此。当小鼠从明亮环境被放入黑暗中时, 小鼠通常具有增加的活动。图 6C 示出, 与用对照抗体处理的小鼠不同, 在用抗 -SEMA4D 抗体处理的小鼠中, 黑暗 / 明亮阶段的活动比例显著增加 ($p < 0.05$), 与假处理的小鼠相当。黑暗 / 明亮阶段的比例在抗 -SEMA4D 和假手术组之间没有显著差异。这些结果表明, 对 MCAO- 损伤的小鼠进行抗 -SEMA4D 抗体处理可使其对黑暗 / 明亮刺激的响应正常化, 而用对照 IgG 处理的小鼠似乎保持 MCAO- 受损的小鼠通常所具有的异常的黑暗 / 明亮活动。

[0174] 实施例 6 : 抗 -SEMA4D 抗体对于血脑屏障完整性和神经发生的作用

[0175] 进行另一项研究以评估在永久大脑中动脉阻塞 (MCAO) 的大鼠模型中抗 -SEMA4D 抗体对血脑屏障完整性 (BBB 完整性) 和神经发生的作用。

[0176] 基础的实验设计如图 7 所示。对大鼠进行大脑中动脉 (MCA) 阻塞 (MCAO)。阻塞后, 大鼠被分成三组, 每组 15 只 : 治疗组用抗 -SEMA4D 抗体 MA67-2 注射, 对照组用 IgG 同型对照 MA2B8 注射, 非 -MCAO 组用 IgG 同型对照 MA2B8 注射。大鼠在 MCAO 后的 1 小时、3 天、7 天、14 天和 21 天接受 15.0mg/kg 单克隆抗体的腹膜内 (IP) 注射。定期取血液样品, 以用于之后的药物水平评测。大鼠接受定期的抗体注射, 并且会进行为期 4 周的行为试验 (圆筒试验和肢体放置实验)。

[0177] 使用核磁共振成像 (MRI) 来测定 5 只随机选自各处理组的大鼠的 BBB 完整性。另一个亚组的大鼠 (即 5 只大鼠) 在第 4-6 天会接受腹膜内注射 BrdU, 以标记神经祖细胞。在终点时, 接受 BrdU 的大鼠亚组会用 4% 的多聚甲醛灌注, 并取出脑。第三个亚组的大鼠会用盐水灌注, 大脑进行显微镜切割, 并将新鲜组织冷冻。所提取的脑 / 显微镜切割的组织会进行小胶质细胞活化和神经发生的免疫组织化学和生物化学评估。

[0178] 得益于上述说明书和所附附图的教导, 本领域技术人员会想到属于本发明所属领域内的针对本文所述本发明的许多改变和其他实施方案。因此, 应理解, 本发明不限于所公开的具体实施方案中, 并且所附的权利要求书和本文所公开的实施方案的范围也包括改变和其他实施方案。虽然本文采用了特定的术语, 但是它们仅是一般性的和描述性, 并非出于限制性的目的。

[0001]

序列表

<110> E·S·史密斯
M·佐德勒

<120> 脑信号蛋白-4D 结合分子在促进中风后的神经发生中的用途

<130> 1843.072PC01/EJH/BNC

<140> 待转让

<141> 随此

<150> US 13/842,523

<151> 2012-03-15

<150> US 61/646,119

<151> 2012-05-11

<160> 18

<170> PatentIn 版本 3.5

<210> 1

<211> 118

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> MAb 67 VH

<400> 1

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

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

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

[0002]

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

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

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

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

Thr Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 2
<211> 111
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> MAb 67 VK

<400> 2

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

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

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

Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Ile Pro Ala

[0003]

[0004]

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

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

Thr Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 4
<211> 111
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> MAb 2503 L553

<400> 4

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

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

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

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

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

Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn

[0005]

85

90

95

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

<210> 5
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 多肽 抗-CD100 VH CDR1

<400> 5

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

<210> 6
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 多肽 抗-CD100 VH CDR2

<400> 6

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

Gly

<210> 7
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

[0006]

<220>

<223> 多肽 抗-CD100 VH CDR3

<400> 7

Tyr Tyr Tyr Gly Arg His Phe Asp Val

1 5

<210> 8

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 多肽 抗-CD100 VL CDR1

<400> 8

Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Asp Gly Asp Ser Tyr Met Asn

1 5 10 15

<210> 9

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 多肽 抗-CD100 VL CDR2

<400> 9

Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser

1 5

<210> 10

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 多肽 抗-CD100 VL CDR3

[0007]

<400> 10

Gln Gln Ser Asn Glu Asp Pro Tyr Thr
1 5

<210> 11

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 巢蛋白正向

<400> 11

cactagaaag caggaaccag

20

<210> 12

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 巢蛋白反向

<400> 12

agatggttca caatcctctg

20

<210> 13

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> Sox2 正向

<400> 13

ttgggagggg tgcaaaaaga

20

<210> 14

[0008]

<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	Sox2 反向	
<400>	14	
cctgcgaagc gcctaacgta		20
<210>	15	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	PLP 正向	
<400>	15	
tgagcgcaac ggtaacagg		19
<210>	16	
<211>	22	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	PLP 反向	
<400>	16	
gggagaacac catacattct gg		22
<210>	17	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	β -肌动蛋白正向	
<400>	17	

[0009]

gctcgtcgtc gacaagggt c

21

<210> 18

<211> 25

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> β -肌动蛋白正向

<400> 18

caaacatgat ctgggtcatc ttctc

25

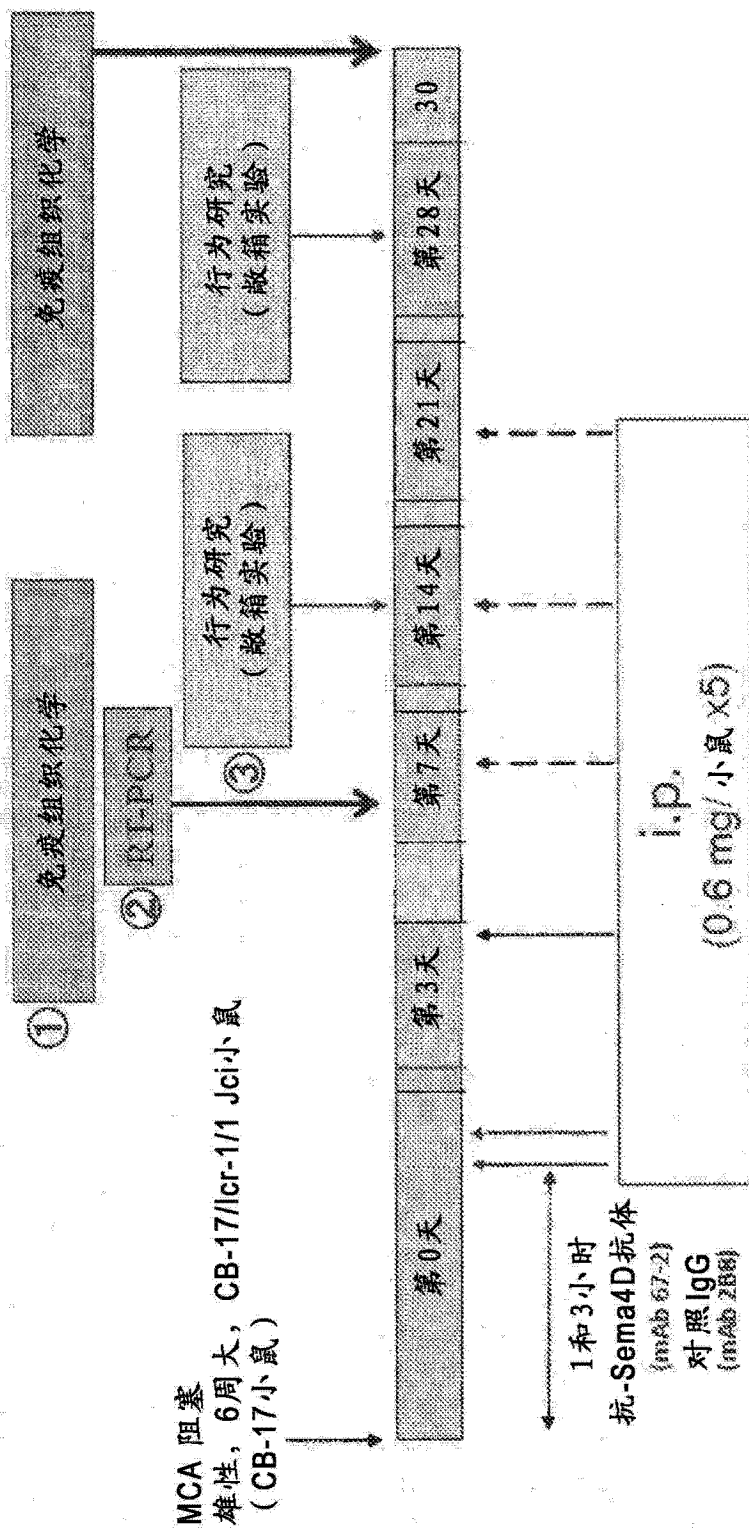


图 1

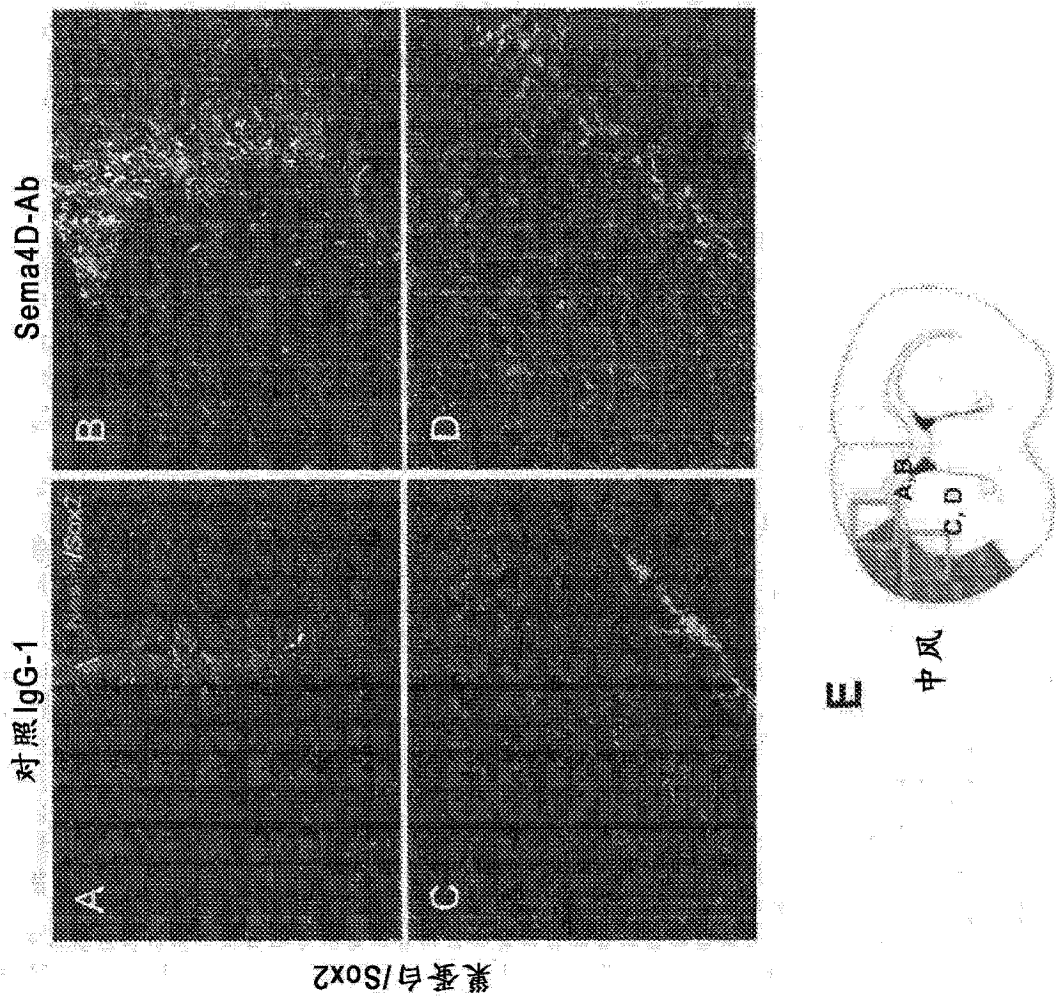


图 2

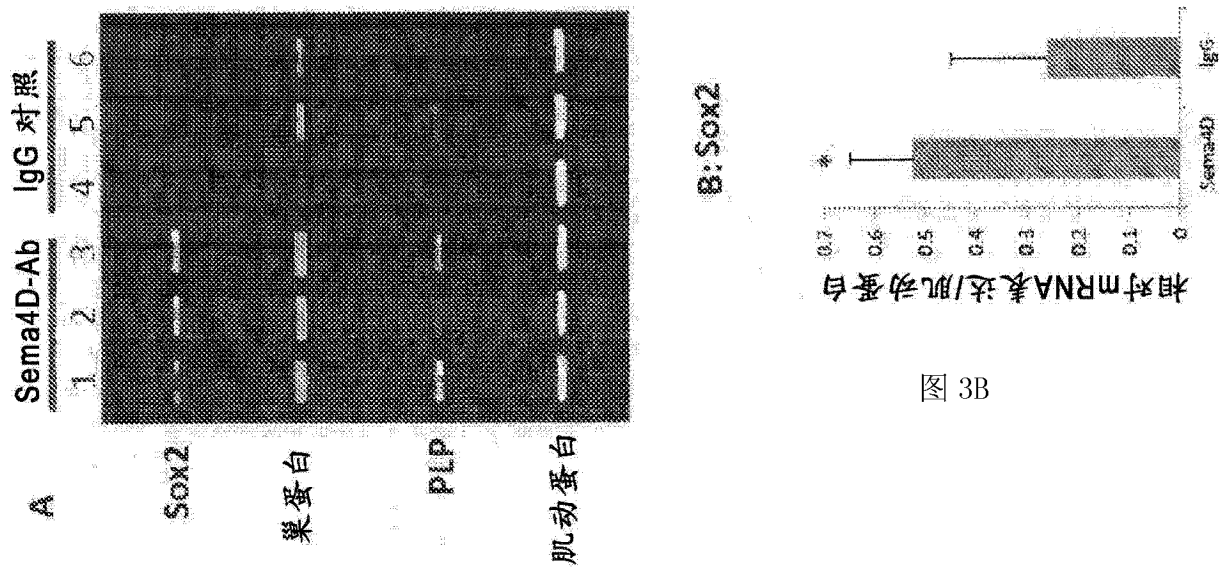


图 3B

图 3A

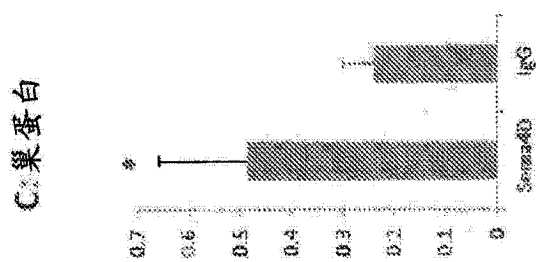


图 3C

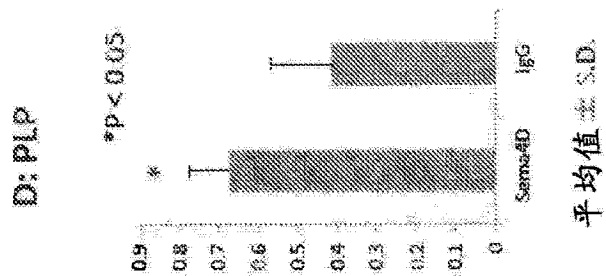


图 3D

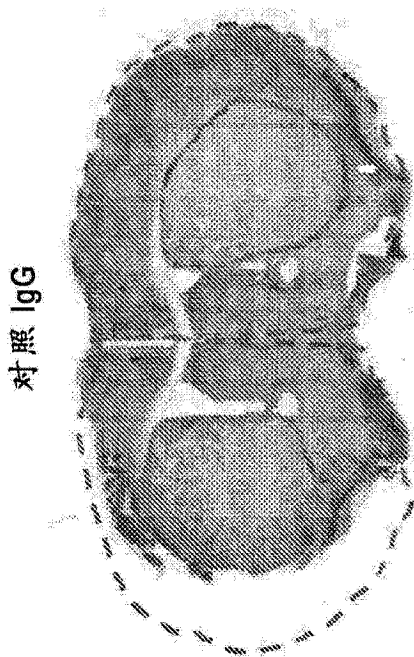


图 4A

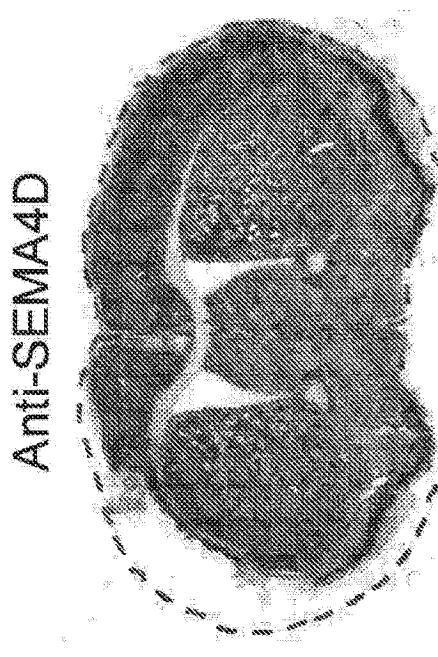


图 4B

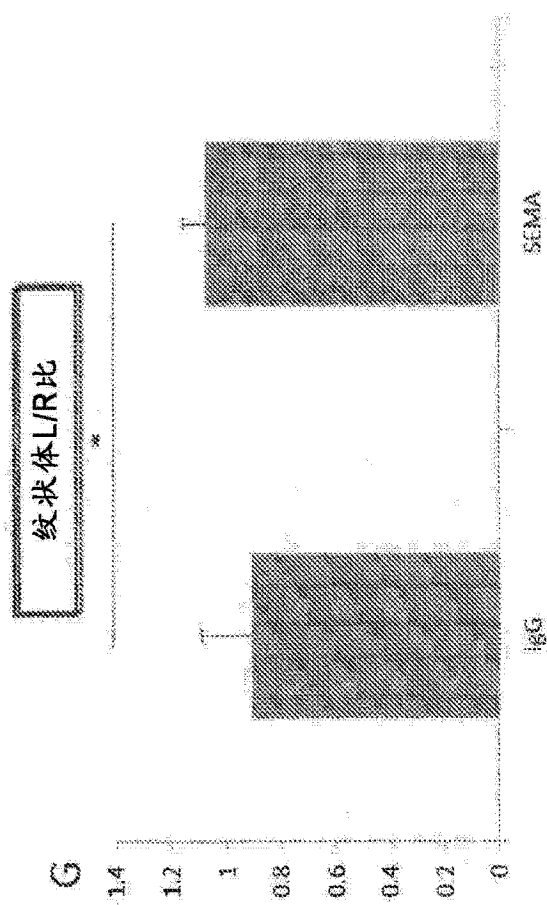


图 4C

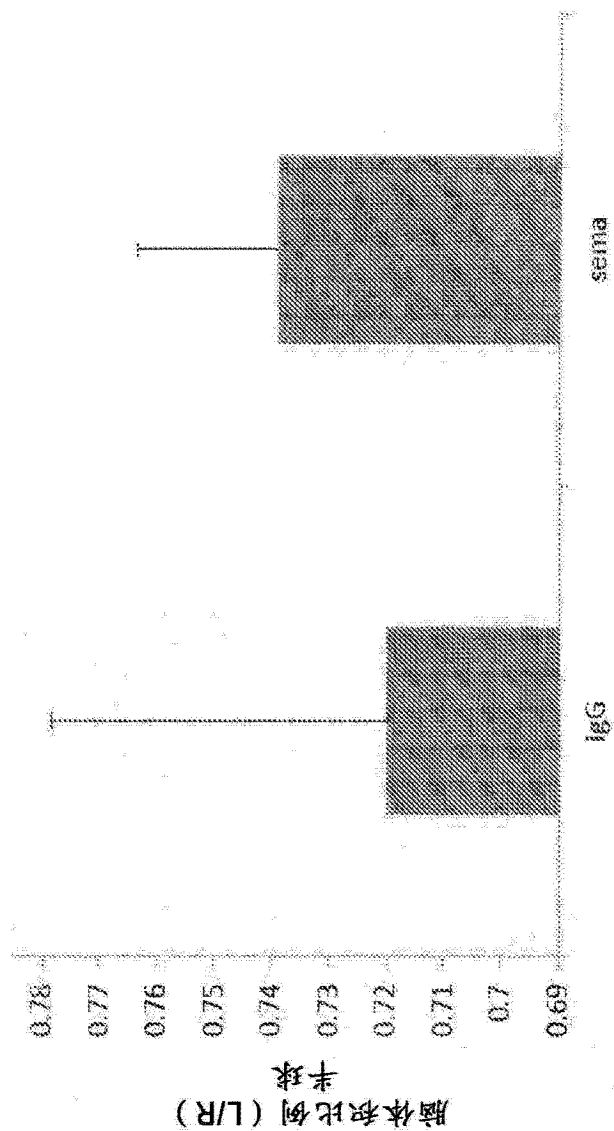


图 4D

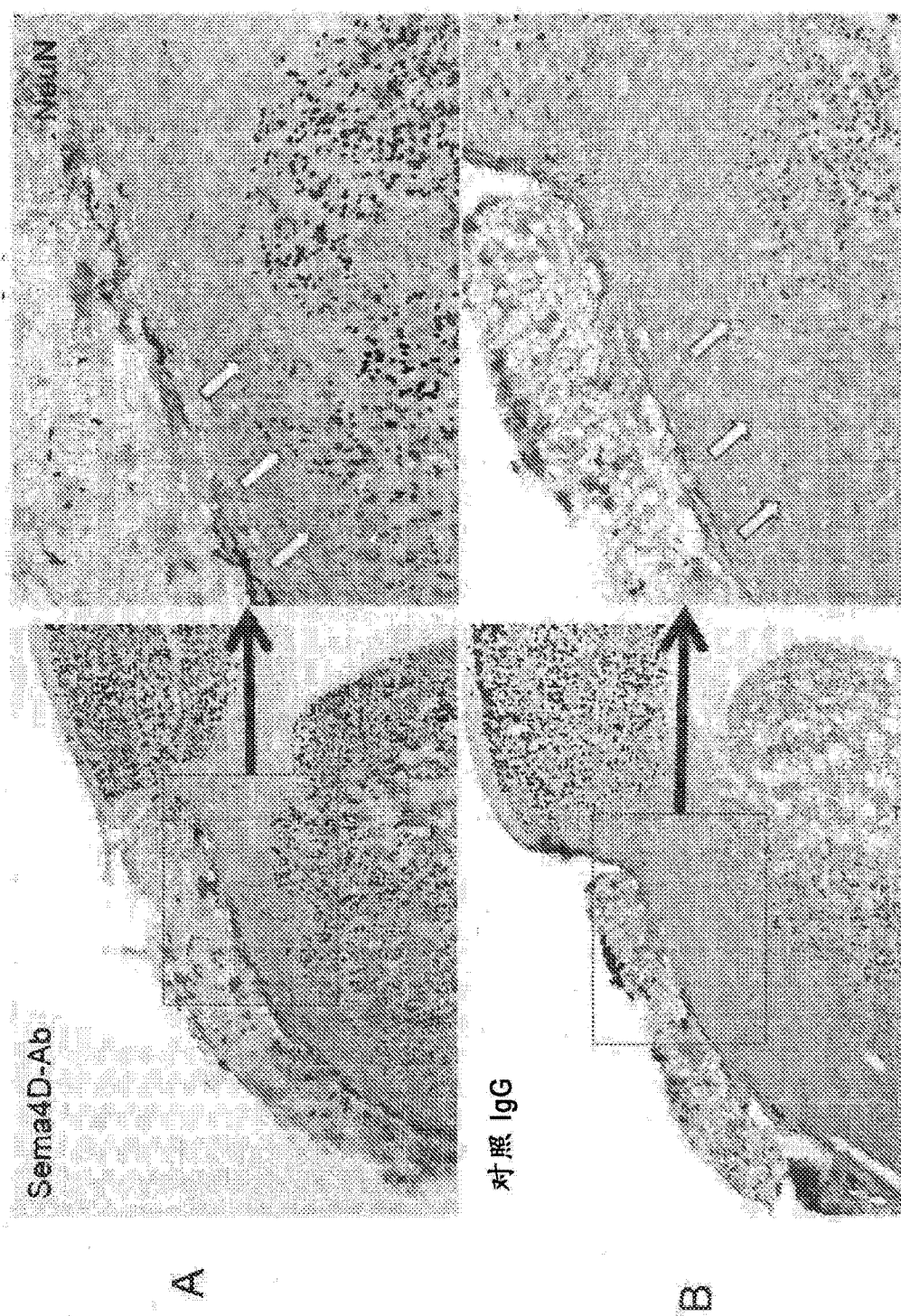


图 5

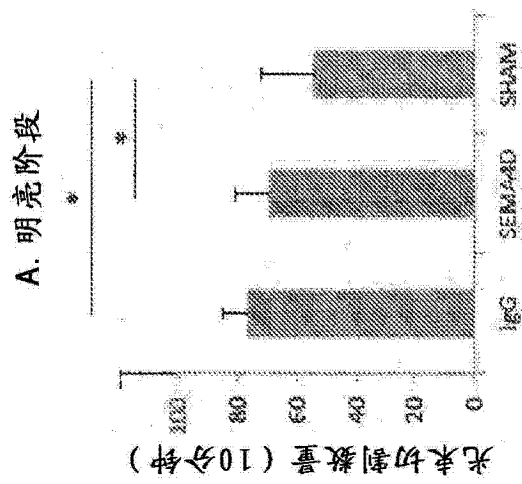


图 6A

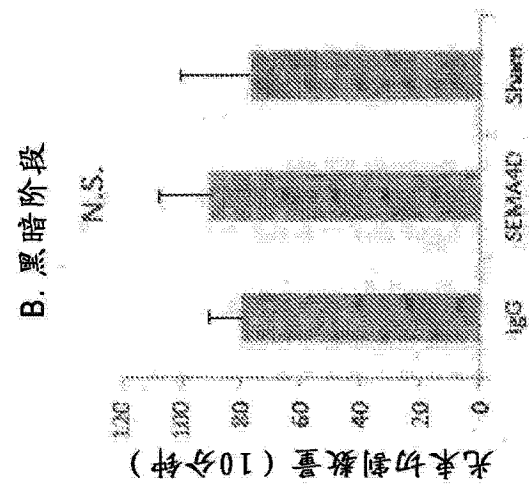


图 6B

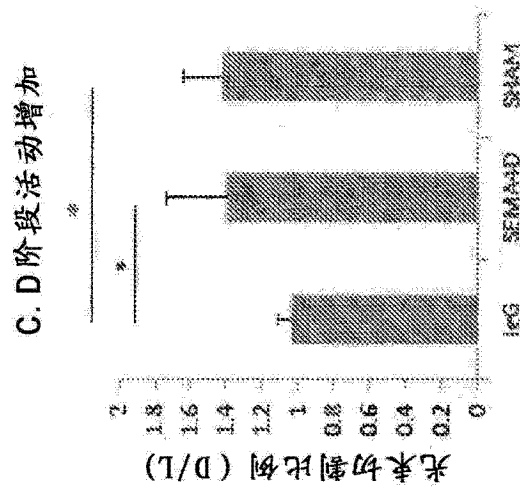


图 6C

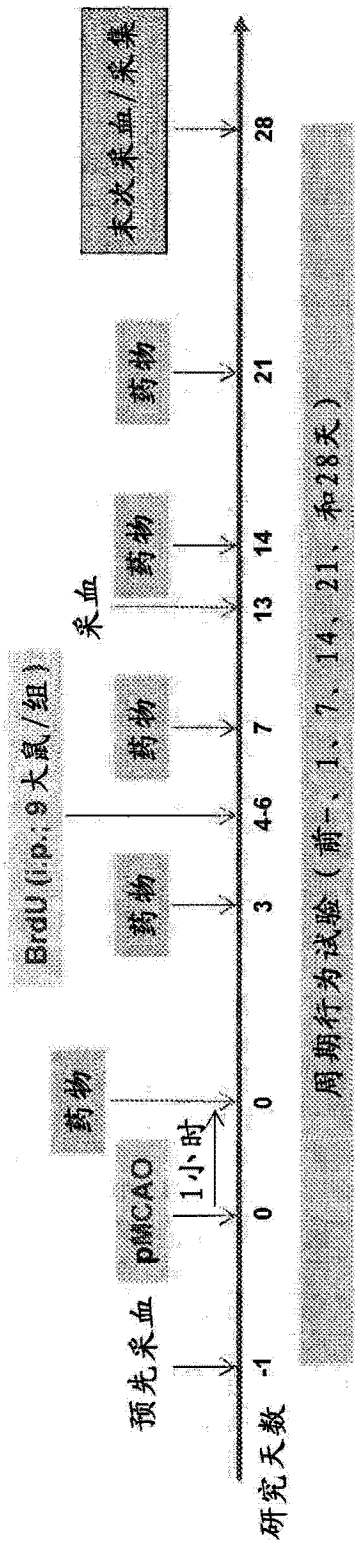


图 7