

(19)



Евразийское  
патентное  
ведомство

(11) 029023

(13) B1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента  
2018.01.31

(21) Номер заявки  
201490768

(22) Дата подачи заявки  
2012.10.11

(51) Int. Cl. A61P 25/00 (2006.01)  
A61K 38/00 (2006.01)  
A61K 39/395 (2006.01)

---

(54) ПРИМЕНЕНИЕ МОЛЕКУЛ, СВЯЗЫВАЮЩИХ СЕМАФОРИН-4D, ДЛЯ МОДУЛЯЦИИ ПРОНИЦАЕМОСТИ ГЕМАТОЭНЦЕФАЛИЧЕСКОГО БАРЬЕРА

---

(31) 61/545,809; 61/555,726; 61/593,641

(32) 2011.10.11; 2011.11.04; 2012.02.01

(33) US

(43) 2014.09.30

(86) PCT/US2012/059757

(87) WO 2013/055922 2013.04.18

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:  
ВЭКСИНЕКС, ИНК. (US)

(72) Изобретатель:  
Смит Эрнест С., Заудерер Морис (US)

(74) Представитель:  
Медведев В.Н. (RU)

(56) US-A1-20100285036

OKUNO et al., Roles of Sema4D-Plexin-B1 interactions in the central nervous system for pathogenesis of experimental autoimmune encephalomyelitis. Journal of Immunology, 1 February 2010, vol 184, no 3, pp 1499-1506; (page 1500, col 1, para 7)

US-A1-20020037851

(57) Настоящее изобретение относится к способам уменьшения проницаемости гематоэнцефалического барьера у индивида с нейровоспалительным расстройством, включающим введение индивиду эффективного количества выделенной связывающей молекулы, которая специфически связывается с семафорином-4D (SEMA4D) или его высокоаффинным рецептором плексина-B1.

B1

029023

029023

B1

### Уровень техники

Семафорин 4D (SEMA4D), также известный как CD100, представляет собой трансмембранный белок (например, SEQ ID NO:1 (человека); SEQ ID NO:2 (мышь)), который относится к генам семейства семафорин. SEMA4D экспрессирован на клеточной поверхности в виде гомодимера, но после активации клетки SEMA4D может высвобождаться из клеточной поверхности посредством протеолитического расщепления для генерирования sSEMA4D, растворимой формы белка, который также является биологически активным. См. Suzuki et al., *Nature Rev. Immunol.* 3:159-167 (2003); Kikutani et al., *Nature Immunol.* 9: 17-23 (2008).

SEMA4D экспрессирован на высоких уровнях в лимфоидных органах, включая селезенку, тимус и лимфоузлы, и в нелимфоидных органах, таких как мозг, сердце и почки. В лимфоидных органах, SEMA4D обильно экспрессирован на покоящихся Т-клетках, но лишь слабо экспрессирован на покоящихся В-клетках и антиген-презентирующих клетках (APC), таких как дендритные клетки (DC). Однако его экспрессия стимулируется в этих клетках после активации различными иммунологическими стимулами. Высвобождение растворимого SEMA4D из иммунных клеток также увеличивается активацией клеток.

Считалось, что SEMA4D принимает участие в развитии нейродегенеративных заболеваний, аутоиммунных заболеваний, демиелинизирующих заболеваний и определенных злокачественных заболеваний. Хотя роль передачи сигналов SEMA4D через его рецепторы, например, плексин-B1, в ангиогенезе общепризнана, воздействие передачи сигналов SEMA4D на гематоэнцефалический барьер (BBB) остается неясной. Это важно, потому что изменения проницаемости BBB оказывают глубокое влияние на ткань и функцию мозга. Поэтому сохраняется потребность в способах лечения по поводу нейровоспалительных расстройств, которые возникают в результате разрушения BBB, и, в частности, в терапевтических средствах, которые ингибируют, подавляют, предотвращают, вызывают обратное развитие или замедляют разрушение BBB.

### Краткое описание сущности изобретения

В настоящей заявке описаны способы применения молекул, связывающих семафорин-4d, для модуляции проницаемости гематоэнцефалического барьера. Представлены свидетельства того, что SEMA4D может нарушить целостность BBB, посредством этого увеличивая его проницаемость. В соответствии с одним из аспектов, представленных в настоящем изобретении, оно относится к способу уменьшения проницаемости гематоэнцефалического барьера у индивида, имеющего нейровоспалительное расстройство, включающему введение индивиду эффективного количества выделенной связывающей молекулы, которая специфически связывается с семафорином-4D (SEMA4D), посредством этого уменьшая проницаемость гематоэнцефалического барьера у индивида.

В соответствии с одним из аспектов, представленных в настоящем изобретении, изобретение относится к способу поддержания или увеличения экспрессии клаудина-5 у индивида, имеющего нейровоспалительное расстройство, включающему введение индивиду эффективного количества выделенной связывающей молекулы, которая специфически связывается с семафорином-4D (SEMA4D), причем связывающая молекула поддерживает или увеличивает экспрессию клаудина-5 у индивида.

В соответствии с одним из аспектов, представленных в настоящем изобретении, изобретение относится к способу уменьшения проницаемости гематоэнцефалического барьера у индивида, имеющего нейровоспалительное расстройство, включающему введение индивиду эффективного количества выделенной связывающей молекулы, которая специфически ингибирует взаимодействие семафорина 4D (SEMA4D) с рецептором SEMA4D, посредством этого, уменьшая проницаемость гематоэнцефалического барьера у индивида.

В соответствии с одним из аспектов, представленных в настоящем изобретении, оно относится к способу лечения индивида, имеющего нейровоспалительное расстройство, включающему введение индивиду эффективного количества выделенной связывающей молекулы, которая специфически ингибирует взаимодействие семафорина 4D (SEMA4D) с рецептором SEMA4D, причем связывающая молекула уменьшает проницаемость гематоэнцефалического барьера, посредством этого, обеспечивая лечение индивида.

В соответствии с одним из аспектов, представленных в настоящем изобретении, оно относится к способу уменьшения проницаемости гематоэнцефалического барьера у индивида, имеющего нейровоспалительное расстройство, включающему введение индивиду эффективного количества выделенной связывающей молекулы, которая специфически связывается с SEMA4D, причем связывающая молекула конкурентно ингибирует специфическое связывание с SEMA4D эталонного моноклонального антитела, выбранного из группы, состоящей из VX15/2503 или 67.

В соответствии с одним из аспектов, представленных в настоящем изобретении, оно относится к способу лечения индивида, имеющего нейровоспалительное расстройство, включающему введение индивиду эффективного количества выделенной связывающей молекулы, которая специфически связывается с семафорином-4D (SEMA4D), и выделенной связывающей молекулы, которая специфически связывается с плексин-B1, причем молекулы, связывающие SEMA4D и плексин-B1, уменьшают проницаемость гематоэнцефалического барьера, посредством этого, осуществляя лечение индивида.

В соответствии с одним из аспектов, представленных в настоящем изобретении, оно относится к

способу лечения индивида, имеющего нейровоспалительное расстройство, включающему введение индивиду эффективного количества ингибитора взаимодействия семафорина 4D (SEMA4D) с рецептором SEMA4D, причем ингибитор уменьшает проницаемость гематоэнцефалического барьера, посредством этого, осуществляя лечение индивида.

#### Краткое описание чертежей/рисунков

Фиг. 1. Схематическое изображение динамического экспериментального протокола BBB in vitro ("DIV-BBB"), описанного в разделе "Примеры".

Фиг. 2. Модель in vitro DIV-BBB, показывающая измерения целостности BBB, отражающейся на трансэндотелиальном электрическом сопротивлении (TEER), в присутствии рекомбинантного SEMA4D (0,05, 0,5, 5 или 50 мкг/мл) и Антитела VX15/2503 ("VX15").

Фиг. 3. Модель in vitro DIV-BBB, показывающая измерения целостности BBB, отражающейся на трансэндотелиальном электрическом сопротивлении (TEER) во время образования BBB, разрушения BBB в присутствии рекомбинантного SEMA4D (0,5, 5 или 50 мкг/мл), и восстановления BBB в присутствии антитела VX15/2503 ("VX15"), но не контроля изотипа ("Iso").

Фиг. 4. Модель in vitro DIV-BBB, показывающая измерения целостности BBB, отражающейся на трансэндотелиальном электрическом сопротивлении (TEER) во время образования BBB, разрушения BBB в присутствии 0,25, 2,5 или 25 мкг/мл контрольного антигена C35 ("CTRL") или 50 мкг/мл рекомбинантного SEMA4D и восстановления BBB в присутствии антитела VX15/2503 ("VX15").

Фиг. 5. Модель in vitro DIV-BBB, показывающая измерения целостности BBB, отражающейся на трансэндотелиальном электрическом сопротивлении (TEER) во время образования BBB, разрушения BBB в присутствии рекомбинантного SEMA4D (50 мкг/мл), и восстановления BBB в присутствии антитела VX15/2503 ("VX15"), антитела к плексину-B1 ("Anti-PLXNB1"), но не контроля изотипа B1 ("Iso").

Фиг. 6. Модель in vitro DIV-BBB, показывающая измерения целостности BBB, отражающейся на трансэндотелиальном электрическом сопротивлении (TEER) во время образования BBB, разрушения BBB в присутствии активированных PBMC (моноклеарных клеток периферической крови) ( $10^6$ /мл) и прекращении кровотока, и восстановления BBB в присутствии антитела VX15/2503 или изотипического контрольного IgG.

Фиг. 7A-C. Результаты, полученные с использованием модели EAE in vivo, показывающие целостность BBB или ее потерю, показанные иммунным окрашиванием проникновения фибриногена ("Fib.+ ") в ткань мозга (7A, левая панель и количественное определение на фиг. 7B) и экспрессию клаудина-5 ("CLN5+"), выявленную красным красителем (7A, правая панель и количественное определение на фиг. 7C) после обработки антителом VX15/2503 ("Anti-SEMA4D") или изотипическим контролем ("Control IgG").

Фиг. 8. Результаты иммуноблоттинга, показывающие воздействие возрастающих концентраций рекомбинантного SEMA4D (1 нг/мл, 10 нг/мл и 100 нг/мл) на экспрессию ключевого эндотелиального белка плотного контакта клаудина-5 ("CLN-5"), по сравнению с VEGF-A (сосудистый эндотелиальный фактор роста)-положительным контролем в первичных эндотелиальных культурах центральной нервной системы мыши (ЦНС).

#### Подробное описание изобретения

##### I. Определения

Следует отметить, что термин, обозначающий объект относится к одному или нескольким таким объектам; например, под термином "антитело к SEMA4D" следует понимать как представляющий одно или несколько антител к SEMA4D. По существу, термины "один или несколько" и "по меньшей мере один" могут использоваться в настоящем описании взаимозаменяемо.

Следует отметить, что термин "гематоэнцефалический барьер" и "BBB" используются взаимозаменяемо.

Используемый в настоящем описании термин "нарушение" или "разрушение" в отношении BBB, такой как "нарушение гематоэнцефалического барьера" "разрушение гематоэнцефалического барьера", "разрыв гематоэнцефалического барьера", относится к увеличению проницаемости гематоэнцефалического барьера, или, в случае "DIV-BBB", гуманизированной динамической модели BBB in vitro, уменьшение трансэндотелиального электрического сопротивления (TEER). McCallister et al., Brain Res. 904:20-30 (2001); Santaguida et al., Brain Res. 1109: 1-13 (2006) и Cucullo et al., Epilepsia 48:505-16 (2007) показали, что существует прямая (обратная) связь между TEER и проницаемостью в DIV-BBB. Кроме того, увеличение проницаемости гематоэнцефалического барьера или уменьшение электрического сопротивления может быть результатом уменьшения числа, плотности и/или концентрации эндотелиальных клеток, присутствующих на BBB, или изменения морфологии или взаимодействий между эндотелиальными клетками или астроцитами или между эндотелиальными клетками и астроцитами, которые образуют BBB.

Используемый в настоящем описании термин "восстановление" в отношении BBB, такой как "восстановление гематоэнцефалического барьера" или "реставрация гематоэнцефалического барьера" относится к уменьшению проницаемости гематоэнцефалического барьера или, в случае DIV-BBB, гуманизированной динамической модели BBB in vitro, увеличение трансэндотелиального электрического сопро-

тивления.

Используемый в настоящем описании термин "нейровоспалительное расстройство" относится к воспалительному поражению центральной нервной системы (ЦНС), нейродегенеративному расстройству, аутоиммунному расстройству центральной нервной системы, миелиновому повреждению или заболеванию, которое поражает олигодендроциты, или посттравматическому миелиновому повреждению центральной нервной системы. Следует отметить, что нейровоспалительные поражения часто также представляют собой нейродегенеративные повреждения. Однако нейродегенеративное поражение может также существовать в отсутствие очевидного нейровоспаления. Это, например, имеет место на поздней стадии вторичного прогрессирующего рассеянного склероза.

Термин "терапевтически эффективное количество" относится к количеству антитела, полипептида, полинуклеотида, маленькой органической молекулы или другого лекарственного средства, эффективного для "лечения" заболевания или расстройства у индивида или млекопитающего. В случае нейровоспалительного расстройства, терапевтически эффективное количество лекарственного средства может уменьшить проницаемость BBB; снизить, замедлить или остановить увеличение проницаемости BBB; ингибировать, например, подавить, задержать, предотвратить, остановить или вызвать обратное развитие увеличенной проницаемости BBB; увеличить число, плотность и/или концентрацию эндотелиальных клеток, присутствующих на BBB; изменить морфологию или функцию эндотелиальных клеток или изменить взаимодействия между эндотелиальными клетками или астроцитами или между эндотелиальными клетками и астроцитами, которые образуют BBB; облегчить в некоторой степени один или несколько симптомов, связанных с увеличенной проницаемостью BBB, например, нейровоспалительных расстройств; снизить частоту осложнений и смертность; улучшить качество жизни или комбинации таких эффектов.

Такие термины как "лечение" или "лечить" или "смягчение" или "смягчить" относятся и 1) к терапевтическим мерам, которые излечивают, замедляют, уменьшают симптомы, вызывают обратное развитие и/или останавливают прогрессирование диагностированного патологического состояния или расстройства, и 2) к профилактическим или превентивным мерам, которые предотвращают и/или замедляют развитие целевого патологического состояния или расстройства. Таким образом, индивиды, нуждающиеся в лечении, включают тех, у которых уже имеется данное расстройство; тех, которые склонны к развитию расстройства; и тех, кому предстоит предотвратить развитие расстройства. Благоприятные или желаемые клинические результаты включают без ограничения смягчение симптомов, уменьшение тяжести заболевания, стабилизацию (т.е. отсутствие ухудшения) патологического состояния, задержка или замедление прогрессирования заболевания, облегчение или временное ослабление патологического состояния и ремиссии (или частичной, или полной), выявляемые или не выявляемые. "Лечение" может также означать продление выживания, по сравнению с ожидаемым выживанием без лечения. Индивиды, нуждающиеся в лечении, включают тех, у которых уже имеется данное состояние или расстройство, а также тех, которые склонны к развитию расстройства; или тех, у которых предстоит предотвратить развитие состояния или расстройства.

Под "индивидом" или "животным", или "пациентом", или "млекопитающим" подразумевается любой индивид, в частности, млекопитающее, которое нуждается в диагностике, прогнозировании или лечении. Млекопитающие включают людей, домашних животных, сельскохозяйственных животных, и содержащихся в зоопарках, спортивных или других домашних питомцев, таких как собаки, кошки, морские свинки, кролики, крысы, мыши, лошади, крупный рогатый скот, коровы, медведи и т.д.

Используемые в настоящем описании фразы, такие как "индивид, у которого введение антитела к SEMA4D обеспечило бы благоприятный эффект", и "животное, нуждающееся в лечении" включает таких индивидов, как млекопитающие, у которых благоприятный эффект был бы обеспечен введением антитела к SEMA4D или другой применяемой молекулы, связывающей SEMA4D, например, для выявления полипептида SEMA4D (например, для диагностической процедуры) и/или в результате лечения, т.е. временного облегчения или предотвращения заболевания, антителом к SEMA4D или другой молекулы, связывающей SEMA4D.

Термин "связывающая молекула" или "связывающая антиген молекула" по настоящему изобретению относится в его самом широком смысле, к молекуле, которая специфически связывает антигенную детерминанту. В одном из вариантов осуществления связывающая молекула специфически связывается с SEMA4D, например, с трансмембранным полипептидом SEMA4D с молекулярной массой примерно 150 кДа или растворимым полипептидом SEMA4D с молекулярной массой примерно 120 кДа (вместе именуемых SEMA4D). В другом варианте осуществления связывающая молекула по изобретению представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент. В другом варианте осуществления связывающая молекула по изобретению содержит по меньшей мере одну CDR (определяющую комплементарность область) тяжелой или легкой цепи молекулы антитела. В другом варианте осуществления связывающая молекула по изобретению содержит по меньшей мере две CDR из одной или нескольких молекул антитела. В другом варианте осуществления связывающая молекула по изобретению содержит по меньшей мере три CDR из одной или нескольких молекул антитела. В другом варианте осуществления связывающая молекула по изобретению содержит по меньшей мере четыре CDR из одной или нескольких молекул антитела. В другом варианте осуществления связывающая молекула по

ких молекул антитела. В другом варианте осуществления связывающая молекула по изобретению содержит по меньшей мере пять CDR из одной или нескольких молекул антитела. В другом варианте осуществления связывающая молекула по изобретению содержит по меньшей мере шесть CDR из одной или нескольких молекул антитела.

Настоящее изобретение относится к способу уменьшения проницаемости гематоэнцефалического барьера у индивида, имеющего нейровоспалительное расстройство (например, рассеянный склероз, боковой амиотрофический склероз, эпилепсию, болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона, менингит, отек мозга, мозговую травму и инсульт), включающему введение индивиду молекулы, связывающей антитело к SEMA4D, молекулы, связывающей антитело к плексину-B1, или их комбинации.

Используемый в настоящем описании термин "молекула, связывающая антитело к SEMA4D" или "молекула, связывающая антитело к плексину-B1" относится к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, варианту или производному. Пока нет определенной ссылки на полноразмерные антитела, такие как природные антитела, термин "антитело к SEMA4D" или "антитело к плексину-B1" включает полноразмерные антитела, а также антигенсвязывающие фрагменты, варианты, аналоги или производные таких антител, например, природное антитело или молекулы иммуноглобулина или сконструированные методами генной инженерии молекулы или фрагменты антител, которые связывают антиген, подобным молекулам антитела образом.

Используемый в настоящем описании термин "ингибитор взаимодействия SEMA4D с рецептором SEMA4D" относится к "молекуле, связывающей антитело к SEMA4D", "молекуле, связывающей антитело к плексину-B1", а также к низкомолекулярному ингибитору SEMA4D или рецептора SEMA4D.

Используемые в настоящем описании термины антитела "человека" или "полностью человеческие" антитела включают антитела, имеющие аминокислотную последовательность человеческого иммуноглобулина, и включают антитела, выделенные из библиотек иммуноглобулина человека, или от животных, трансгенных в отношении одного или нескольких иммуноглобулинов человека, и которые не экспрессируют эндогенные иммуноглобулины, как описано ниже, и, например, в патенте США № 5939598, выданном Kucherlapati et al. Антитела "человека" или "полностью человеческие" антитела также включают антитела, содержащие, по меньшей мере, переменный домен тяжелой цепи или, по меньшей мере, переменные домены тяжелой цепи и легкой цепи, где переменные домен(ы) имеют аминокислотную последовательность переменного(ых) домена(ов) иммуноглобулина человека.

Антитела "человека" или "полностью человеческие" антитела также включают антитела "человека" или "полностью человеческие" антитела, как описано выше, которые содержат, состоят по существу из, или состоят из вариантов (включая производные) молекул антитела (например, области VH и/или области VL), описанных в настоящей заявке, причем антитела или их фрагменты иммуноспецифически связываются с полипептидом SEMA4D или его фрагментом или вариантом. Стандартные методики, известные специалистам в данной области, могут использоваться для внесения мутаций в нуклеотидную последовательность, кодирующую антитело человека к SEMA4D, включающие, без ограничения, сайт-направленный мутагенез и ПЦР-опосредованный мутагенез, которые приводят к аминокислотным замещениям. Предпочтительно варианты (включающие производные) кодируют менее чем 50 аминокислотных замещений, менее чем 40 аминокислотных замещений, менее чем 30 аминокислотных замещений, менее чем 25 аминокислотных замещений, менее чем 20 аминокислотных замещений, менее чем 15 аминокислотных замещений, менее чем 10 аминокислотных замещений, менее чем 5 аминокислотных замещений, менее чем 4 аминокислотных замещения, менее чем 3 аминокислотных замещения или менее чем 2 аминокислотных замещения относительно эталонной области VH, VHCDR1, VHCDR2, VHCDR3, области VL, VLCDR1, VLCDR2 или VLCDR3.

В определенных вариантах осуществления аминокислотные замещения представляют собой консервативные аминокислотные замещения, дополнительно обсужденные ниже. Альтернативно, мутации могут вноситься случайным методом вдоль всей или части кодирующей последовательности, таким как насыщающий мутагенез, и может проводиться скрининг полученных мутантов в отношении биологической активности для идентификации мутантов, которые сохраняют активность (например, способность связывать полипептид SEMA4D, например, SEMA4D человека, мыши или человека, и мыши). Такие варианты (или их производные) антитела "человека" или "полностью человеческого" антитела могут также именоваться антителами человека или полностью человеческими антителами, которые "оптимизированы" или "оптимизированы для связывания антигена" и включают антитела, которые имеют повышенную аффинность к антигену.

Термины "антитело" и "иммуноглобулин" используются в настоящем описании взаимозаменяемо. Антитело или иммуноглобулин содержит, по меньшей мере, переменный домен тяжелой цепи, и обычно содержит, по меньшей мере, переменные домены тяжелой цепи и легкой цепи. Основные иммуноглобулиновые структуры в системах позвоночных относительно хорошо понятны. См., например, Harlow et al. (1988) *Antibodies: Laboratory Manual* (2nd ed.; Cold Spring Harbor Laboratory Press).

Используемый в настоящем описании термин "иммуноглобулин" включает различные широкие классы полипептидов, которые могут быть дифференцированы биохимически. Специалистам в данной области понятно, что тяжелые цепи классифицируются как гамма, мю, альфа, дельта или эпсилон, ( $\gamma$ ,  $\mu$ ,

$\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ) с некоторыми подклассами среди них (например,  $\gamma 1$ - $\gamma 4$ ). Именно природа этой цепи определяет "класс" антитела как IgG, IgM, IgA IgG или IgE соответственно. Подклассы иммуноглобулинов (изотипы), например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и т.д. хорошо охарактеризованы и, как известно, придают функциональную специализацию. Модифицированные версии каждого из этих классов и изотипов легко различимы специалистом в данной области в связи с настоящим описанием и соответственно входят в объем настоящего изобретения. Ясно, что все классы иммуноглобулинов входят в объем настоящего изобретения, следующее обсуждение будет в целом направлено на класс IgG молекул иммуноглобулина. В отношении IgG, стандартная молекула иммуноглобулина содержит два идентичных полипептида легкой цепи с молекулярной массой приблизительно 23000 Дальтон, и два идентичных полипептида тяжелой цепи с молекулярной массой 53000-70000. Четыре цепи обычно соединены дисульфидными связями в конфигурации "Y", причем легкие цепи скрепляют тяжелые цепи, начиная у развилки "Y", и продолжаясь через переменную область.

Легкие цепи классифицируются или как каппа, или лямбда ( $\kappa$ ,  $\lambda$ ). Каждый класс тяжелой цепи может быть связан или с каппа, или лямбда легкой цепью. В целом, легкие и тяжелые цепи ковалентно связаны друг с другом, а "хвостовые" части двух тяжелых цепей связаны друг с другом ковалентными дисульфидными связями или не ковалентными связями, когда иммуноглобулины генерируются или гибридомами, В-клетками, или клетками-хозяевами, полученными методами генной инженерии. В тяжелой цепи аминокислотные последовательности проходят от N-конца у развилки концов конфигурации Y к C-концу в основе каждой цепи.

И легкие, и тяжелые цепи делятся на области структурной и функциональной гомологии. Термин "константная" и "переменная" используются функционально. В этом отношении, следует понимать, что переменные домены и легкой (VL или VK), и тяжелой (VH) частей цепи определяют распознавание антигена и специфичность. Напротив, константные домены легкой цепи (CL) и тяжелой цепи (CH1, CH2 или CH3) придают важные биологические свойства, такие как секреция, трансплацентарная подвижность, связывание с рецепторами Fc, связывание комплемента и тому подобное. Обычно, нумерация доменов константной области увеличивается по мере того, как они все больше удаляются от сайта связывания антигена или аминоконца антитела. N-концевая часть представляет собой переменную область, а на C-концевой части находится константная область; домены CH3 и CL действительно содержат карбоксиконец тяжелой и легкой цепи соответственно.

Как указано выше, переменная область обеспечивает возможность антителу селективно распознавать и специфически связывать эпитопы на антигенах. То есть домен VL и домен VH или субпопуляция определяющих комплементарность областей (CDR) внутри этих переменных доменов антитела комбинируются для образования переменной области, которая ограничивает трехмерный антиген-связывающий сайт. Эта четвертичная структура антитела образует антиген-связывающий сайт, присутствующий на конце каждого плеча Y. Конкретнее, антиген-связывающий сайт ограничивается тремя CDR на каждой из цепей VH и VL. В некоторых случаях, например, когда определенные молекулы иммуноглобулина происходят из видов верблюдовых или сконструированы методами генной инженерии на основе иммуноглобулинов верблюдовых, полная молекула иммуноглобулина может состоять только из тяжелых цепей, без легких цепей. См., например, Hamers-Casterman et al., Nature 363:446-448 (1993).

В природных антителах шесть "определяющих комплементарность областей" или "CDR", присутствующих в каждом связывающем антиген домене, представляют собой короткие, прерывистые последовательности аминокислот, которые специфически расположены для образования связывающего антиген, по мере того как антитело приобретает его трехмерную конфигурацию в водной среде. Остальные аминокислоты в связывающих антиген доменах, именуемые "каркасными" участками, проявляют меньшую межмолекулярную переменность. Каркасные участки в значительной степени принимают конформацию  $\beta$ -листка, и CDR образуют петли, которые соединяют, и в некоторых случаях образуют часть структуры  $\beta$ -листка. Таким образом, каркасные участки действуют для образования каркаса, который обеспечивает расположение CDR в правильной ориентации межцепевыми, не ковалентными взаимодействиями. Связывающий антиген домен, образованный расположенными CDR, ограничивает поверхность, комплементарную эпитопу, на иммунореактивном антигене. Эта комплементарная поверхность способствует не ковалентному связыванию антитела с его когнатным эпитопом. Средний специалист в данной области может легко идентифицировать аминокислоты, содержащие соответственно CDR и каркасные участки, для любого данного переменного домена тяжелой или легкой цепи, поскольку они были точно определены (см. ниже).

В случае, когда имеются два или более определений термина, которые используются и/или приняты в данной области, то используемое в настоящем описании определение термина предназначено для включения всех таких значений, пока нет ясных указаний на противоположное. Определенным примером является использование термина "определяющая комплементарность область" ("CDR") для описания прерывистых антиген-комбинирующих участков, обнаруживаемых в пределах переменной области полипептидов и тяжелой, и легкой цепи. Эта конкретная область была описана в публикациях Kabat et al. (1983) U.S. Dept. of Health and Human Services, "Sequences of Proteins of Immunological Interest" и Chothia

и Lesk, J Mol. Biol. 196:901-917 (1987), которые включены в настоящее описание путем ссылки, где определения включают перекрывающиеся или субпопуляции аминокислотных остатков при сравнении друг с другом. Тем не менее, применение любого определения для ссылки на CDR антитела или его вариантов предназначено для включения в объем термина, как определено и используется в настоящем описании. Соответствующие аминокислотные остатки, которые охватывают CDR, как определено каждой из приведенных выше ссылок, представлены ниже в таблице, в качестве сравнения. Точные номера остатков, которые охватывают конкретную CDR, варьируются в зависимости от последовательности и размера CDR. Специалисты в данной области могут обычным образом определить, какие остатки содержат конкретную CDR в данной аминокислотной последовательности варибельной области антитела.

Определения CDR<sup>1</sup>

	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

<sup>1</sup>Нумерация определений CDR в табл. 1 дана в соответствии с соглашениями, изложенными Kabat et al. (см. ниже).

Kabat et al. также определили систему нумерации для последовательностей варибельного домена, которая применима к любому антителу. Средний специалист в данной области может однозначно приписать данную систему "Нумерации по Kabat" к любой последовательности варибельного домена без учета любых экспериментальных данных за пределами самой последовательности. Используемый в настоящем описании термин "Нумерация по Kabat" относится к системе нумерации, изложенной в публикации Kabat et al. (1983) U.S. Dept. of Health and Human Services, "Sequence of Proteins of Immunological Interest." Пока нет иных определений, ссылки на нумерацию определенных положений аминокислотных остатков в антителе к SEMA4D или его антигенсвязывающем фрагменте, варианте или производном по настоящему изобретению приведены в соответствии с системой нумерации Kabat.

Антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, варианты или производные по изобретению включают без ограничения поликлональные, моноклональные, мультиспецифические и биспецифические, в которых по меньшей мере одно плечо является специфичным в отношении антитела к SEMA4D, антитела человека, гуманизированного, приматизированного или химерного антитела, одноцепочечного антитела, связывающих эпитоп фрагментов, например, Fab, Fab' и F(ab')<sub>2</sub>, Fd, Fv, одноцепочечных Fv (scFv), связанных дисульфидом Fv (sdFv), фрагментам, содержащим или домен VL, или домен VH, фрагментам, продуцируемым библиотекой экспрессии Fab, и анти-идиотипических (анти-Id) антител (включающих, например, анти-Id антитела к описанным в настоящем изобретении антителам к SEMA4Dm). Молекулы ScFv известны в данной области и описаны, например, в патенте США № 5892019. Молекулы иммуноглобулина или антитела по изобретению могут быть любого типа (например, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA и IgY), класса (например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и IgA2 и т.д.) или подкласса молекулы иммуноглобулина.

Используемый в настоящем описании термин "часть тяжелой цепи" включает аминокислотные последовательности, происходящие из тяжелой цепи иммуноглобулина. В определенных вариантах осуществления полипептид, содержащий часть тяжелой цепи, содержит по меньшей мере один из: домена VH, домена CH1, шарнирного домена (например, верхнего, среднего и/или нижнего шарнира), домена CH2, домена CH3 или их варианта или фрагмента. Например, связывающий полипептид для применения в изобретении может содержать полипептидную цепь, содержащую домен CH1; полипептидную цепь, содержащую домен CH1, по меньшей мере часть шарнирного домена и домен CH2; полипептидную цепь, содержащую домен CH1 и домен CH3; полипептидную цепь, содержащую домен CH1, по меньшей мере часть шарнирного домена, и домен CH3 или полипептидную цепь, содержащую домен CH1, по меньшей мере часть шарнирного домена, домен CH2 и домен CH3. В другом варианте осуществления полипептид по изобретению содержит полипептидную цепь, содержащую домен CH3. Кроме того, связывающий полипептид для применения в изобретении может не содержать по меньшей мере часть домена CH2 (например, весь или часть домена CH2). Как изложено выше, среднему специалисту в данной области понятно, что эти домены (например, части тяжелой цепи) могут модифицироваться таким образом, чтобы они отличались по аминокислотной последовательности от природной молекулы иммуноглобулина.

В определенных антителах против SEMA4D или их антиген-связывающих фрагментах, вариантах или производных, описанных в настоящем изобретении, части тяжелой цепи одной полипептидной цепи мультимера идентичны таковым на второй полипептидной цепи мультимера. Альтернативно, содержащая часть тяжелой цепи мономер по изобретению не является идентичными. Например, каждый номер может содержать другой целевой сайт связывания, образуя, например, биспецифическое антитело.

Части тяжелой цепи связывающей молекулы для применения в способах, описанных в настоящей заявке, могут быть получены из различных молекул иммуноглобулина. Например, часть тяжелой цепи

полипептида может содержать домен  $C_{H1}$ , происходящий из молекулы IgG1, и шарнир, происходящий из молекулы IgG3. В другом примере, часть тяжелой цепи может содержать шарнирную часть, происходящую частично из молекулы IgG1 и, частично, из молекулы IgG3. В другом примере, часть тяжелой цепи может содержать химерный шарнир, происходящий частично из молекулы IgG1, и, частично, из молекулы IgG4.

Используемый в настоящем описании термин "часть легкой цепи" включает аминокислотные последовательности, происходящие из легкой цепи иммуноглобулина, например, каппа или лямбда легкой цепи. Предпочтительно часть легкой цепи содержит по меньшей мере один из домена VL или домена CL.

Антитела к SEMA4D или их антигенсвязывающие фрагменты, варианты или производные, описанные в настоящем описании, могут быть описаны или определены с точки зрения эпитоп(ов) или части (частей) антигена, например, описанного в настоящем изобретении целевого полипептида (например, SEMA4D), который они распознают, или специфически связывают. Часть целевого полипептида, которая специфически взаимодействует с антиген-связывающим доменом антитела, представляет собой "эпитоп" или "антигенную детерминанту". Целевой полипептид может содержать один эпитоп, но обычно содержит по меньшей мере два эпитопа, и может включать любое число эпитопов в зависимости от размера, конформации и типа антигена. Кроме того, следует отметить, что "эпитоп" на целевом полипептиде может представлять собой или может включать не полипептидные элементы, например, эпитоп может включать углеводородную боковую цепь.

Считается, что минимальный размер пептидного или полипептидного эпитопа для антитела составляет примерно от четырех до пяти аминокислот. Пептидные или полипептидные эпитопы предпочтительно содержат по меньшей мере семь, предпочтительнее по меньшей мере девять и наиболее предпочтительно от по меньшей мере примерно 15 до примерно 30 аминокислот. Поскольку CDR может распознавать антигенный пептид или полипептид в его третичной форме, аминокислоты, содержащие эпитоп, не должны быть непрерывными, и в некоторых случаях, могут даже не находиться на одной и той же пептидной цепи. Пептидный или полипептидный эпитоп, распознаваемый антителами к SEMA4D по настоящему изобретению, может содержать последовательность по меньшей мере из 4, по меньшей мере 5, по меньшей мере 6, по меньшей мере 7, предпочтительнее по меньшей мере 8, по меньшей мере 9, по меньшей мере 10, по меньшей мере 15, по меньшей мере 20, по меньшей мере 25, или от примерно 15 до примерно 30 смежных или несмежных аминокислот SEMA4D.

Под термином "специфически связывается" в целом подразумевается, что антитело связывается с эпитопом через его антиген-связывающий домен, и что связывание влечет за собой некоторую комплементарность между антиген-связывающим доменом и эпитопом. В соответствии с этим определением считается, что антитело "специфически связывается" с эпитопом, когда оно связывается с эпитопом через его антиген-связывающий домен легче, чем оно связывалось бы со случайным, чужеродным эпитопом. Термин "специфичность" используется в настоящем описании для определения относительной аффинности, с которой определенное антитело связывается с определенным эпитопом. Например, антитело "А" может считаться имеющим более высокую специфичность в отношении данного эпитопа, чем антитело "В", или можно сказать, что антитело "А" связывается с эпитопом "С" с более высокой специфичностью, чем оно имеет в отношении родственного эпитопа "D".

Под термином "предпочтительно связывается" подразумевается, что антитело специфически связывается с эпитопом легче, чем оно бы связывалось с родственным, подобным, гомологичным или аналогичным эпитопом. Таким образом, антитело, которое "предпочтительно связывается" с данным эпитопом, более вероятно связывалось бы с этим эпитопом, чем с родственным эпитопом, даже хотя такое антитело может перекрестно реагировать с родственным эпитопом.

В качестве неограничивающего примера, можно считать, что антитело предпочтительно связывает первый эпитоп, если оно связывает указанный первый эпитоп с константой диссоциации ( $K_D$ ), которая меньше, чем  $K_D$  антитела, в отношении второго эпитопа. В другом неограничивающем примере, можно считать, что антитело предпочтительно связывает первый эпитоп, если оно связывает первый эпитоп с аффинностью, которая по меньшей мере на один порядок величины меньше, чем  $K_D$  антитела в отношении второго эпитопа. В другом неограничивающем примере, можно считать, что антитело предпочтительно связывает первый эпитоп, если оно связывает первый эпитоп с аффинностью, которая по меньшей мере на два порядка величины меньше, чем  $K_D$  антитела в отношении второго эпитопа.

В другом неограничивающем примере, можно считать, что антитело предпочтительно связывает первый эпитоп, если оно связывает первый эпитоп со скоростью диссоциации ( $k(off)$ ), которая меньше, чем  $k(off)$  антитела  $k(off)$  в отношении второго эпитопа. В другом неограничивающем примере, можно считать, что антитело предпочтительно связывает первый эпитоп, если оно связывает первый эпитоп с аффинностью, которая по меньшей мере на один порядок величины меньше, чем  $k(off)$  антитела в отношении второго эпитопа. В другом неограничивающем примере, можно считать, что антитело предпочтительно связывает первый эпитоп, если оно связывает первый эпитоп с аффинностью, которая по меньшей мере на два порядка величины меньше, чем  $k(off)$  антитела в отношении второго эпитопа. Можно сказать, что антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, вариант, или производное, описанные в настоящем изобретении, связывают описанный в настоящей заявке целевой полипептид (например, SE-

MA4D, например, SEMA4D человека, мыши, или и человека, и мыши) или его фрагмент или вариант со скоростью диссоциации ( $k(\text{off})$ ), меньшей чем или равной  $5 \times 10^{-2} \text{ с}^{-1}$ ,  $10^{-2} \text{ с}^{-1}$ ,  $5 \times 10^{-3} \text{ с}^{-1}$  или  $10^{-3} \text{ с}^{-1}$ . Предпочтительнее можно сказать, что антитело или его фрагмент, вариант, по настоящему изобретению, связывают описанный в настоящей заявке целевой полипептид (например, SEMA4D, например, SEMA4D человека, мыши, или и человека, и мыши) или его фрагмент или вариант со скоростью диссоциации ( $k(\text{off})$ ), меньшей чем или равной  $5 \times 10^{-4} \text{ с}^{-1}$ ,  $10^{-4} \text{ с}^{-1}$ ,  $5 \times 10^{-5} \text{ с}^{-1}$  или  $10^{-5} \text{ с}^{-1}$ ,  $5 \times 10^{-6} \text{ с}^{-1}$ ,  $10^{-6} \text{ с}^{-1}$ ,  $5 \times 10^{-7} \text{ с}^{-1}$  или  $10^{-7} \text{ с}^{-1}$ .

Можно сказать, что антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, вариант, или производное, описанные в настоящей заявке, связывают описанный в настоящем изобретении целевой полипептид (например, SEMA4D, например, SEMA4D человека, мыши, или и человека, и мыши) или его фрагмент или вариант со скоростью диссоциации ( $k(\text{off})$ ), большей чем или равной  $10^3 \text{ M}^{-1} \text{ с}^{-1}$ ,  $5 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ с}^{-1}$ ,  $10^4 \text{ M}^{-1} \text{ с}^{-1}$  или  $5 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ с}^{-1}$ . Предпочтительнее можно сказать, что антитело по изобретению связывает описанный в настоящей заявке целевой полипептид (например, SEMA4D, например, SEMA4D человека, мыши, или и человека, и мыши) или его фрагмент или вариант со скоростью диссоциации ( $k(\text{off})$ ), большей чем или равной  $10^5 \text{ M}^{-1} \text{ с}^{-1}$ ,  $5 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ с}^{-1}$ ,  $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ с}^{-1}$  или  $5 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ с}^{-1}$  или  $10^7 \text{ M}^{-1} \text{ с}^{-1}$ .

Можно сказать, что антитело конкурентно ингибирует связывание эталонного антитела с данным эпитопом, если оно предпочтительно связывается с этим эпитопом настолько, что оно в некоторой степени блокирует связывание эталонного антитела с эпитопом. Конкурентное ингибирование можно определить любым способом, известным в данной области, например, конкурентными ELISA (иммуноферментными) анализами. Можно сказать, что антитело конкурентно ингибирует связывание эталонного антитела с данным эпитопом по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 60% или по меньшей мере на 50%.

Используемый в настоящем описании термин "аффинность" относится к показателю прочности связывания отдельного эпитопа с CDR молекулы иммуноглобулина. См., например, руководство Harlow et al. (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed.) pages 27-28. Используемый в настоящем описании термин "авидность" относится к общей устойчивости комплекса между популяцией иммуноглобулинов и антигеном, то есть, прочности функционального соединения смеси иммуноглобулина с антигеном. См., например, руководство Harlow на стр. 29-34. Авидность связана и с аффинностью отдельных молекул иммуноглобулина в популяции с определенными эпитопами, и также с валентностями иммуноглобулинов и антигена. Например, взаимодействие между бивалентным моноклональным антителом и антигеном с высокоповторяющейся структурой эпитопа, такой как полимер, было бы взаимодействием с высокой авидностью.

Антитела к SEMA4D или их антигенсвязывающие фрагменты, варианты или производные по изобретению могут также быть описаны или определены с точки зрения их перекрестной реактивности. Используемый в настоящем описании термин "перекрестная реактивность" относится к способности антитела, специфичного в отношении одного антигена, вступать во взаимодействие со вторым антигеном; показателю родства между двумя различными антигенными субстанциями. Таким образом, антитело является перекрестно-реактивным, если оно связывается с эпитопом, отличным от того, который вызвал его образование. Перекрестно-реактивный эпитоп в целом содержит многие из таких же комплементарных структурных признаков, как индуцирующий эпитоп, и, в некоторых случаях, может действительно лучше подходить, чем оригинальный.

Например, определенные антитела обладают некоторой степенью перекрестной реактивности в том, что они связывают родственные, но не идентичные эпитопы, например, эпитопы с идентичностью по меньшей мере 95%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 55% и по меньшей мере 50% (по расчетам с использованием способов, известных в данной области, и описанных в настоящем изобретении) с эталонным эпитопом. Можно сказать, что антитело имеет небольшую или отсутствующую перекрестную реактивность, если оно не связывает эпитопы с идентичностью менее чем 95%, менее чем 90%, менее чем 85%, менее чем 80%, менее чем 75%, менее чем 70%, менее чем 65%, менее чем 60%, менее чем 55%, и менее чем 50% (по расчетам с использованием способов, известных в данной области, и описанных в настоящей заявке) с эталонным эпитопом. Антитело может считаться "высокоспецифичным" в отношении определенного эпитопа, если оно не связывает ни один другой аналог, ортолог или гомолог этого эпитопа.

Молекулы, связывающие антитела к SEMA4D, например, антитела или их антиген-связывающие фрагменты, варианты или производные по изобретению, могут быть также описаны или определены с точки зрения их аффинности связывания с полипептидом по изобретению, например, SEMA4D, например, SEMA4D человека, мыши, или и человека, и мыши. Предпочтительные аффинности связывания включают те, которые имеют константу диссоциации или  $K_d$  меньше чем  $5 \times 10^{-2} \text{ M}$ ,  $10^{-2} \text{ M}$ ,  $5 \times 10^{-3} \text{ M}$ ,  $10^{-3} \text{ M}$ ,  $5 \times 10^{-4} \text{ M}$ ,  $10^{-4} \text{ M}$ ,  $5 \times 10^{-5} \text{ M}$ ,  $10^{-5} \text{ M}$ ,  $5 \times 10^{-6} \text{ M}$ ,  $10^{-6} \text{ M}$ ,  $5 \times 10^{-7} \text{ M}$ ,  $10^{-7} \text{ M}$ ,  $5 \times 10^{-8} \text{ M}$ ,  $10^{-8} \text{ M}$ ,  $5 \times 10^{-9} \text{ M}$ ,  $10^{-9} \text{ M}$ ,  $5 \times 10^{-10} \text{ M}$ ,  $10^{-10} \text{ M}$ ,  $5 \times 10^{-11} \text{ M}$ ,  $10^{-11} \text{ M}$ ,  $5 \times 10^{-12} \text{ M}$ ,  $10^{-12} \text{ M}$ ,  $5 \times 10^{-13} \text{ M}$ ,  $10^{-13} \text{ M}$ ,  $5 \times 10^{-14} \text{ M}$ ,  $10^{-14} \text{ M}$ ,  $5 \times 10^{-15} \text{ M}$  или  $10^{-15} \text{ M}$ . В определенных вариантах осуществления молекула, связывающая антитело к SEMA4D,

например, антитело или его антиген-связывающий фрагмент по изобретению, связывает SEMA4D человека с Kd от примерно  $5 \times 10^{-9}$  до примерно  $6 \times 10^{-9}$ . В другом варианте осуществления молекула, связывающая антитело к SEMA4D, например, антитело или его антиген-связывающий фрагмент по изобретению, связывает SEMA4D мыши с Kd от примерно  $1 \times 10^{-9}$  до примерно  $2 \times 10^{-9}$ .

Используемый в настоящем описании термин "химерное антитело" должен восприниматься как обозначающий любое антитело, причем иммунореактивная область или участок получен или происходит из первого вида, а константная область (которая может быть интактной, частичной или модифицированной в соответствии с настоящим изобретением) получена из второго вида. В предпочтительном варианте осуществления целевая область или участок связывания получен из не человеческого источника (например, мыши или примата), а константная область является константной областью человека.

Используемый в настоящем описании термин "антитело, сконструированное методами генной инженерии" относится к антителу, в котором переменный домен или в тяжелой, или в легкой цепи, или в обеих, изменен, по меньшей мере, частичным замещением одного или нескольких CDR из антитела известной специфичности, и, при необходимости, частичным замещением каркасной области и изменением последовательности. Хотя CDR могут быть получены из антитела того же класса или даже подкласса, что и антитело, из которого получены каркасные участки, то предусматривается, что CDR могут быть получены из антитела другого класса и предпочтительно из антитела из другого вида. Сконструированное методами генной инженерии антитело, в котором одна или несколько "донорских" CDR из нечеловеческого антитела известной специфичности привиты в каркасную область тяжелой или легкой цепи человека, именуется в настоящем описании "гуманизированным антителом". Может не быть необходимости в замещении всех CDR полными CDR из донорского переменного домена для передачи антиген-связывающей способности одного переменного домена другому. Скорее, может быть нужно перенести только те остатки, которые необходимы для поддержания активности целевого связывающего участка.

Кроме того, понятно, что каркасные области в пределах переменного домена в тяжелой или легкой цепи, или их обеих гуманизированного антитела могут содержать только остатки человеческого происхождения, и в этом случае каркасные области гуманизированного антитела именуется "полностью человеческими каркасными областями" (например, MAb VX15/2503, описанный в опубликованной заявке на патент США № US 2010/0285036 A1 в виде MAb 2503, включенной в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме). Альтернативно, один или несколько остатков каркасного участка (участков) донорского переменного домена могут включаться методами генной инженерии в соответствующее положение каркасной области (областей) человека переменного домена в тяжелой или легкой цепи или в обеих цепях гуманизированного антитела для поддержания должного связывания или усиления связывания с антигеном SEMA4D. Таким образом, человеческая каркасная область, которая была сконструирована этими методами генной инженерии, включала бы смесь остатков человеческого и донорского каркаса, и именуется в настоящем описании "частично человеческой каркасной областью".

Например, гуманизация антитела к SEMA4D может, по существу, выполняться в соответствии со способом Winter и сотрудников (Jones et al., *Nature* 527:522-525 (1986); Riechmann et al., *Nature* 532:323-327 (1988); Verhoeven et al., *Science* 25:1534-1536 (1988)), путем замещения соответствующих последовательностей антитела человека к SEMA4D с использованием CDR грызунов или мутантных CDR грызунов. См. также патенты США № 5225539; 5585089; 5693761; 5693762; 5859205, включенные в настоящее описание в качестве ссылки. Полученное гуманизированное антитело к SEMA4D содержит по меньшей мере одну CDR грызунов или мутантную CDR грызунов в пределах полностью человеческих каркасных областей переменного домена тяжелой и/или легкой цепи гуманизированного антитела. В некоторых случаях остатки в пределах каркасных областей одного или нескольких переменных доменов гуманизированного антитела к SEMA4D замещены соответствующими не человеческими остатками (например, грызунов) (см., например, патенты США № 5585089; 5693761; 5693762 и 6180370), и в этом случае полученное гуманизированное антитело к SEMA4D содержит частично человеческие каркасные участки в пределах переменного домена тяжелой и/или легкой цепи.

Кроме того, гуманизированное антитело может содержать остатки, которые обнаруживаются в реципиентном антителе или в донорском антителе. Эти модификации осуществляются для дополнительного уточнения функции антитела (например, для получения желаемой аффинности). В целом, гуманизированное антитело по существу включает все из по меньшей мере одного, а обычно двух, переменных доменов, в которых все или по существу все из CDR соответствуют CDR из иммуноглобулина, не принадлежащего человеку, и все или по существу все каркасные области представляют собой каркасные области последовательности иммуноглобулина человека.

Гуманизированное антитело необязательно также содержит по меньшей мере часть константной области иммуноглобулина (Fc), обычно, часть константной области иммуноглобулина человека. Дополнительные детали можно найти в публикациях Jones et al., *Nature* 332:522-525 (1986); Riechmann et al., *Nature* 552:323-329 (1988); и Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2:593-596 (1992); включенных в настоящее описание путем ссылки. Соответственно такие "гуманизированные" антитела могут включать антитела, в которых по существу менее чем интактный переменный домен человека был замещен соответствующим

шей последовательностью из не человеческого вида. На практике, гуманизированные антитела обычно представляют собой антитела человека, в которых некоторые остатки CDR и, возможно, некоторые каркасные остатки замещены остатками из аналогичных участков в антителах грызунов. См., например, патенты США № 5225539; 5585089; 5693761; 5693762; 5859205. См. также патент США № 6180370 и заявку на Международный патент № WO 01/27160, где описаны гуманизированные антитела и технологии получения гуманизированных антител, имеющих улучшенную аффинность в отношении заданного антигена.

## II. Гематоэнцефалический барьер ("BBB")

Гематоэнцефалический барьер (BBB) представляет собой активную границу раздела между циркулирующей кровью и центральной нервной системой (ЦНС). BBB ограничивает свободное перемещение различных веществ между двумя компартментами и играет ключевую роль в поддержании гомеостаза ЦНС. BBB выполняет и барьерную функцию, и функцию носителя. В качестве барьера, BBB ограничивает перемещение клеток и потенциально токсичных или вредных веществ из крови в мозг. С другой стороны, в качестве носителя, BBB ответствен за транспортировку питательных веществ в мозг и удаление метаболитов.

BBB главным образом составлены из трех компонентов: эндотелиальных клеток, астроцитов и перицитов. Эндотелиальные клетки образуют непрерывный листок, покрывающий внутреннюю поверхность капилляров и кровеносных сосудов в мозге. (Ransohoff et al., "Three or More Routes for Leukocyte Migration Into Central Nervous System," *Nature Rev. Immun.* 3:569-581 (2003)). Эндотелиальные клетки локализуются вблизи к базальной мембране, которая состоит главным образом из коллагена IV, фибронектина, ламинина и протеогликанов, и взаимно соединены плотными контактами, которые образуют подобную поясу структуру в апикальной области клеток. Эндотелиальные клетки ограничивают диффузию микроскопических объектов (например, бактерий) и крупных или гидрофильных молекул в паренхиму мозга и спинномозговую жидкость (CSF), в то же время обеспечивая возможность диффузии мелких гидрофобных молекул ( $O_2$ , гормонов,  $CO_2$ ). Клетки барьера активно транспортируют метаболические продукты, такие как глюкоза, через барьер специфическими белками.

Эндотелиальные клетки, которые образуют капилляры мозга, отличаются от эндотелиальных клеток, обнаруживаемых в других тканях в организме. Эндотелиальные клетки капилляров мозга соединены вместе плотными межклеточными контактами, которые образуют непрерывную стенку против пассивной диффузии молекул из крови в мозг и другие части ЦНС (включая спинномозговую жидкость, CSF). Эти клетки также отличаются тем, что они имеют несколько пиноцитарных везикул, которые в других тканях обеспечивают возможность несколько не селективного транспорта через капиллярную стенку. Также отсутствуют непрерывные зазоры или каналы, проходящие между клетками, которые обеспечивали бы возможность неограниченного прохождения.

В дополнение к эндотелиальным клеткам, BBB также составлен из перицитов и астроцитов. Перициты локализуются внутри базальной мембраны, взаимодействуют с эндотелиальными клетками и играют важную роль в регуляции эндотелиальной пролиферации, ангиогенеза и воспалительных процессов. Астроциты представляют собой характерные, имеющие форму звезд глиальные клетки в головном и спинном мозге и являются наиболее многочисленными клетками мозга человека. Они выполняют множество функций, включая биохимическую поддержку эндотелиальных клеток, которые образуют гематоэнцефалический барьер, обеспечение нервной ткани питательными веществами, поддержание внеклеточного ионного баланса, и роль в процессах репарации и рубцевания головного и спинного мозга после травматических повреждений.

Гематоэнцефалический барьер функционирует для обеспечения того, чтобы среда мозга постоянно регулировалась. Уровни различных веществ в крови, таких как гормоны, аминокислоты и ионы, подвержены частым небольшим колебаниям, которые могут вызываться такими действиями как еда и физическая нагрузка (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)). Если бы мозг не был защищен гематоэнцефалическим барьером от этих изменений состава сыворотки, то результатом могла бы быть нерегулируемая нейронная активность.

Изоляция мозга от кровотока является неполной. Если бы это имело место, то мозг был бы неспособен функционировать должным образом вследствие отсутствия питательных веществ и необходимости обмена химическими веществами с остальным организмом. Присутствие специфических транспортных систем внутри капиллярных эндотелиальных клеток обеспечивает то, что мозг получает регулируемым образом все вещества, требуемые для нормального роста и функции. Во многих случаях, эти транспортные системы состоят из связанных с мембраной белков, которые селективно связывают и транспортируют определенные молекулы через мембраны барьера. Эти транспортные белки известны в качестве растворенных носителей-транспортеров.

Хотя BBB служит для защиты мозга и центральной нервной системы от повреждения инородными или внешними молекулами и клетками, инородные или внешние молекулы и клетки могут часть проходить через BBB и, в ограниченных количествах, могут даже быть благоприятными, например, для иммунологического контроля ЦНС. Однако когда высокоактивные клетки, такие как, например, В-клетки, Т-

клетки, лейкоциты и макрофаги, проходят через BBB в избытке и достигают мозга, то они могут вызвать повреждение мозга. У пациентов, страдающих, например, отеками, мозговыми травмами, инсультом и рассеянным склерозом, проявляется разрушение BBB.

Исследовали воздействие BBB на различные нейровоспалительные расстройства (Zlokovic B.V., "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)). Кроме того, имеется все больше доказательств того, что воспаление и гематоэнцефалический барьер (BBB) (Banks and Erickson, 2010; Lochhead et al., 2010) вовлечены в патогенез неврологических заболеваний, таких как менингит (van der et al., 2004), отек мозга (Stamatovic et al., 2006), болезнь Альцгеймера (Kalaria, 1992), болезнь Паркинсона (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)) и рассеянный склероз (Minagar and Alexander, 2003).

В случае рассеянного склероза, например, при использовании магнитно-резонансной визуализации ("MRI") было показано, что когда индивид подвергается "приступу" MS, BBB разрушается в отделе головного или спинного мозга, обеспечивая Т-лимфоцитам возможность проходить через миелин и атаковать миелин, который защищает и изолирует нейроны центральной нервной системы и в головном, и в спинном мозге. (Zlokovic 2008; Waubant E., "Biomarkers indicative of blood-brain barrier disruption in multiple sclerosis". *Disease Markers* 22 (4): 235-44 (2006)).

С другой стороны, менингит возникает, когда имеется воспаление оболочек, которые окружают головной и спинной мозг (эти оболочки известны как "менинги"). Когда оболочки воспалены, то гематоэнцефалический барьер может разрушаться, обеспечивая возможность и воспалительным клеткам, и различным веществам (включая или токсины, или антибиотики) поступать в мозг. (Beam, T.R. 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).

Аналогичным образом, в случае болезни Паркинсона (PD), предполагали, что всасывание или метаболизм предполагаемых токсинов PD, и их нарушенное выведение через BBB, вследствие низкой активности транспортного Р-гликопротеина (Р-gp), АТФ-зависимый выкачивающий насос, который опосредует быстрое удаление принятых вовнутрь токсических липофильных метаболитов, может играть роль в патогенезе PD (Kortekaas, R., Leenders, 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). Представляется также, что нейровоспаление является непрямым явлением у пациентов с PD и в экспериментальных моделях PD. Были описаны активация фагоцитов, увеличенный синтез и высвобождение провоспалительных цитокинов, активация комплемента, активация микроглии и высвобождение реактивных видов кислорода (ROS) (Whitton, P.S. Inflammation as a causative factor in the aetiology of Parkinson's disease. *Br. J. Pharmacol.* 150, 963-976, 2007).

При эпилепсии исследования показали вовлечение недостаточности функции гематоэнцефалического барьера в запуске хронических или острых судорог вследствие определенных взаимодействий между обычными белками крови, альбумином и астроцитами. Эти данные свидетельствуют о том, что острые судороги являются результатом разрушения BBB или искусственными, или воспалительными механизмами (Oby, E; et al. (2006). "The Blood-Brain Barrier and Epilepsy" (PDF). *Epilepsia* 47 (11): 1761-1774).

У пациентов с болезнью Альцгеймера (AD), имеющиеся свидетельства указывают на разрушение гематоэнцефалического барьера, что обеспечивает возможность плазме крови, содержащей амилоид бета (A $\beta$ ), поступать в мозг через RAGE (рецептор продуктов поздних стадий гликирования), основной транспортер входящего тока A $\beta$  через BBB. Исследования показали, что взаимодействие A $\beta$ /RAGE приводит к трансцитозу циркулирующего A $\beta$  через BBB в паренхиму мозга и его связыванию с нейронами, NF-kB-опосредованной активации эндотелия, приводящей к секреции провоспалительных цитокинов, экспрессии адгезионных молекул и генерированию эндотелина-1, который подавляет CBF (церебральный кровоток). Кроме того, было показано, что взаимодействие A $\beta$ /RAGE способствует нейронному киллингу путем продукции окислительного повреждения RAGE-экспрессирующих нейронов и активацией микроглии (Zlokovic, B.V. The Blood-Brain Barrier in Health and Chronic Neurodegenerative Disorders. *Neuron* 57, 178-201, 2008). Нарушенный выходящий ток A $\beta$  из паренхимы мозга и в микрососудистую систему через BBB также был обнаружен в комплексе патогенеза AD и был частично отнесен на счет нарушенной функции связанного с рецептором липопротеина низкой плотности белка 1 (LRP1). LRP1 представляет собой альбуминный мембранный белок BBB, который связывает и транспортирует различные структурные конформеры A $\beta$  (Deane et al., "LRP/amyloid beta-peptide interaction mediates differential brain efflux of Abeta isoforms." *Neuron* 43, 333-344, 2004). Воздействие  $\beta$  сдвигает типы экспрессии белков плотных контактов, включая клаудин-5 и ZO-2, на мозговых микрососудистых эндотелиальных клетках к цитоплазме (Marco et al., "Amyloid p-peptide 1-42 alters tight junction protein distribution and

expression in brain micro vessel endothelial cells". *Neurosci. Lett.* 401, 219-224, 2006), и значительно нарушает трансэндотелиальное электрическое сопротивление (TEER) монослоев этих клеток (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).

При боковом амиотрофическом склерозе (ALS), исследования свидетельствовали о том, что разрушение BBB может привести к утечке сывороточных белков, которые взаимодействуют с двигательными нейронами для продукции ROS (реактивных видов кислорода) и инициации аутоиммунной реакции, вызывающей демиелинизацию, прерывание нейронной передачи и гибель клеток. (Zlokovic, 2008).

Недавно проведенное исследование свидетельствует о том, что ослабление BBB может возникать в результате нарушения в эндотелиальных клетках, опосредованного через их рецепторы VEGF-A. (Argaw AT et al., "VEGF-mediated disruption of endothelial CLN-5 promotes blood-brain barrier breakdown," *PNAS* 106(6): 1977-1982 (2009)). В соответствии с этим исследованием, VEGF-A, который происходит из астроцитов, нацелен и прерывает экспрессию обоих белков эндотелиального трансмембранного плотного контакта клаудина-5 (CLN-5) и окклюдина (OCLN). По мере уменьшения экспрессии и CLN-5, и OCLN увеличивается разрушение BBB.

Как показано в настоящих примерах, другой возможный механизм ослабления BBB является результатом нарушения эндотелиальных клеток посредством высокоаффинного (1 нМ) рецептора плексина-B1 в отношении SEMA4D. Плексин-B1 может быть экспрессирован эндотелиальными клетками. В присутствии SEMA4D, эндотелиальные клетки могут подвергаться трансформации, которая изменяет морфологию или функцию эндотелиальных клеток с тем, чтобы вызвать ослабление BBB, например, через модификацию плотных контактов. Это ослабление BBB может в свою очередь увеличить проницаемость BBB для клеток и молекул и обеспечить таким клеткам и молекулам возможность поступления в мозг и изменения активности мозга и центральной нервной системы. Следовательно, добавление или антитела против SEMA4D, или антитела против плексина-B1 может предотвратить подверженность эндотелиальных клеток к трансформации и снизить ослабление BBB.

### III. Описание полипептида-мишени

Используемые в настоящем описании термины "семафорин-4D", "SEMA4D" и "полипептид SEMA4D" используются взаимозаменяемо, как и "SEMA4D" и "Sema4D". В определенных вариантах осуществления SEMA4D экспрессирован на поверхности клетки или секретируется клеткой. В другом варианте осуществления SEMA4D связан с мембраной. В другом варианте осуществления SEMA4D является растворимым, например, sSEMA4D. В других вариантах осуществления SEMA4D может включать полноразмерный SEMA4D или его фрагмент, или вариантный полипептид SEMA4D, причем фрагмент SEMA4D или вариантный полипептид SEMA4D сохраняет некоторые или все функциональные свойства полноразмерного SEMA4D.

Полноразмерный белок SEMA4D человека представляет собой гомодимерный трансмембранный белок, состоящий из двух полипептидных цепей по 150 кДа. SEMA4D относится к семейству семафорина рецепторов клеточной поверхности и также именуется CD100. И человеческий, и мышиный SEMA4D/Sema4D протеолитически расщепляются из их трансмембранной формы для получения 120-кДа растворимых форм, указывающих на существование двух изоформ Sema4D (Kumanogoh et al., *J. Cell Science* 116(7) 3464 (2003)). Семафорины включают растворимые и связанные с мембраной белки, которые первоначально определялись как факторы аксонного ведения во время развития, играющие важную роль в установлении точных соединений между нейронами и их соответствующей мишенью. Структурно считающиеся семафоринами IV класса, полноразмерные SEMA4D включают аминоконцевую сигнальную последовательность, за которой следует характерный домен "Sema", содержащий 17 консервативных остатков цистеина, Ig-подобный домен, богатый лизином фрагмент секвенирования, гидрофобная трансмембранная область и цитоплазматический хвост.

Каждая полипептидная цепь SEMA4D включает сигнальную последовательность из примерно 13 аминокислот, за которой следует домен семафорина из примерно 512 аминокислот, подобный иммуноглобулину (Ig-подобный) домен из примерно 65 аминокислот, богатый лизином фрагмент секвенирования из 104 аминокислот, гидрофобная трансмембранная область из примерно 19 аминокислот и цитоплазматический хвост из 110 аминокислот. Консенсусный сайт для фосфорилирования тирозина в цитоплазматическом хвосте поддерживает прогнозируемую связь SEMA4D с тирозинкиназой (Schlossman, et al., Eds. (1995) *Leucocyte Typing V* (Oxford University Press, Oxford)).

Известно, что SEMA4D имеет по меньшей мере два рецептора. Один из рецепторов, плексин-B1, экспрессирован в нелимфоидных тканях, и, как было показано, имеет высокоаффинный (1 нМ) рецептор к SEMA4D (Tamagnone et al., *Cell* 99:71-80 (1999)). Было показано, что вызванная SEMA4D стимуляция передачи сигналов плексина-B1 вызывает коллапс конуса роста нейронов и вызывает коллапс удлинения отростка и апоптоз олигодендроцитов (Giraudon et al., *J Immunol.* 72: 1246-1255 (2004); Giraudon et al., *NeuroMolecular Med.* 7:207-216 (2005)). После связывания с SEMA4D, передача сигналов плексина-B1 опосредует инактивацию R-Ras, приводя к уменьшению опосредованного интегрином прикрепления к внеклеточной матрице, а также к активации RhoA, приводя к реорганизации цитоскелета и клеточной миграции. См. Kruger et al., *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* (5):789-800 (2005); Pasterkamp, *TRENDS in Cell Bi-*

ology 75:61-64 (2005)).

В лимфоидных тканях CD72 используется в качестве низко аффинного (300 nM) рецептора SEMA4D (Kumanogoh et al., *Immunity* 73:621-631 (2000)). В-клетки и APC экспрессируют CD72, и анти-CD72 антитела оказывают многие из тех же эффектов, что и sSEMA4D, такие как усиление вызванных CD40 реакций В-клеток и В-клеточный шеддинг CD23. Считают, что CD72 действует в качестве отрицательного регулятора В-клеточных реакций путем рекрутирования тирозинфосфатазы SHP-1, которая может ассоциироваться со многими ингибиторными рецепторами. Взаимодействие SEMA4D с CD72 приводит к диссоциации SHP-1 и к потере этого сигнала негативной активации. Было показано, что SEMA4D содействует стимуляции Т-клеток и агрегации и выживанию

В-клеток *in vitro*. Добавление SEMA4D-экспрессирующих клеток или sSEMA4D усиливает вызванную CD40 пролиферацию В-клеток и продукцию иммуноглобулина *in vitro* и ускоряет реакции антител *in vivo* (Ishida et al., *Inter. Immunol.* 75: 1027-1034 (2003); Kumanogoh and H. Kikutani, *Trends in Immunol.* 22:670-676 (2001)). sSEMA4D усиливает вызванную CD40 миграцию DC, включая стимуляцию костимуляторных молекул и увеличенную секрецию IL-12. Кроме того, sSEMA4D может ингибировать миграцию иммунных клеток, которая может быть обращена добавлением блокирующего антитела к SEMA4D (Elhabazi et al., *J. Immunol.* 166:4341-4347 (2001); Delaire et al., *J. Immunol.* 166:4348-4354 (2001)).

Sema4D экспрессирован на высоких уровнях в лимфоидных органах, включая селезенку, тимус и лимфатические узлы, и в нелимфоидных органах, таких как мозг, сердце и почки. В лимфоидных органах Sema4D обильно экспрессирован на покоящихся Т-клетках, но лишь слабо экспрессирован на покоящихся В-клетках и антиген-презентирующих клетках (APC), таких как дендритные клетки (DC). Клеточная активация увеличивает поверхностную экспрессию SEMA4D, также генерирование растворимого SEMA4D (sSEMA4D).

Тип экспрессии SEMA4D свидетельствует о том, что он играет важную физиологическую роль, а также патологическую роль в иммунной системе. Было показано, что SEMA4D способствует активации, агрегации и выживанию В-клеток; усиливает вызванную CD40 пролиферацию и продукцию антител; усиливает реакцию антител на зависимые от Т-клеток антигены; увеличивает пролиферацию Т-клеток; усиливают мутацию дендритных клеток и способность стимулировать Т-клетки; и непосредственно вовлечен в демиелинизацию и аксонную дегенерацию (Shi et al., *Immunity* 75:633-642 (2000); Kumanogoh et al., *J Immunol* 769: 1175-1181 (2002); и Watanabe et al., *J Immunol* 767:4321-4328 (2001)).

Мыши с нокаутом SEMA4D (SEMA4D<sup>-/-</sup>) обеспечили дополнительное свидетельство того, что SEMA4D играет важную роль и в гуморальных, и клеточных иммунных ответах. У мышей SEMA4D<sup>-/-</sup> нет известных существенных патологических изменений нелимфоидных тканей. Дендритные клетки (DC) от мышей SEMA4D<sup>-/-</sup> имеют слабую аллостимулирующую способность и проявляют дефекты экспрессии костимуляторных молекул, которая может быть восстановлена добавлением sSEMA4D. У мышей (SEMA4D<sup>-/-</sup>) с дефицитом SEMA4D не может развиваться экспериментальный аутоиммунный энцефаломиелит, вызванный миелиновым олигодендроцитарным гликопротеин-специфическим пептидом, потому что миелиновые олигодендроцитарные гликопротеин-специфические Т-клетки слабо генерируются в отсутствие SEMA4D (Kumanogoh et al., *J Immunol* 169:1175-1181 (2002)). Значительное количество растворимого SEMA4D также выявляется в сыворотке склонных к аутоиммунитету мышей MRL/lpr (модель системных аутоиммунных заболеваний, таких как SLE (системная красная волчанка)), но не у нормальных мышей. Кроме того, уровни sSEMA4D коррелируются с уровнями аутоантител и увеличиваются с возрастом (Wang et al., *Blood* 97:3498-3504 (2001)). Было также показано, что растворимый SEMA4D накапливается в спинномозговой жидкости и сыворотке пациентов с демиелинизирующими заболеваниями, и sSEMA4D вызывает апоптоз плюрипотентных нейронных предшественников человека (клетки Dev), и оба ингибируют удлинение отростка и вызывают апоптоз олигодендроцитов крысы *in vitro* (Giraudon et al., *J Immunol* 772(2): 1246-1255 (2004)). Этот апоптоз блокировался MAb к SEMA4D.

#### IV. Антитела к SEMA4D

Антитела, которые связывают SEMA4D, были описаны в данной области. См., например, опубликованные заявки на патенты США № 2008/0219971 A1, 2010/0285036 A1 и 2006/0233793 A1, заявки на Международные патенты WO 93/14125, WO 2008/100995 и WO 2010/129917 и публикацию Herold et al., *Int. Immunol.* 7(1):1-8 (1995), каждая включена в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме.

Настоящая заявка в целом относится к способу уменьшения проницаемости гематоэнцефалического барьера у индивида, например, человека-пациента, имеющего нейровоспалительное поражение, например, воспалительное поражение ЦНС или нейродегенеративное расстройство, включающему введение антитела, которое специфически связывается с SEMA4D, или его антиген-связывающий фрагмент, вариант или производное. В определенных вариантах осуществления антитело блокирует взаимодействие SEMA4D с одним или несколькими рецепторами, например, плексином-B1. Антитела к SEMA4D, обладающие этими свойствами, могут применяться в способах по настоящему изобретению. Антитела, которые могут применяться, включают без ограничения MAb VX15/2503, 67 и 76 и их антигенсвязывающие фрагменты, варианты или производные, которые полностью описаны в заявке на патент США № US 2010/0285036 A1. Дополнительные антитела, которые могут применяться в способах по настоящему изобретению, включают антитела BD16 и BB18, описанные в заявке на патент США № 2006/0233793 A1, а

также их антигенсвязывающие фрагменты, варианты или производные; или любые из MAб 301, MAб 1893, MAб 657, MAб 1807, MAб 1656, MAб 1808, MAб 59, MAб 2191, MAб 2274, MAб 2275, MAб 2276, MAб 2277, MAб 2278, MAб 2279, MAб 2280, MAб 2281, MAб 2282, MAб 2283, MAб 2284 и MAб 2285, а также любые их фрагменты, варианты или производные, как описано в заявке на патент США № 2008/0219971 A1. В определенных вариантах осуществления антитело против SEMA4D для применения в способах по изобретению, связывает SEMA4D человека, мыши или и человека, и мыши. Также полезны антитела, которые связываются с таким же эпитопом, как любое из указанных выше антител и/или антител, которые конкурентно ингибируют связывание с SEMA4D любого из указанных выше антител.

В определенных вариантах осуществления антитело к SEMA4D или его антигенсвязывающий фрагмент, вариант или производное, полезные в способах по изобретению, имеет аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность последовательности по меньшей мере примерно 80%, примерно 85%, примерно 88%, примерно 89%, примерно 90%, примерно 91%, примерно 92%, примерно 93%, примерно 94%, или примерно 95% с аминокислотной последовательностью эталонной молекулы антитела к SEMA4D, например, те, которые описаны выше. В еще одном варианте осуществления связывающая молекула разделяет идентичность последовательности по меньшей мере примерно 96%, примерно 97%, примерно 98%, примерно 99%, или 100% с эталонным антителом.

В другом варианте осуществления антитело к SEMA4D или его антигенсвязывающий фрагмент, вариант, или производное, полезные в способах по изобретению, содержит, по существу состоит или состоит из варибельного домена тяжелой цепи иммуноглобулина (домена VH), где по меньшей мере одна из CDR домена VH имеет аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере примерно на 80%, примерно на 85%, примерно на 90%, примерно на 95%, примерно на 96%, примерно на 97%, примерно на 98%, примерно на 99% или идентична CDR1, CDR2 или CDR3 SEQ ID NO:9 или 10.

В другом варианте осуществления антитело к SEMA4D или его антигенсвязывающий фрагмент, вариант или производное, полезное в способах по настоящему изобретению, содержит, по существу состоит из или состоит из варибельного домена тяжелой цепи иммуноглобулина (домена VH), где по меньшей мере одна из CDR домена VH имеет аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере примерно на 80%, примерно на 85%, примерно на 90%, примерно на 95%, примерно на 96%, примерно на 97%, примерно на 98%, примерно на 99% или идентична SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7 или SEQ ID NO:8.

В другом варианте осуществления антитело к SEMA4D или его антигенсвязывающий фрагмент, вариант, или производное, полезные в способах по настоящему изобретению, содержит, по существу состоит из или состоит из варибельного домена тяжелой цепи иммуноглобулина (домена VH), где по меньшей мере одна из CDR домена VH имеет аминокислотную последовательность, идентичную, за исключением 1, 2, 3, 4, или 5 консервативных аминокислотных замещений, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7 или SEQ ID NO:8.

В другом варианте осуществления антитело к SEMA4D или его антигенсвязывающий фрагмент, вариант или производное, полезные в способах по настоящему изобретению, содержит, состоит по существу из или состоит из домена VH, который имеет аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере примерно на 80%, примерно на 85%, примерно на 90%, примерно на 91%, примерно на 92%, примерно на 93%, примерно на 94%, примерно на 95%, примерно на 96%, примерно на 97%, примерно на 98%, примерно на 99% или на 100% идентична SEQ ID NO:9 или SEQ ID NO:10, причем, антитело против SEMA4D, содержащее кодированный домен VH, специфически, предпочтительно или конкурентно связывается с SEMA4D.

В другом варианте осуществления антитело к SEMA4D или его антигенсвязывающий фрагмент, вариант или производное, полезные в способах по настоящему изобретению, содержит, состоит по существу из или состоит из варибельного домена легкой цепи иммуноглобулина (домена VL), где по меньшей мере одна из CDR домена VL имеет аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере примерно на 80%, примерно на 85%, примерно на 90%, примерно на 95%, примерно на 96%, примерно на 97%, примерно на 98%, примерно на 99% или идентична CDR1, CDR2 или CDR3 SEQ ID NO:17 или 18.

В другом варианте осуществления антитело к SEMA4D или его антигенсвязывающий фрагмент, вариант или производное, полезные в способах по настоящему изобретению, содержит, состоит по существу из или состоит из варибельного домена легкой цепи иммуноглобулина (домена VL), где по меньшей мере одна из CDR домена VL имеет аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере примерно на 80%, примерно на 85%, примерно на 90%, примерно на 95%, примерно на 96%, примерно на 97%, примерно на 98%, примерно на 99% или идентична SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:15 или SEQ ID NO:16.

В другом варианте осуществления антитело к SEMA4D или его антигенсвязывающий фрагмент, вариант, или производное, полезные в способах по настоящему изобретению, содержит, по существу состоит из или состоит из варибельного домена легкой цепи иммуноглобулина (домена VL), где по меньшей мере одна из CDR домена VL имеет аминокислотную последовательность, идентичную, за исключением 1, 2, 3, 4 или 5 консервативных аминокислотных замещений, SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:15 или

SEQ ID NO:16.

В другом варианте осуществления антитело к SEMA4D или его антигенсвязывающий фрагмент, вариант или производное, полезные в способах по настоящему изобретению, содержит, состоит по существу из или состоит из домена VL, который имеет аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере примерно на 80%, примерно на 85%, примерно на 90%, примерно на 91%, примерно на 92%, примерно на 93%, примерно на 94%, примерно на 95%, примерно на 96%, примерно на 97%, примерно на 98%, примерно на 99% или на 100% идентична SEQ ID NO: 17 или SEQ ID NO:18, причем, антитело против SEMA4D, содержащее кодированный домен VL, специфически, предпочтительно или конкурентно связывается с SEMA4D.

В другом варианте осуществления антитело к SEMA4D или его антигенсвязывающий фрагмент, вариант или производное, полезные в способах по настоящему изобретению, содержит, состоит по существу из или состоит из переменного домена тяжелой цепи иммуноглобулина (домена VH) и переменного домена легкой цепи иммуноглобулина (домена VL), где по меньшей мере одна из CDR домена VH имеет аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере примерно на 80%, примерно на 85%, примерно на 90%, примерно на 95%, примерно на 96%, примерно на 97%, примерно на 98%, на 99% или полностью идентична CDR1, CDR2 или CDR3 SEQ ID NO:9 или 10, и по меньшей мере одна CDR домена VL имеет аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере примерно на 80%, примерно на 85%, примерно на 90%, примерно на 95%, примерно на 96%, примерно на 97%, примерно на 98%, примерно на 99% или идентична CDR1, CDR2 или CDR3 SEQ ID NO:17 или 18.

В другом варианте осуществления антитело к SEMA4D или его антигенсвязывающий фрагмент, вариант, или производное, полезные в способах по настоящему изобретению, содержит, по существу состоит из или состоит из переменного домена тяжелой цепи иммуноглобулина (домена VH) и переменного домена легкой цепи иммуноглобулина (домена VL), где по меньшей мере одна из CDR домена VH имеет аминокислотную последовательность, идентичную, за исключением 1, 2, 3, 4 или 5 консервативных аминокислотных замещений, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7 или SEQ ID NO:8, и где по меньшей мере одна из CDR домена VL имеет аминокислотную последовательность, идентичную, за исключением 1, 2, 3, 4 или 5 консервативных аминокислотных замещений, SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:15 или SEQ ID NO:16.

В другом варианте осуществления антитело к SEMA4D или его антигенсвязывающий фрагмент, вариант, или производное, полезные в способах по настоящему изобретению, содержит, состоит по существу из или состоит из домена VH, который имеет аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере примерно на 80%, примерно на 85%, примерно на 90%, примерно на 91%, примерно на 92%, примерно на 93%, примерно на 94%, примерно на 95%, примерно на 96%, примерно на 97%, примерно на 98%, примерно на 99% или на 100% идентична SEQ ID NO:9 или SEQ ID NO:10, и домена VL, который имеет аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере примерно на 80%, примерно на 85%, примерно на 90%, примерно на 91%, примерно на 92%, примерно на 93%, примерно на 94%, примерно на 95%, примерно на 96%, примерно на 97%, примерно на 98%, примерно на 99% или на 100% идентична SEQ ID NO:17 или SEQ ID NO:18, причем антитело к SEMA4D, содержащее кодированные домены VH и VL, специфически предпочтительно или конкурентно связывается с SEMA4D.

В другом варианте осуществления антитело к SEMA4D или его антигенсвязывающий фрагмент, вариант или производное, полезные в способах по настоящему изобретению, содержит, по существу состоит из или состоит из трех CDR домена VL и трех CDR домена VH MAb VX15/2503, 67 или 76, которые полностью описаны в заявке на патент США № 2010/0285036 A1. В некоторых вариантах осуществления антитело к SEMA4D, полезное в способах по настоящему изобретению, содержит MAb VX15/2503 или 67.

Также включаются для применения в способах по настоящему изобретению полипептиды, кодирующие антитела к SEMA4D или их антигенсвязывающие фрагменты, варианты или производные, как описано в настоящем изобретении, полинуклеотиды, кодирующие такие полипептиды, векторы, содержащие такие полинуклеотиды, и клетки-хозяева, содержащие такие векторы или полинуклеотиды, все для получения антител к SEMA4D или их антигенсвязывающих фрагментов, вариантов или производных для применения в способах, описанных в настоящей заявке.

Подходящие биологические активные варианты антител к SEMA4D по изобретению могут применяться в способах по настоящему изобретению. Такие варианты должны сохранять желаемые свойства связывания материнского антитела к SEMA4D. Способ получения вариантов антител в целом доступен в данной области.

Способы мутагенеза и изменения нуклеотидной последовательности хорошо известны в данной области. См., например, публикации Walker и Gaastra, eds. (1983) *Techniques in Molecular Biology* (MacMillan Publishing Company, New York); Kunkel, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 52:488-492 (1985); Kunkel et al., *Methods Enzymol.* 754:367-382 (1987); Sambrook et al. (1989) *Molecular Cloning: Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor, N.Y.); патент США № 4873192; и ссылки, приведенные в них. Руководство в отношении соответствующих аминокислотных замещений, которые не воздействуют на биологическую активность представляющего интерес полипептида, можно найти в модели Dayhoff et al. (1978) в атласе Atlas of Pro-

tein Sequence and Structure (Natl. Biomed. Res. Found., Washington, D.C.), pp. 345-352, полностью включенном в настоящее описание путем ссылки. В модели Dayhoff et al. используется матрица аминокислотного подобия (матрица PAM 250) точковой допускаемой мутации (PAM) для определения подходящих консервативных аминокислотных замещений. Могут быть предпочтительны консервативные замещения, такие как обмен одной кислоты на другую, имеющую подобные свойства. Примеры консервативных аминокислотных замещений, по данным матрицы PAM 250 модели Dayhoff et al., включают без ограничения Gly↔Ala, Val↔Ile↔Leu, Asp↔Glu, Lys↔Arg, Asn↔Gln и Phe↔Trp↔Tyr.

При конструировании вариантов молекулы, связывающей антитело к SEMA4D, например, антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, представляющих интерес полипептидов, вносятся такие модификации, чтобы варианты продолжали обладать желаемыми свойствами, например, быть способными специфически связываться с SEMA4D, например, SEMA4D человека, мыши, или и человека, и мыши, например, экспрессированным на поверхности клетки, или секретируемым клеткой, и обладающим блокирующей SEMA4D активностью, как описано в настоящей заявке. Очевидно, что любые мутации, внесенные в ДНК, кодирующую вариантный полипептид, не должны помещать последовательность вне рамки считывания и предпочтительно не создавать комплементарные области, которые могут продуцировать вторичную структуру мРНК. См. заявку на Европейский патент № 75444.

Способы измерения специфичности связывания молекулы, связывающей антитело к SEMA4D, например, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, вариант или производное, включают без ограничения стандартные анализы конкурентного связывания, анализы для мониторинга секреции иммуноглобулина Т-клетками или В-клетками, анализы пролиферации Т-клеток, анализы апоптоза, анализы ELISA и тому подобные. См., например, такие анализы, описанные в документах WO 93/14125; Shi et al., *Immunity* 13:633-642 (2000); Kumanogoh et al., *J Immunol* 169: 1175-1181 (2002); Watanabe et al., *J Immunol* 167:4321-4328 (2001); Wang et al., *Blood* 97:3498-3504 (2001); и Giraudon et al., *J Immunol* 172(2):1246-1255 (2004), которые включены в настоящую заявку в качестве ссылки.

При обсуждении в настоящем описании того, является ли полипептид, содержащий описанные в настоящей заявке константные области, CDR, домены VH, или домены VL, по меньшей мере примерно на 65%, примерно на 70%, примерно на 75%, примерно на 80%, примерно на 85%, примерно на 90%, примерно на 91%, примерно на 92%, примерно на 93%, примерно на 94%, примерно на 95%, примерно на 96%, примерно на 97%, примерно на 98%, примерно на 99% или даже примерно на 100% идентичным другому полипептиду, % идентичности можно определить, используя способы и компьютерные программы/программное обеспечение, известные в данной области, такие как без ограничения программа BESTFIT (Wisconsin Sequence Analysis Package, Version 8 for Unix, Genetics Computer Group, University Research Park, 575 Science Drive, Madison, Wis. 53711). BESTFIT использует местный алгоритм гомологии по Smith and Waterman (1981) *Adv. Appl. Math.* 2:482-489, для обнаружения наилучшего сегмента гомологии между двумя последовательностями. При использовании программы BESTFIT или любой другой программы совмещения последовательностей для определения того, является ли конкретная последовательность, например, на 95% идентичной эталонной последовательности в соответствии с настоящим изобретением, конечно, устанавливаются такие параметры, чтобы процентный показатель идентичности рассчитывался по полной длине эталонной последовательности полипептида, и что допускаются гэпы в гомологии до 5% общего числа аминокислот в эталонной последовательности.

В целях настоящего изобретения, процент идентичности последовательностей можно определить, используя алгоритм поиска гомологии Смита-Уотермана, с использованием поиска аффинного гэпа со штрафом 12 за открытый гэп и штрафом 2 за удлинение гэпа, матрицы BLOSUM 62. Алгоритм поиска гомологии Смита-Уотермана обсуждается в публикации Smith и Waterman (1981) *Adv. Appl. Math.* 2:482-489. Вариант может, например, отличаться от эталонного антитела к SEMA4D (например, MAб VX15/2503, 67 или 76) всего лишь 1-15 аминокислотными остатками, всего лишь 1-10 аминокислотными остатками, например, 6-10, всего лишь 5, всего лишь 4, 3, 2 или даже 1 аминокислотным остатком.

Константная область антитела к SEMA4D может быть мутирована для изменения эффекторной функции рядом путей. Например, см. патент США № 6737056 B1 и заявку на патент США № 2004/0132101 A1, в которых раскрыты мутации Fc, которые оптимизируют связывание антитела с Fc рецепторами.

В определенных антитела к SEMA4D или их фрагментах, вариантах или производных, полезных в способах по настоящему изобретению, часть Fc может мутироваться для уменьшения эффекторной функции с использованием технологий, известных в данной области. Например, делеция или инактивация (посредством точковой мутации или другого средства) домена константной области может снизить связывание Fc рецепторами циркулирующего модифицированного антитела, посредством этого увеличивая локализацию опухоли. В других случаях, модификации константной области в соответствии с настоящим изобретением сдерживают связывание комплемента и, таким образом, период полувыведения из сыворотки. Еще одни модификации константной области могут использоваться для модификации дисульфидных связей или олигосахаридных составляющих, которые обеспечивают возможность повышения локализации вследствие увеличенной антигенной специфичности или гибкости антитела. Полученные в результате физиологический профиль, биодоступность и другие биохимические эффекты модифи-

каций, такие как локализация опухоли, биораспределение и период полувыведения из сыворотки, можно легко измерить и количественно определить, используя хорошо известные иммунологические методики без ненужного. Антитела к SEMA4D для использования в способах по настоящему изобретению включают производные, которые модифицированы, например, ковалентным присоединением любого типа молекулы к антителу с тем, чтобы ковалентное присоединение не препятствовало специфическому связыванию антитела к его когнатному эпитопу. Например, но без ограничения, производные антитела включают антитела, которые были модифицированы, например, гликозилированием, ацетилированием, пегилированием, фосфорилированием, амидированием, дериватизацией известными защитными/блокирующими группами, протеолитическим расщеплением, связью с клеточным лигандом или другим белком и т.д. Любые из многочисленных химических модификаций могут проводиться известными методиками, включая без ограничений специфическое химическое расщепление, ацетилирование, формилирование и т.д. Кроме того, производное может содержать одну или несколько не классических аминокислот.

"Консервативное аминокислотное замещение" представляет собой такое, при котором аминокислотный остаток замещен аминокислотным остатком, имеющим боковую цепь с подобным зарядом. Семейства аминокислотных остатков, имеющих боковые цепи с одинаковыми зарядами, были определены в данной области. Эти семейства включают аминокислоты с основными боковыми цепями (например, лизин, аргинин, гистидин), кислотные боковые цепи (например, аспарагиновая кислота, глутаминовая кислота), незаряженные боковые цепи (например, глицин, аспарагин, глутамин, серин, треонин, тирозин, цистеин), неполярные боковые цепи (например, аланин, валин, лейцин, изолейцин, пролин, фенилаланин, метионин, триптофан), бета-разветвленные боковые цепи (например, треонин, валин, изолейцин) и ароматические боковые цепи (например, тирозин, фенилаланин, триптофан, гистидин). Альтернативно, мутации могут быть внесены случайно по всей или части кодирующей последовательности, например, насыщающим мутагенезом, и может проводиться скрининг полученных в результате мутантов в отношении биологической активности для идентификации мутантов, которые сохраняют активность (например, способность связывать полипептид антитела к SEMA4D, блокировать взаимодействие SEMA4D с его рецептором или уменьшать проницаемость BBB у индивида, например, пациента с нейровоспалительным расстройством).

Например, можно внести мутации только в каркасные участки или только в области CDR молекулы антитела. Внесенные мутации могут представлять собой молчащие или нейтральные бессмысленные мутации, т.е. не оказывают или оказывают небольшой эффект на способность антитела связывать антиген. Эти типы мутаций могут применяться для оптимизации использования кодона или улучшения продукции антител гибридомы. Альтернативно, не нейтральные бессмысленные мутации могут изменить способность антитела связывать антиген. Специалист в данной области способен сконструировать и тестировать мутантные молекулы с желаемыми свойствами, такими как отсутствие изменения связывающей антиген активности или изменение активности связывания (например, улучшения связывающей антиген активности или изменение специфичности антитела). После мутагенеза, кодированный белок может быть обычно экспрессирован, и функциональную и/или биологическую активность кодированного белка (например, способность иммуноспецифически связывать по меньшей мере один эпитоп полипептида SEMA4D) можно определить, используя методики, описанные в настоящей заявке, или обычно модификацией методик, известных в данной области.

В определенных вариантах осуществления антитела к SEMA4D для использования в способах по настоящему изобретению, содержат по меньшей мере одну оптимизированную определяющую комплементарность область (CDR). Под термином "оптимизированная CDR" подразумевается, что CDR была модифицирована и оптимизирована для улучшения аффинности связывания и/или активности против SEMA4D, которая придана антителу к SEMA4D, содержащему оптимизированную CDR. "Активность против SEMA4D" или "блокирующая SEMA4D активность" могут включать активность, которая модулирует одну или несколько следующих видов активности, связанных с SEMA4D: активация агрегация и выживание В-клеток; вызванная CD40 пролиферация и продукция антител; реакция антител на зависящие от Т-клеток антигены; пролиферация Т-клеток или других иммунных клеток; созревание дендритных клеток; демиелинирование и аксональная дегенерация; апоптоз плюрипотентных нейронных предшественников и/или олигодендроцитов; индукция миграции эндотелиальных клеток; ингибирование спонтанной миграции моноцитов; связывание с плексином-B1 или другим рецептором клеточной поверхности или любая другая активность, связанная с растворимым SEMA4D, или SEMA4D, который экспрессирован на поверхности клеток SEMA4D+. Активность против SEMA4D можно также отнести на счет уменьшения встречаемости или тяжести заболеваний, связанных с экспрессией или сверхэкспрессией SEMA4D, включая, без ограничения, нейровоспалительные заболевания, включая воспалительные заболевания центральной нервной системы (ЦНС) и периферической нервной системы (ПНС).

Примеры оптимизированных антител на основе MAб мыши BD16 и BB18 к SEMA4D были описаны в опубликованной заявке на патент США № 2008/0219971 A1, в заявке на Международный патент WO 93/14125 и в публикации Herold et al., Int. Immunol. 7(1):1-8 (1995), каждая из которых полностью включена в настоящее описание путем ссылки. Модификации могут вовлекать замещение аминокислотных

остатков в пределах CDR, так что антитело к SEMA4D сохраняет специфичность в отношении антигена SEMA4D и обладает улучшенной аффинностью связывания и/или повышенной активностью против SEMA4D.

#### V. Способы лечения с использованием терапевтических антител к SEMA4D и к плексину-B1

Способы по изобретению направлены на применение ингибитора взаимодействия SEMA4D с рецептором SEMA4D, например, молекул, связывающих антитело к SEMA4D, молекул, связывающих антитело к плексину-B1 или их комбинации, например, антитела, включая его антигенсвязывающие фрагменты, варианты и производные, для уменьшения проницаемости гематоэнцефалического барьера у индивида, имеющего нейровоспалительное расстройство. В определенных вариантах осуществления нейровоспалительное расстройство представляет собой, например, рассеянный склероз, боковой амиотрофический склероз, эпилепсию, болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона, менингит, отек мозга, мозговую травму или инсульт. В определенных вариантах осуществления эндотелиальные клетки экспрессируют рецептор SEMA4D; и в определенных вариантах осуществления рецептор представляет собой плексин-B1. Хотя следующее обсуждение относится к введению антитела к SEMA4D, антитела к плексину-B1 и их комбинации, способы, описанные в настоящей заявке, также могут применяться для антигенсвязывающих фрагментов, вариантов и производных этих антител к SEMA4D или к плексину-B1, которые сохраняют желаемые свойства антител к SEMA4D или к плексину-B1 по изобретению, например, способных специфически связывать SEMA4D, например, SEMA4D человека, мыши или человека и мыши, обладающий нейтрализующей SEMA4D активностью, и/или блокирующий взаимодействие SEMA4D с его рецептором, например, плексином-B1.

В одном из вариантов осуществления лечение включает нанесение или введение молекулы, связывающей антитело к SEMA4D, молекулы, связывающей антитело к плексину-B1, или их комбинации, например, антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, как описано в настоящей заявке, пациенту, причем у пациента имеется нейровоспалительное расстройство или риск его развития. В другом варианте осуществления лечение также предназначено для включения нанесения или введения фармацевтической композиции, содержащей молекулу, связывающую антитело к SEMA4D, молекулу, связывающую антитело к плексину-B1 или их комбинацию, например, антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, как описано в настоящей заявке, пациенту, причем у пациента имеется нейровоспалительное заболевание или риск его развития. Следует понимать, что вследствие взаимодействия SEMA4D с рецептором на эндотелиальных клетках, ожидается, что нанесение или введение молекулы, связывающей антитело к SEMA4D, молекулы, связывающей антитело к плексину-B1 или их комбинации происходит на стороне крови гематоэнцефалического барьера. Путем введения молекулы, связывающей антитело к SEMA4D, молекулы, связывающей антитело к плексину-B1, или их комбинации путем, который подвергает их воздействию на стороне крови, например, включая без ограничения внутривенное введение, молекула, связывающая антитело к SEMA4D, молекула, связывающая антитело к плексину-B1, или их комбинация получат возможность ингибировать взаимодействие SEMA4D с рецептором SEMA4D, который экспрессируется эндотелиальными клетками.

Молекулы, связывающие антитело к SEMA4D, молекулы, связывающие антитело к плексину-B1, или их комбинация, например, антитело или его антигенсвязывающие фрагменты, как описано в настоящей заявке, полезны для лечения различных нейровоспалительных расстройств. В некоторых вариантах осуществления лечение нейровоспалительного расстройства предназначено для включения снижения или уменьшения проницаемости BBB. В других вариантах осуществления лечение нейровоспалительного расстройства предназначено для включения увеличения сопротивления BBB. В других вариантах осуществления лечение нейровоспалительного расстройства предназначено для включения увеличения числа, плотности и/или концентрации эндотелиальных клеток, присутствующих на BBB. В других вариантах осуществления лечение нейровоспалительного расстройства предназначено для включения изменения морфологии или функции эндотелиальных клеток или взаимодействий между эндотелиальными клетками или астроцитами или между эндотелиальными клетками и астроцитами, которые образуют BBB.

В одном из вариантов осуществления изобретение относится к применению молекул, связывающих антитело к SEMA4D, молекул, связывающих антитело к плексину-B1 или их комбинации, например, антител или их антигенсвязывающих фрагментов, вариантов или производных, в качестве лекарственного препарата, в частности, для применения при лечении или профилактике нейровоспалительных расстройств для ингибирования, снижения, предотвращения или минимизации разрушения в BBB или увеличения проницаемости BBB.

В соответствии со способами по настоящему изобретению по меньшей мере одна молекула, связывающая антитело к SEMA4D или молекула, связывающая антитело к плексину-B1, например, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, вариант или производное, как определено в других разделах настоящего описания, может применяться для содействия положительной терапевтической реакции в отношении нейровоспалительного расстройства. Термин «положительная терапевтическая реакция» в отношении нейровоспалительного расстройства предназначен для улучшения состояния имеющего заболевание пациента в связи с противовоспалительной активностью, противоапоптозной активностью или

тому подобных свойств этих антител и/или ослабление симптомов, связанных с заболеванием. То есть, могут наблюдаться антипролиферативный эффект, предотвращение дальнейшей пролиферации клеток, экспрессирующих SEMA4D, уменьшение воспалительной реакции, включая без ограничения сниженную секрецию воспалительных цитокинов, адгезионных молекул, протеаз, иммуноглобулинов (в случаях, когда клетка, несущая SEMA4D, представляет собой В клетку), их комбинации и тому подобные, повышенную продукцию противовоспалительных белков, уменьшение числа аутореактивных клеток, увеличение иммунной толерантности, ингибирование выживания аутореактивных клеток, уменьшение апоптоза, снижение миграции эндотелиальных клеток, увеличение спонтанной миграции моноцитов, снижение и/или уменьшение одного или нескольких симптомов, опосредованных стимуляцией sSEMA4D, или экспрессирующих SEMA4D клеток. Такие положительные терапевтические реакции не ограничиваются путем введения и могут включать введение донору, в донорскую ткань (такое как, например, перфузия органа), хозяину, любую их комбинацию и тому подобные. В частности, способы по настоящему изобретению направлены на ингибирование, предотвращение, снижение, облегчение или уменьшение развития нейровоспалительного расстройства у пациента. Таким образом, например, улучшение состояния пациента, страдающего заболеванием, может характеризоваться как отсутствие клинически наблюдаемых симптомов, уменьшение проницаемости BBB, увеличение числа, плотности или концентрации эндотелиальных клеток, присутствующих на BBB, изменение морфологии и функции эндотелиальных клеток или изменение взаимодействий между эндотелиальными клетками и перицитами или астроцитами или между эндотелиальными клетками, перицитами и астроцитами, которые образуют BBB.

Изменения проницаемости BBB можно измерить, используя модели *in vitro*. В определенных вариантах осуществления можно использовать динамическую модель *in vitro* DIV-BBB. Cucullo et al. представили модель DIV-BBB, составленную из микрососудистых эндотелиальных клеток мозга здорового взрослого человека и астроцитов взрослого человека для исследования того, как гемодинамические изменения и системное воспаление воздействуют на целостность микрососудистой системы мозга. В частности, в этой модели используется кассета или полая трубка для представления гематоэнцефалического барьера, причем внутренняя поверхность кассеты представляет сторону крови гематоэнцефалического барьера, а наружная поверхность кассеты представляет сторону мозга гематоэнцефалического барьера. Внутренняя поверхность кассеты выстлана микрососудистыми эндотелиальными клетками мозга здорового взрослого человека, а наружная поверхность выстлана астроцитами взрослого человека. По мере того как модифицирующий гематоэнцефалический барьер, такой как SEMA4D, вводится в просвет кассеты, электрический ток между внутренним пространством и наружной поверхностью трубки контролируется с использованием описанного ниже измерения трансэндотелиального электрического сопротивления. Один из вариантов осуществления этой модели характеризуется новизной наличия транскapиллярных микроотверстий для обеспечения возможности трансэндотелиального прохождения клеток между сосудистым и паренхимальным компартментом. Подробное описание используемой модели DIV-BBB *in vitro* и получение и культивирование микрососудистых эндотелиальных клеток и взрослых астроцитов человека можно найти, например, в публикациях Cucullo et al., *Brain Research*. 951 243-254 (2002) и Cucullo et al., *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*. 2:767-77 (2011). Следует понимать, что специалистам в данной области известно, что другие модели BBB были описаны и с пользой применяются для исследований роли BBB при патологии на уровне техники, и что настоящее описание не должно ограничиваться никакой определенной моделью.

Проницаемость BBB можно контролировать, используя измерение трансэндотелиального электрического сопротивления (TEER). TEER используется для мониторинга целостности BBB в реальном масштабе времени, которая, как было показано, коррелируется с проницаемостью BBB. Система TEER использует электронное уплотнение для измерения множества кассет подряд и быстрой и надежной оценки целостности и жизнеспособности биологов тканевой культуры (Cucullo et al., 2002; Cucullo et al., 2010; Santaguida et al., 2006). При работе, система подает возбуждающее напряжение (0,06 В) через возбуждающие электроды, вставленные в каждую кассету, в просветный и внепросветный отсеки. Микроконтроллер рассчитывает удельное электрическое сопротивление и электрическую емкость (на см<sup>2</sup>) барьера по физическим параметрам. Величины электрической емкости рассчитываются сравнением формы волн напряжения и тока. Задержка от пика до пика двух сигналов пропорциональна величине электрической емкости, которая выражена в виде дугового напряжения. TEER можно измерять от начальной установки в течение всего хода каждого эксперимента.

Молекулы, связывающие антитела к SEMA4D, молекулы, связывающие антитела к плексину-B1, или их комбинация, например, антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, варианты или производные, могут применяться в комбинации по меньшей мере с одним или несколькими другими средствами лечения по поводу нейровоспалительных расстройств; где дополнительное терапевтическое средство вводится до, во время или после молекулы, связывающей антитело к SEMA4D, молекулы, связывающей антитело к плексину-B1, или их комбинации, например, терапия антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, вариантом или производным. Таким образом, когда комбинированные способы лечения включают введение молекулы, связывающей антитело к SEMA4D, молекулы, связывающей антитело к плексину-B1, или их комбинации, например, антитела или его антигенсвязывающего фрагмента,

варианта или производного, в комбинации с введением другого терапевтического средства, то способы по изобретению включают совместное введение с использованием отдельных препаративных форм или одной фармацевтической препаративной формы с одновременным или последовательным введением в любом порядке.

#### VI. Фармацевтические композиции и способы введения

Способы получения и введения молекул, связывающих антитело к SEMA4D, молекул, связывающих антитело к плексину-B1, или их комбинации, например, антитела или его антигенсвязывающих фрагментов, вариантов или производных нуждающемуся в этом индивиду, хорошо известны или могут быть легко определены специалистами в данной области. Путь введения молекул, связывающих антитело к SEMA4D, молекул, связывающих антитело к плексину-B1, или их комбинации, например, антитела или его антигенсвязывающих фрагментов, вариантов или производных, может быть, например, пероральным, парентеральным, путем ингаляции или местным. Используемый в настоящей заявке термин "парентеральное" включает, например, внутривенное, внутриартериальное, внутрибрюшинное, внутримышечное, подкожное, ректальное или вагинальное введение. Хотя ясно, что все эти формы введения предусмотрены как входящие в объем изобретения, примером формы для введения был бы раствор для инъекций, в частности, для внутривенной или внутриартериальной инъекции или закапывания. Подходящая фармацевтическая композиция для инъекции может содержать буфер (например, ацетатный, фосфатный или цитратный буфер), поверхностно-активное вещество (например, полисорбат), необязательно, стабилизирующее средство (например, альбумин человека) и т.п. Однако в других способах, совместимых с положениями настоящего изобретения, молекулы, связывающие антитело к SEMA4D, молекулы, связывающие антитело к плексину-B1, или их комбинация, например, антитела, или их антигенсвязывающие фрагменты, варианты или производные, могут доставляться непосредственно в участок нежелательной клеточной популяции, посредством этого увеличивая воздействие терапевтического средства на пораженную ткань.

Как обсуждается в настоящем описании, молекулы, связывающие антитело к SEMA4D, молекулы, связывающие антитело к плексину-B1, или их комбинация, например, антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, варианты или производные, могут вводиться в фармацевтически эффективном количестве для лечения *in vivo* нейровоспалительных расстройств. В этом отношении, следует понимать, что описанные связывающие молекулы могут быть включены в состав с тем, чтобы облегчить введение и содействовать устойчивости активного средства. В определенных вариантах осуществления фармацевтические композиции в соответствии с настоящим изобретением содержат фармацевтически приемлемый, нетоксичный, стерильный носитель, такой как физиологический солевой раствор, нетоксичные буферы, консерванты и тому подобные. В целях настоящей заявки, фармацевтически эффективное количество молекулы, связывающей антитело к SEMA4D, молекулы, связывающей антитело к плексину-B1, или их комбинации, например, антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, варианта или производного, следует понимать как обозначающее количество, достаточное для достижения эффективного связывания с мишенью для достижения благоприятного эффекта, например, для уменьшения проницаемости BBB у пациента с нейровоспалительным расстройством.

Фармацевтические композиции, применяемые в настоящем изобретении, содержат фармацевтически приемлемые носители, включающие, например, ионообменные материалы, глинозем, стеарат алюминия, лецитин, сывороточные белки, такие как сывороточный альбумин человека, буферные вещества, такие как фосфаты, глицин, сорбиновая кислота, сорбат калия, частичные глицеридные смеси насыщенных растительных жирных кислот, вода, соли или электролиты, такие как протамина сульфат, динатрия гидрофосфат, гидрофосфат калия, хлорид натрия, соли цинка, коллоидный диоксид кремния, трисиликат магния, поливинилпирролидон, вещества на основе целлюлозы, полиэтиленгликоль, натрия карбоксиметилцеллюлоза, полиакрилаты, воски, блокполимеры полиэтилена и полиоксипропилена, полиэтиленгликоль и ланолин.

Препараты для парентерального введения включают стерильные водные или неводные растворы, суспензии и эмульсии. Примерами неводных растворителей являются пропиленгликоль, полиэтиленгликоль, растительные масла, такие как оливковое масло, и инъекционные органические сложные эфиры, такие как этилолеат. Водные носители включают, например, воду, спиртовые/водные растворы, эмульсии или суспензии, включая солевые и забуференные среды. В обсуждаемом изобретении, фармацевтически приемлемые носители включают без ограничения 0,01-0,1М и предпочтительно 0,05М фосфатного буфера или 0,8% солевого раствора. Другие обычные парентеральные носители включают растворы фосфата натрия, декстрозу Рингера, декстрозу и хлорид натрия, раствор Рингера лактата или фиксированные масла. Внутривенные носители включают средства, восполняющие запасы жидкости и питательных веществ, средства, восполняющие запасы электролитов, такие как средства на основе декстрозы Рингера, и тому подобные. Могут также присутствовать консерванты и другие добавки, такие как, например, противомикробные средства, антиоксиданты, хелатообразующие агенты и инертные газы и тому подобные.

Конкретно, фармацевтические композиции, подходящие для инъекционного применения, включают стерильные водные растворы (при растворимости в воде) или дисперсии и стерильные порошки для по-

лучения непосредственно перед введением стерильных растворов или суспензий для инъекций. В таких случаях композиция должна быть стерильной и должна быть текучей в такой степени, чтобы обеспечивалась возможность легкого введения через шприц. Она должна быть устойчивой в условиях получения и хранения и предпочтительно защищена против загрязняющего действия микроорганизмов, таких как бактерии и грибы. Носитель может представлять собой растворитель или дисперсионную среду, содержащую, например, воду, этанол, полиол (например, глицерин, пропиленгликоль и жидкий полиэтиленгликоль, и тому подобные), и их пригодные смеси. Должную текучесть можно поддерживать, например, использованием покрытия, такого как лецитин, поддержанием требуемого размера частиц в случае дисперсии и путем использования поверхностно-активных веществ. Пригодные препаративные формы для применения в способах лечения по настоящему изобретению, описаны в руководстве Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Publishing Co.) 16th ed. (1980).

Предотвращение действия микроорганизмов может быть достигнуто различными антибактериальными и противогрибковыми средствами, например, парабенами, хлорбутанолом, фенолом, аскорбиновой кислотой, тимеросалом и тому подобными. Во многих случаях предпочтительно включение в композицию изотонических агентов, например, Сахаров, полиспиртов, таких как маннит, сорбит или хлорид натрия. Продолжительное всасывание инъектируемых композиций может осуществляться включением в композицию агента, который задерживает всасывание, например, моностеарата алюминия и желатина.

В любом случае, стерильные инъектируемые растворы могут быть получены включением активного соединения (например, антитела к SEMA4D или его антигенсвязывающего фрагмента, варианта или производного отдельно или в комбинации с другими активными средствами) в требуемом количестве в соответствующем растворителе при необходимости с одним или комбинацией перечисленных в настоящей заявке ингредиентов, с последующей фильтрационной стерилизацией. В целом, дисперсии получают включением активного соединения а стерильный носитель, который содержит основную дисперсионную среду и требуемые другие ингредиенты из тех, которые перечислены выше. В случае стерильных порошков для получения стерильных растворов для инъекций, предпочтительными способами получения являются вакуумная сушка и сублимация, которая обеспечивает выход порошка активного ингредиента плюс любой дополнительный желательный ингредиент из его предварительно подвергнутого стерилизационной фильтрации раствора. Препараты для инъекций обрабатывают, заполняют в контейнеры, такие как ампулы, мешочки, флаконы, шприцы или склянки, и герметично укупоривают в асептических условиях в соответствии со способами, известными в данной области. Кроме того, препараты могут упаковываться и продаваться в виде набора. Такие изделия могут иметь этикетки или упаковочные вкладыши, указывающие на то, что связанные композиции полезны для лечения индивида, страдающего или predisposed к развитию заболевания или расстройства.

Парентеральные препаративные формы могут представлять собой одну болюсную дозу, инфузионную или ударную болюсную дозу с последующей поддерживающей дозой. Эти композиции можно вводить через определенные фиксированные или меняющиеся интервалы, например, один раз в день или на основе принципа "по необходимости".

Определенные фармацевтические композиции, применяемые в настоящем изобретении, можно вводить перорально в приемлемой лекарственной форме, включающей, например, капсулы, таблетки, водные суспензии или растворы. Определенные фармацевтические композиции можно также вводить назальным аэрозолем или ингаляцией. Такие композиции могут быть получены в виде солевых растворов с использованием бензилового спирта или других подходящих консервантов, стимуляторов всасывания для усиления биодоступности и/или других обычных солюбилизующих или диспергирующих средств.

Количество молекулы, связывающей антитело к SEMA4D, молекулы, связывающей антитело к плексину-B1, или их комбинации, например, антитела или его фрагмента, варианта или производного, подлежащее объединению с материалами носителя, для получения одной лекарственной формы, варьируется в зависимости от получающего лечение хозяина и конкретного пути введения. Композицию можно вводить в виде одной дозы, множественных доз или в течение установленного периода времени при инфузии. Схемы введения можно также подобрать для обеспечения оптимального желаемого ответа (например, терапевтического или профилактического ответа).

В соответствии с объемом настоящего описания, антитела к SEMA4D или их антигенсвязывающие фрагменты, варианты или производные можно вводить человеку или другому животному в соответствии с указанными выше способами лечения в количестве, достаточном для получения терапевтического эффекта. Антитела к SEMA4D или их антигенсвязывающие фрагменты, варианты или производные можно вводить такому человеку или другому животному в обычной лекарственной форме, полученной объединением антителом по изобретению с обычным фармацевтически приемлемым носителем или разбавителем в соответствии с известными методами. Специалисту в данной области понятно, что форма и характер фармацевтически приемлемого носителя или разбавителя определяется количеством активного ингредиента, с которым его предстоит объединить, пути введения и других хорошо известных переменных факторов. Специалистам в данной области, кроме того, понятно, что можно использовать смесь, включающую один или несколько видов молекул, связывающих антитело к SEMA4D, молекул, связывающих антитело к плексину-B1, или их комбинации, например, антител, или их антигенсвязывающих фрагмен-

тов, вариантов или производных по изобретению.

Под термином "терапевтически эффективная доза или количество" или "эффективное количество" подразумевается количество молекулы, связывающей антитело к SEMA4D, молекулы, связывающей антитело к плексину-B1, или их комбинации, например, антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, варианта или производного, которое при введении обеспечивает положительный терапевтический ответ в отношении лечения пациента с подлежащим лечению заболеванием, например, уменьшение проницаемости BBB, увеличение электрического сопротивления BBB, увеличение числа, плотности или концентрации эндотелиальных клеток, присутствующих на BBB, изменение морфологии или функции эндотелиальных клеток или изменение взаимодействий между эндотелиальными клетками или астроцитами или между эндотелиальными клетками и астроцитами, которые образуют BBB.

Терапевтически эффективные дозы композиций по настоящему изобретению для уменьшения проницаемости BBB варьируются в зависимости от многих различных факторов, включая средство введения, мишеневый участок, физиологическое состояние пациента, то, является ли пациент человеком или животным, других вводимых медикаментозных средств и того, является ли лечение профилактическим или терапевтическим. В определенных вариантах осуществления пациент представляет собой человека, но, кроме человека, можно также лечить других млекопитающих, включая трансгенных млекопитающих. Дозировки для лечения можно титровать, используя обычные способы, известные специалистам в данной области, для оптимизации безопасности и эффективности.

Количество по меньшей мере одной молекулы, связывающей антитело к SEMA4D, молекулы, связывающей антитело к плексину-B1, или их комбинации, например, антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, варианта или производного, подлежащее введению, легко определяется средним специалистом в данной области без ненужного экспериментирования, принимая во внимание описание настоящего изобретения. Факторы, влияющие на путь введения и соответствующее количество по меньшей мере одной молекулы, связывающей антитело к SEMA4D, молекулы, связывающей антитело к плексину-B1, или их комбинации, например, антитела, его антигенсвязывающего фрагмента, варианта или производного, включают без ограничения тяжесть заболевания, анамнез заболевания, и возраст, рост, массу тела, состояние здоровья и физическое состояние индивида, подвергающегося лечению. Аналогичным образом, количество молекулы, связывающей антитело к SEMA4D, молекулы, связывающей антитело к плексину-B1, или их комбинации, например, антитела или его фрагмента, варианта или производного, подлежащее введению, зависит от пути введения и от того, будет ли индивид подвергнут лечению одной дозой или множеством доз данного средства.

Изобретение также относится к применению молекулы, связывающей антитело к SEMA4D, молекулы, связывающей антитело к плексину-B1, или их комбинации, например, антитела по изобретению, или его антигенсвязывающего фрагмента, варианта или производного, при получении лекарственного препарата для лечения индивида по поводу нейровоспалительного расстройства, причем лекарственный препарат применяется у индивида, который предварительно получал по меньшей мере одно другое лечение. Под термином "предварительно получал лечение" или "предварительное лечение" подразумевается, что индивид получал одно или несколько других видов лечения (например, получал по меньшей мере одно другое лечение по поводу нейровоспалительного расстройства) перед получением лекарственного препарата, содержащего молекулу, связывающую антитело к SEMA4D, молекулу, связывающую антитело к плексину-B1, или их комбинацию, например, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, вариант или производное. Термины "предварительно получал лечение" или "предварительное лечение" включают индивидов, которые получали лечение по меньшей мере одним другим средством в пределах 2 лет, в пределах 18 месяцев, в пределах 1 года, в пределах 6 месяцев, в пределах 2 месяцев, в пределах 6 недель, в пределах 1 месяца, в пределах 4 недель, в пределах 3 недель, в пределах 2 недель, в пределах 1 недели, в пределах 6 дней, в пределах 5 дней, в пределах 4 дней, в пределах 3 дней, в пределах 2 дней или даже в пределах 1 дня перед началом лечения лекарственным препаратом, содержащим молекулу, связывающую антитело к SEMA4D, например, описанное в настоящей заявке моноклональное антитело VX15/2503 или его антигенсвязывающий фрагмент, вариант или производное. Необязательно, чтобы индивид отвечал на предварительное лечение предыдущим терапевтическим средством или средствами. Таким образом, индивид, который получает лекарственный препарат, содержащий молекулу, связывающую антитело к SEMA4D, молекулу, связывающую антитело к плексину-B1, или их комбинацию, например, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, вариант или производное, мог бы отвечать или не отвечать на предварительное лечение предыдущим терапевтическим средством, или на один или несколько курсов предварительного лечения, где предварительное лечение включает множество терапевтических средств.

Пока нет других указаний, при осуществлении настоящего изобретения можно использовать обычные методы клеточной биологии, культивирования клеток, молекулярной биологии, трансгенной биологии, микробиологии, рекомбинантной ДНК и иммунологии, которые приняты в данной области. Такие методы полностью описаны в литературе. См., например, 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 и II; Gait, ed. (1984) *Oligonucleotide Synthesis*; Mullis et al. патент США № 4683195; 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*; the treatise, *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 и 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); и в Ausubel et al. (1989) *Current Protocols in Molecular Biology* (John Wiley and Sons, Baltimore, Md.).

Общие принципы конструирования антител изложены в руководстве Borrebaeck, ed. (1995) *Antibody Engineering* (2nd ed.; Oxford Univ. Press). Общие принципы конструирования белков изложены в руководстве Rickwood et al., eds. (1995) *Protein Engineering, A Practical Approach* (IRL Press at Oxford Univ. Press, Oxford, Eng.). Общие принципы связывания антител и антигена-гаптена изложены в руководствах: Nisonoff (1984) *Molecular Immunology* (2nd ed.; Sinauer Associates, Sunderland, Mass.); и Steward (1984) *Antibodies, Their Structure and Function* (Chapman and Hall, New York, N.Y.). Кроме того, в целом соблюдаются стандартные способы, принятые в иммунологии, которые известны в данной области, и конкретно не описаны в настоящей заявке, такие как изложенные в руководствах *Current Protocols in Immunology*, John Wiley & Sons, New York; Stites et al., eds. (1994) *Basic and Clinical Immunology* (8th ed; Appleton & Lange, Norwalk, Conn.) и Mishell and Shiigi (eds) (1980) *Selected Methods in Cellular Immunology* (W.H. Freeman and Co., NY).

Стандартные эталонные работы, в которых изложены общие принципы иммунологии, включают руководства *Current Protocols in Immunology*, John Wiley & Sons, New York; Klein (1982) J., *Immunology: The Science of Self-Nonself 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 и Dveksler (2003) *PCR Primer* (Cold Spring Harbor Press).

Все приведенные выше источники, а также все ссылки, приведенные в настоящем описании, включены в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме.

Следующие примеры представлены в качестве иллюстрации, а не в виде ограничения.

#### Примеры

Следующие примеры демонстрируют эффективность антитела к SEMA4D (VX15/2503) при уменьшении или предотвращении разрушения BBB, т.е. уменьшении проницаемости BBB на модели DIV-BBB *in vitro*, а также на модели EAE *in vivo*. Эксперимент на модели болезни Альцгеймера *in vivo* также описан в настоящей заявке. Подробное описание модели DIV-BBB *in vitro* можно найти, например, в публикациях Cucullo et al., *Brain Research*. 951 243-254 (2002); и Cucullo et al., *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*. 1-11 (2010). Модели EAE и болезни Альцгеймера *in vivo* описаны, например, в публикациях Miller et al., *Curr Protoc Immunol*. CHAPTER: Unit-15.1, 2007; Colton et al., *J Alzheimer's Dis* 15:571-587, 2008 и Wilcock et al., *J. Neuroscience*, 29:7957-7965, 2009 соответственно.

Пример 1. Испытание способности молекулы, связывающей антитело к SEMA4D, например, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, вариант или производное, например, VX15/2503, восстанавливать целостность BBB после вызванного SEMA4D разрушения BBB на модели DIV-BBB *in vitro*

Структура эксперимента. Динамическую модель BBB *in vitro* ("DIV-BBB") использовали для исследования воздействия рекомбинантного SEMA4D человека (huSEMA4D-his) и VX15/2503 (подробно описанных в заявке на патент США № 2010/0285036 A1, полностью включенной в настоящее описание путем ссылки) на целостность BBB. Две кассеты DIV-BBB испытывали на данной модели. Основная структура эксперимента показана на фиг. 1. Повышенные концентрации рекомбинантного SEMA4D (rSEMA4D) добавляли в просвет через 12-часовые интервалы, предоставляя возможность уравнивания (приблизительно 12 ч/концентрацию). rSEMA4D первоначально добавляли в просвет в концентрации 0,05 мкг/мл во время 0. Концентрацию rSEMA4D увеличивали в 10 раз через каждый интервал, например, 0,5 мкг/мл через 12 ч, 5 мкг/мл через 24 ч и 50 мкг/мл через 36 ч. Измерения TEER производили между каждым интервалом как отражение изменений проницаемости BBB при варьирующихся концентрациях rSEMA4D. После добавления конечной дозы rSEMA4D в концентрации 50 мкг/мл через 36 ч, VX15/2503 добавляли в просвет в концентрации 250 мкг/мл через 48 ч. Через 72 ч, т.е. через 24 ч после добавления VX15/2503, снова измеряли проницаемость BBB.

Измерение трансэндотелиального электрического сопротивления (TEER) использовали для мониторинга целостности BBB в реальном масштабе времени. Как указано выше, в системе TEER использу-

ется электронное уплотнение для измерения множества кассет подряд и быстрой и надежной оценки целостности и жизнеспособности бислоев культуры ткани (Cucullo et al., 2002; Santaguida et al., 2006). На этой динамической модели *in vitro* кассеты или полые трубки были установлены для представления гематоэнцефалического барьера, причем внутренняя часть кассеты представляет кровяную сторону гематоэнцефалического барьера, а наружная часть кассеты представляет мозговую сторону гематоэнцефалического барьера. Внутренняя поверхность кассеты была выстлана эндотелиальными клетками микрососудов мозга взрослого человека, а наружная поверхность была выстлана астроцитами взрослого человека. По мере того как агент, модифицирующий гематоэнцефалический барьер, такой как SEMA4D, вносили в просвет кассеты, производили мониторинг электрического тока между внутренней и наружной поверхностями трубки, используя TEER. При работе, система TEER подает возбуждающее напряжение (0,06 В) через возбуждающие электроды, вставленные в каждую кассету, в просветный и внепросветный отсеки. Микроконтроллер рассчитывает удельное электрическое сопротивление и электрическую емкость (на см<sup>2</sup>) барьера по физическим параметрам. Величины электрической емкости рассчитываются сравнением формы волн напряжения и тока. Задержка от пика до пика двух сигналов пропорциональна величине электрической емкости, которая выражена в виде дугового напряжения. TEER измеряли от начальной установки в течение всего хода каждого эксперимента.

Вызванное rSEMA4D увеличение проницаемости BBB. После образования BBB, воздействие rSEMA4D на целостность BBB измеряли добавлением увеличивающихся концентраций рекомбинантного SEMA4D (rSEMA4D) в просвет двух кассет. rSEMA4D первоначально добавляли в просвет в концентрации 0,05 мкг/мл во время 0. Концентрацию rSEMA4D увеличивали в 10 раз через каждый 12-часовой интервал, например, 0,5 мкг/мл через 12 ч, 5 мкг/мл через 24 ч и 50 мкг/мл через 36 ч. Измерения TEER производили между интервалами и в течение каждого интервала как отражение изменений проницаемости BBB при варьирующихся концентрациях rSEMA4D. В целом, проницаемость BBB оставалась относительно устойчивой при концентрации rSEMA4D 0,05 мкг/мл. Начиная в концентрации 0,5 мкг/мл, увеличение концентраций rSEMA4D (т.е. 0,5 мкг/мл, 5 мкг/мл и 50 мкг/мл) привело к уменьшению показателя TEER, отражая повышенную проницаемость слоя эндотелиальных клеток. Эти результаты показаны на фиг. 2.

Вызванное антителом уменьшение проницаемости BBB, обработанного rSEMA4D. Для измерения воздействия антитела к SEMA4D на BBB после воздействия повышающихся дозировок rSEMA4D, добавляли VX15/2503 в концентрации 250 мкг/мл через 48 ч. Измерения TEER проводили через 72 ч. Обработка VX15/2503 привела к общему уменьшению проницаемости (или увеличению удельного электрического сопротивления) BBB в двух кассетах. Это уменьшение проницаемости отражает восстановление BBB. Результаты показаны на фиг. 2.

Пример 2. Испытание способности молекулы, связывающей антитело к SEMA4D, например, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, вариант или производное, например, VX15/2503, для восстановления целостности BBB после вызванного SEMA4D разрушения BBB на модели DIV-BBB *in vitro*

Структура эксперимента. Второй эксперимент с использованием модели DIV-BBB *in vitro* выполняли для исследования воздействия SEMA4D и VX15/2503 на целостность BBB. Основная экспериментальная структура была подобной той, которая показана выше в примере 1 и на фиг. 1. В течение двух недель кассеты DIV-BBB подвергались образованию BBB в компартментах эндотелиальных и астроцитарных клеток. Образование BBB, отраженное в TEER, показано на фиг. 3 и 4.

Вызванное rSEMA4D увеличение проницаемости BBB. После образования BBB воздействие rSEMA4D на целостность BBB измеряли добавлением возрастающих концентраций рекомбинантного SEMA4D (rSEMA4D) в просвет первой кассеты набора из трех кассет через 12-часовые интервалы, предоставляя возможность уравнивания (приблизительно 12 ч/концентрацию). rSEMA4D первоначально добавляли в просвет в концентрации 0,5 мкг/мл во время 0. Концентрацию rSEMA4D увеличивали в 10 раз через каждый интервал, например, 5 мкг/мл через 12 ч и 50 мкг/мл через 24 ч. Измерения TEER проводили между каждым интервалом как отражение изменений проницаемости BBB в варьирующихся концентрациях rSEMA4D. В целом, увеличивающиеся концентрации rSEMA4D привели к уменьшению показателей TEER, отражая увеличенную проницаемость BBB. Эти результаты показаны на фиг. 3.

Для испытания целостности BBB в присутствии антигена, который не нацелен на слой эндотелиальных клеток, аналогичным образом полученный рекомбинантный белковый контроль (CTRL, белок C35) добавляли в эквивалентных концентрациях через такие же 12-часовые интервалы (т.е. 0,25 мкг/мл во время 0, 2,5 мкг/мл через 12 ч и 25,0 мкг/мл через 24 ч) в две дополнительные контрольные кассеты. В отличие от воздействия rSEMA4D, белок CTRL не вызывал значительное изменение TEER, отражающее отсутствие значимого изменения проницаемости BBB. Однако если добавляли 50,0 мкг/мл rSEMA4D через 12 ч после добавления самой высокой концентрации белка CTRL, было вызвано быстрое уменьшение TEER, подобное тому, которое наблюдали при повышающихся дозах rSEMA4D. Результаты показаны на фиг. 4.

Вызванное антителом уменьшение проницаемости BBB, обработанного rSEMA4D. После добавления конечной дозы rSEMA4D в концентрации 50,0 мкг/мл через 24 ч измеряли воздействие VX15/2503 на TEER и проницаемость BBB. Как показано на фиг. 3, антитело VX15/2503 добавляли в концентрации 250

мкг/мл через 36 ч в две из трех кассет, в которые вводили возрастающие дозы rSEMA4D, в то время как одинаковую концентрацию изотипического контрольного антитела добавляли в одну остающуюся кассету, в которую вводили возрастающие дозы rSEMA4D. Измерения TEER производили в различные последующие точки времени. Обработка VX15/2503 привела к увеличению TEER обратно до пиковых уровней в начале эксперимента, отражая общее уменьшение проницаемости BBB (т.е. восстановление BBB). В одной кассете, в которую вводили изотипическое контрольное антитело, показатели содержания TEER оставались на относительно сниженных уровнях, вызванных обработкой rSEMA4D, указывая на отсутствие значимого уменьшения проницаемости BBB. Подобные результаты показаны на фиг. 4. Как показано на фиг. 4, антитело VX15/2503 добавляли в концентрации 250 мкг/мл через 48 ч в две кассеты, в которые первоначально вводили контрольный рекомбинантный белок C35, с последующим введением 50 мкг/мл rSEMA4D в течение 12 ч. Обработка VX15/2503 привела к увеличению TEER обратно до пиковых уровней в начале эксперимента, отражая общее уменьшение проницаемости BBB (т.е. восстановление BBB).

Пример 3. Испытание способности молекулы, связывающей антитело против плексина-B1, например, антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, варианта или производного, восстановить целостность BBB после вызванного SEMA4D разрушения BBB на модели DIV-BBB *in vitro*

Другое исследование проводили для измерения воздействий антитела к плексину-B1 (MAB37491, MAb к плексину-B1 человека (клон 559830), R&D Systems) на целостность BBB. Это антитело блокирует связывание SEMA4D с рецептором плексина-B1. Результаты данного исследования показаны на фиг. 5. Как показано на фиг. 5, человеческие эндотелиальные клетки и астроциты в четырех кассетах DIV-BBB подвергали образованию BBB, подобно описанным выше экспериментам. После образования BBB добавляли rSEMA4D в концентрации 50 мкг/мл, вызывая увеличение проницаемости BBB (т.е. разрушение BBB). После добавления rSEMA4D, добавляли антитело к плексину-B1 в концентрации 125 мкг/мл через 6 ч в две из четырех кассет, антитело VX15/2503 добавляли в концентрации 250 мкг/мл в одну из четырех кассет, и изотипическое контрольное антитело добавляли в концентрации 250 мкг/мл в остающуюся кассету. Измерения TEER проводили в различные последующие точки времени. Обработка или VX15/2503, или антителом к плексину-B1 привела к увеличению уровней TEER обоими агентами. Обработка VX15/2503 привела к несколько большему увеличению TEER, чем обработка антителом к плексину-B1 в последнюю точку времени. Воздействие двух антител неразличимо во все другие точки времени. Увеличение TEER отражает общее уменьшение проницаемости BBB (т.е. восстановления BBB) в присутствии или VX15/2503, или антитела к плексину-B1. В одной кассете, в которую вводили изотипическое контрольное антитело, уровни TEER оставались на относительно сниженных уровнях, вызванных обработкой rSEMA4D, указывая на отсутствие значимого уменьшения проницаемости BBB. Следует понимать, что обработка может также проводиться с использованием комбинации VX15/2503 и антитела к плексину-B1.

Пример 4. Испытание способности молекулы, связывающей антитело к SEMA4D, например, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, вариант или производное, например, VX15/2503, восстановить целостность BBB после разрушения BBB, вызванного активированными PBMC и прекращением кровотока, на модели DIV-BBB *in vitro*

Структура эксперимента. Другой эксперимент с использованием модели DIV-BBB *in vitro* выполняли для исследования воздействия VX15/2503 на восстановление целостности BBB после разрушения BBB, вызванного активированными мононуклеарными клетками периферической крови (PBMC) и прекращением кровотока. В течение двух недель, две кассеты DIV-BBB подвергали образованию BBB в компартментах эндотелиальных и астроцитарных клеток.

Вызванное активированными PBMC увеличение проницаемости BBB. После образования BBB измеряли воздействие активированных PBMC на целостность BBB. PBMC активировали PMA (параметоксисамфетином)/иономицином в течение 2 ч и затем добавляли в количестве  $10^6$ /мл в просвет двух кассет. Измерения TEER проводили до и после добавления активированных PBMC как отражение изменений проницаемости BBB. В целом, добавление активированных PBMC в кассеты в количестве  $10^6$ /мл привело к снижению показателю TEER, отражающему повышенную проницаемость BBB. Эти результаты показаны на фиг. 6.

Приблизительно через 2-4 ч после добавления активированных PBMC в кассеты, выполняли прекращение потока на 1 ч. Измерения TEER проводили до и после прекращения потока как отражение изменений проницаемости BBB. В целом, прекращение потока привело к дальнейшему уменьшению показателя TEER, отражающего повышенную проницаемость BBB. Эти результаты также показаны на фиг. 6.

Вызванное антителом уменьшение проницаемости BBB, подверженного воздействию активированных PBMC. После воздействия активированных PBMC и прекращения потока измеряли эффект VX15/2503 на TEER и проницаемость BBB. Антитело VX15/2503 добавляли в концентрации 250 мкг/мл в одну из двух кассет, в которые вводили активированные PBMC, в то время как такую же концентрацию изотипического контрольного антитела (изотипический контрольный Ig, 2269) добавляли в остающуюся кассету. Измерения TEER проводили в различные последующие точки времени. Как показано на фиг. 6, обработка VX15/2503 привела к увеличению TEER обратно до пиковых уровней в начале эксперимента, отражая общее уменьшение проницаемости BBB (т.е. восстановление BBB). В кассете, в которую вводи-

ли изотипическое контрольное антитело, уровни TEER оставались на относительно сниженных уровнях, вызванных обработкой активированными PBMC и прекращением потока, указывая на отсутствие значимого уменьшения проницаемости BBB.

Пример 5. Испытание способности молекулы, связывающей антитело к SEMA4D, например, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, вариант или производное, например, VX15/2503, предохранить целостность BBB на модели EAE in vivo

Молекулы, связывающие антитело к SEMA4D, например, антитело или его антигенсвязывающие фрагменты, варианты или производные, например, VX15/2503, испытывали на модели экспериментального аутоиммунного энцефаломиелита (EAE) in vivo. Модель EAE in vivo, разрушения BBB, исследовали изучением изменений проницаемости мозга, по данным проникновения фибриногена из крови в паренхиму мозга и посредством исследования белков эндотелиальных плотных контактов, включая клаудин-5. На этой модели, EAE вызывали у мышей иммунизацией пептидом PLP (протеолипидного белка) (аминокислоты 139-151). Конечно, специалистам в данной области понятно, что также можно использовать другие белки, вызывающие EAE (например, миелиновый антиген, например, миелин-олигодендроцитарный гликопротеин пептид (аминокислоты 35-55)), и что для максимальной эффективности эти индуцирующие белки или пептиды могут варьироваться от одного вида к другому, и от одной линии мышей к другой (Steinman, L. Neuron 24:511-514 (1999)). Срезы ткани из центральной нервной системы (ЦНС) животных на разных стадиях заболевания затем подвергали иммуноокрашиванию на белки (фибриноген и клаудин-5, которые служат в качестве маркеров разрушения BBB).

Структура эксперимента. На модели EAE in vivo, EAE вызывали у мышей SJL/J в возрасте 12 недель (10 мышей на группу) иммунизацией PLP пептидом (аминокислоты 139-151) в CFA (полном адьюванте Фрейнда). Затем мышей лечили один раз в неделю от 7 дней после индукции 600 мкг антитела к SEMA4D (антитела VX15/2503) или контрольного IgG. Неврологические признаки сначала наблюдали через 11 дней после индукции (dpi). Через 13 дней после индукции, в течение острой фазы заболевания, 4 мышей на группу умерщвляли, и образцы поясничного отдела спинного мозга получали для патогистологического анализа. Для выявления разрушения BBB в образцах эти образцы подвергали иммуноокрашиванию на фибриноген и клаудин-5. Процедура иммуноокрашивания следующая: срезы дважды споласкивали в PBS (солевом растворе с фосфатным буфером), затем инкубировали в PBS с 0,1% глицина в течение 10 мин, блокировали в PBS с 0,3% Triton X-100, 10% козьей сывороткой в течение 1 ч, и инкубировали с первичным Ab в блокирующем буфере в течение ночи при 4°C. Для выявления клаудина-5 (CLN-5), перед блокировкой срезы вымачивали в EDTA (этилендиаминтетрауксусной кислоте), pH 8, 100°C.

Использованные первичные антитела представляли собой антитела к CLN-5 (цериодному нейронному липофусцину) (1:50) и к фибриногену (1:1000). После промывания три раза в PBS 0,3%, срезы Triton X-100 затем инкубировали в релевантных видоспецифичных вторичных антителах, конъюгированных с AlexaFluor 488 и/или AlexaFluor 594 (1/100; молекулярные зонды) в блокирующем буфере в течение 1 ч при 25°C, снова промывали три раза, и противоокрашивали 4,6-диамино-2-фенилиндолом (DAPI). Все образцы исследовали и фотографировали, используя лазерную сканирующую конфокальную систему Zeiss LSM 510 META, прикрепленную к инвертированному флуоресцентному микроскопу Axiovert 200.

Клинические признаки заболевания у мышей оценивали в баллах следующим образом: 0= отсутствие симптомов; 1= свисающий хвост; 2= слабость задних конечностей; 4= слабость передних и задних конечностей; 5= смерть. Неврологические признаки сначала наблюдали через 11 дней после индукции. У мышей, получавших лечение антителом VX1/2503, клинические признаки заболевания достигли средней балльной оценки тяжести 0,75, что указывает на легкую слабость хвостовой мускулатуры, в то время как клинически выраженное заболевание у мышей контрольной группы достигло средней балльной оценки тяжести 2,25, что указывает на наличие парализа.

Результаты иммуноокрашивания через 13 дней после индукции показаны на фиг. 7A-7C. Фибриноген в норме не проникает через гематоэнцефалический барьер (BBB). При EAE, когда разрушается BBB, окрашенный в зеленый цвет фибриноген выявляли в веществе мозга (левая панель). Кроме того, экспрессия клаудина-5 (CLN-5, красное окрашивание), компонента плотных контактов, которые составляют BBB, была снижена. У мышей в контрольной группе проявилась сниженная экспрессия клаудина-5 и повышенные уровни внесосудистой утечки фибриногена, которая коррелировалась с разрушением в BBB. С другой стороны, у мышей, получавших лечение антителом VX15/2503, экспрессия клаудина-5 сохранялась, и утечка фибриногена значительно снизилась. Эти результаты продемонстрировали защитный эффект антитела VX15/2503 против разрушения BBB у этих получавших лечение мышей, и, в частности, продемонстрировали, как антитело к SEMA4D предотвращает разрушение BBB, предотвращает внесосудистую утечку фибриногена (фиг. 7A, левая панель, и количественная характеристика на фиг. 7B), и сохраняет клаудин-5, как выявлено красным окрашиванием (фиг. 7A, правая панель, и количественная характеристика на фиг. 7C).

Пример 6. Воздействие SEMA4D на белки плотного контакта в культурах церебральных эндотелиальных клеток

Структура эксперимента. Исследовали экспрессию ключевого белка эндотелиальных плотных контактов клаудина-5 после обработки полученных из ЦНС эндотелиальных клеток рекомбинантным растворимым SEMA4D. На этой модели выделяли первичные эндотелиальные культуры центральной нервной системы мыши (ЦНС) и высевали на 6-луночный покрытый матриксом планшет (выделенные MBCEC из 10 мозгов ресуспендировали в 3 мл среды для первичной культуры эндотелиальных клеток и высевали в количестве 250 мкл на лунку). Культуры использовали через 7 дней после выделения. Культуры обрабатывали 1 нг/мл, 10 нг/мл или 100 нг/мл рекомбинантного SEMA4D мыши или 100 нг/мл VEGF-A мыши (положительный контроль) в течение 24 ч. Затем культуры эндотелиальных клеток животных подвергали электрофорезу на полиакриламидном геле с SDS (додецилсульфатом натрия) (SDS-PAGE) и иммуноблоттингу для выявления белка плотных контактов клаудина-5 и контроля нагрузки актином. Данные сканировали и подвергали денситометрии, используя программное обеспечение Image J (NIH).

Результаты иммуноблоттинга показаны на фиг. 8. Как показано на фиг. 8, культуры эндотелиальных клеток, обработанные 100 нг/мл рекомбинантного SEMA4D, проявили значительное снижение экспрессии белка клаудина-5. Культуры эндотелиальных клеток, обработанные 100 нг/мл VEGF-A, тестировали в качестве положительного контроля в отношении понижающей регуляции клаудина-5. Это демонстрирует важную роль SEMA4D в регуляции экспрессии ключевого белка плотных контактов BBB.

Пример 7. Испытание способности молекулы, связывающей антитело к SEMA4D или антитело к плексину-B1, например, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, вариант или производное, для уменьшения проницаемости BBB на модели болезни Альцгеймера (AD) *in vivo*

Антитела к SEMA4D или молекулы, связывающие антитела к плексину-B1, например, антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, варианты или производные, например, MAб 67 (подробно описанные в заявке на патент США № 2010/0285036 A1, включенной в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме), испытывали на различных модельных системах нейровоспалительных расстройств, включая без ограничения экспериментальную модель болезни Альцгеймера (AD) у трансгенных мышей *in vivo* APPSwDI/NOSC<sup>-/-</sup>. Этих мышей выводили скрещиванием мутантных мышей APP-Swedish-Dutch-Iowa с мышами с нокаутом синтазы 2 оксида азота (Colton et al., J Alzheimer's Dis.15:571-587, 2008; Van Nostrand et al., Stroke 41:S135-S138, 2010). У мышей APPSwDI/NOSC<sup>-/-</sup> развивается возрастной нейроvascularный амилоидоз с нарушенной функцией BBB, внутрипаренхиматозные амилоидные бляшки, гиперфосфорилирование тау-белка мыши, нейровоспаление, гибель нейронных клеток и когнитивные дефициты. Wilcock et al. показали, что лечение мышей APPSwDI/NOSC<sup>-/-</sup> активной иммунотерапией, направленной на амилоид-бета, ведет к выраженному снижению отложения амилоида, но с повышенной встречаемостью микрокровоизлияний (Wilcock et al., J Neurosci. 29:7957-7965, 2009).

На модели AD *in vivo* прогрессирование AD исследовали изучением иммуногистохимических сигнатур отложения амилоида, гиперфосфорилирование тау-белка, и утечку через BBB (фибриногена), а также оценкой когнитивных способностей в основанных на пространственной памяти поведенческих парадигмах. На этой модели трансгенным мышам внутривенно вводили MAб 67 или контрольный Ig (MAб 2B8) в концентрации 30 мг/кг с возраста 26 до 38 недель в общей сложности в количестве 13 доз.

Мышей первоначально подвергали исходному поведенческому тестированию в возрасте 10-12 недель, например, тестам в "открытом поле", Равена и в лабиринте Барнеса, и мышей, достигших критериев активности и обучения/памяти, включали в наблюдение. Поведенческие дефициты снова измеряли в возрасте 38, 39 и 40 недель и регистрировали массу тела. Мыши, которые не достигали критериев для включения в исследование, подлежали умерщвлению. В конечную точку, возраст 41 неделю, животные подлежали эвтаназии, и мозги должны были обрабатываться для биохимических и иммуногистохимических анализов на уровни и отложения растворимого и нерастворимого амилоида бета. Сыворотку собирают перед введением, во время введения и в конечную точку для изучения PK (фармакокинетики) в возрасте 10, 25 и 41 недели. Срезы ткани из центральной нервной системы (ЦНС) животных на различных стадиях заболевания могут подвергаться иммуноокрашиванию на фибриноген, которые могут использоваться в качестве маркеров разрушения BBB.

Множество модификаций и других вариантов осуществления изобретений, изложенных в настоящем описании, станут понятными специалистам в данной области, для которых предназначено настоящее изобретение, на основании положений предшествующего описания и прилагаемых чертежей. Поэтому, следует понимать, что изобретения не ограничиваются определенными раскрытыми вариантами осуществления и что модификации и другие варианты осуществления предназначены для включения в пределы объема прилагаемой формулы изобретения и перечень вариантов осуществления, описанных в настоящей заявке. Хотя в настоящем описании используются определенные термины, они используются в общем и описательном смысле, а не в целях ограничения.

Список последовательностей

<110> Vaccinex, Inc.  
SMITH, Ernest S.  
ZAUDERER, Maurice

<120> ПРИМЕНЕНИЕ МОЛЕКУЛ, СВЯЗЫВАЮЩИХ СЕМАФОРИН-4D, ДЛЯ МОДУЛЯЦИИ  
ПРОНИЦАЕМОСТИ ГЕМАТОЭНЦЕФАЛИЧЕСКОГО БАРЬЕРА

<130> 1843.068PC03/ЕЖН/ВNC

<140> Будет присвоен  
<141> Приложен

<150> US 61/593,641  
<151> 2012-02-01

<150> US 61/555,726  
<151> 2011-11-04

<150> US 61/545,809  
<151> 2011-10-11

<160> 40

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1  
<211> 862  
<212> Белок  
<213> Homo sapiens

<400> 1

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ala Cys Ile Asp Ser Glu Ala Arg Ala Ala Asn Tyr Thr Ser Ser Leu  
 370 375 380  
 Asn Leu Pro Asp Lys Thr Leu Gln Phe Val Lys Asp His Pro Leu Met  
 385 390 395 400  
 Asp Asp Ser Val Thr Pro Ile Asp Asn Arg Pro Arg Leu Ile Lys Lys  
 405 410 415  
 Asp Val Asn Tyr Thr Gln Ile Val Val Asp Arg Thr Gln Ala Leu Asp  
 420 425 430  
 Gly Thr Val Tyr Asp Val Met Phe Val Ser Thr Asp Arg Gly Ala Leu  
 435 440 445  
 His Lys Ala Ile Ser Leu Glu His Ala Val His Ile Ile Glu Glu Thr  
 450 455 460  
 Gln Leu Phe Gln Asp Phe Glu Pro Val Gln Thr Leu Leu Leu Ser Ser  
 465 470 475 480  
 Lys Lys Gly Asn Arg Phe Val Tyr Ala Gly Ser Asn Ser Gly Val Val  
 485 490 495  
 Gln Ala Pro Leu Ala Phe Cys Gly Lys His Gly Thr Cys Glu Asp Cys  
 500 505 510  
 Val Leu Ala Arg Asp Pro Tyr Cys Ala Trp Ser Pro Pro Thr Ala Thr  
 515 520 525  
 Cys Val Ala Leu His Gln Thr Glu Ser Pro Ser Arg Gly Leu Ile Gln  
 530 535 540  
 Glu Met Ser Gly Asp Ala Ser Val Cys Pro Asp Lys Ser Lys Gly Ser  
 545 550 555 560  
 Tyr Arg Gln His Phe Phe Lys His Gly Gly Thr Ala Glu Leu Lys Cys  
 565 570 575  
 Ser Gln Lys Ser Asn Leu Ala Arg Val Phe Trp Lys Phe Gln Asn Gly  
 580 585 590  
 Val Leu Lys Ala Glu Ser Pro Lys Tyr Gly Leu Met Gly Arg Lys Asn  
 595 600 605  
 Leu Leu Ile Phe Asn Leu Ser Glu Gly Asp Ser Gly Val Tyr Gln Cys  
 610 615 620  
 Leu Ser Glu Glu Arg Val Lys Asn Lys Thr Val Phe Gln Val Val Ala  
 625 630 635 640  
 Lys His Val Leu Glu Val Lys Val Val Pro Lys Pro Val Val Ala Pro  
 645 650 655  
 Thr Leu Ser Val Val Gln Thr Glu Gly Ser Arg Ile Ala Thr Lys Val  
 660 665 670  
 Leu Val Ala Ser Thr Gln Gly Ser Ser Pro Pro Thr Pro Ala Val Gln  
 675 680 685  
 Ala Thr Ser Ser Gly Ala Ile Thr Leu Pro Pro Lys Pro Ala Pro Thr  
 690 695 700  
 Gly Thr Ser Cys Glu Pro Lys Ile Val Ile Asn Thr Val Pro Gln Leu  
 705 710 715 720  
 His Ser Glu Lys Thr Met Tyr Leu Lys Ser Ser Asp Asn Arg Leu Leu  
 725 730 735  
 Met Ser Leu Phe Leu Phe Phe Phe Val Leu Phe Leu Cys Leu Phe Phe  
 740 745 750  
 Tyr Asn Cys Tyr Lys Gly Tyr Leu Pro Arg Gln Cys Leu Lys Phe Arg  
 755 760 765  
 Ser Ala Leu Leu Ile Gly Lys Lys Lys Pro Lys Ser Asp Phe Cys Asp  
 770 775 780  
 Arg Glu Gln Ser Leu Lys Glu Thr Leu Val Glu Pro Gly Ser Phe Ser  
 785 790 795 800  
 Gln Gln Asn Gly Glu His Pro Lys Pro Ala Leu Asp Thr Gly Tyr Glu  
 805 810 815  
 Thr Glu Gln Asp Thr Ile Thr Ser Lys Val Pro Thr Asp Arg Glu Asp  
 820 825 830  
 Ser Gln Arg Ile Asp Asp Leu Ser Ala Arg Asp Lys Pro Phe Asp Val  
 835 840 845  
 Lys Cys Glu Leu Lys Phe Ala Asp Ser Asp Ala Asp Gly Asp  
 850 855 860  
 <210> 2  
 <211> 861  
 <212> белок  
 <213> Murine sp.  
 <400> 2  
 Met Arg Met Cys Ala Pro Val Arg Gly Leu Phe Leu Ala Leu Val Val  
 1 5 10 15

Val Leu Arg Thr Ala Val Ala Phe Ala Pro Val Pro Arg Leu Thr Trp  
 20 25 30  
 Glu His Gly Glu Val Gly Leu Val Gln Phe His Lys Pro Gly Ile Phe  
 35 40 45  
 Asn Tyr Ser Ala Leu Leu Met Ser Glu Asp Lys Asp Thr Leu Tyr Val  
 50 55 60  
 Gly Ala Arg Glu Ala Val Phe Ala Val Asn Ala Leu Asn Ile Ser Glu  
 65 70 75 80  
 Lys Gln His Glu Val Tyr Trp Lys Val Ser Glu Asp Lys Lys Ser Lys  
 85 90 95  
 Cys Ala Glu Lys Gly Lys Ser Lys Gln Thr Glu Cys Leu Asn Tyr Ile  
 100 105 110  
 Arg Val Leu Gln Pro Leu Ser Ser Thr Ser Leu Tyr Val Cys Gly Thr  
 115 120 125  
 Asn Ala Phe Gln Pro Thr Cys Asp His Leu Asn Leu Thr Ser Phe Lys  
 130 135 140  
 Phe Leu Gly Lys Ser Glu Asp Gly Lys Gly Arg Cys Pro Phe Asp Pro  
 145 150 155 160  
 Ala His Ser Tyr Thr Ser Val Met Val Gly Gly Glu Leu Tyr Ser Gly  
 165 170 175  
 Thr Ser Tyr Asn Phe Leu Gly Ser Glu Pro Ile Ile Ser Arg Asn Ser  
 180 185 190  
 Ser His Ser Pro Leu Arg Thr Glu Tyr Ala Ile Pro Trp Leu Asn Glu  
 195 200 205  
 Pro Ser Phe Val Phe Ala Asp Val Ile Gln Lys Ser Pro Asp Gly Pro  
 210 215 220  
 Glu Gly Glu Asp Asp Lys Val Tyr Phe Phe Phe Thr Glu Val Ser Val  
 225 230 235 240  
 Glu Tyr Glu Phe Val Phe Lys Leu Met Ile Pro Arg Val Ala Arg Val  
 245 250 255  
 Cys Lys Gly Asp Gln Gly Gly Leu Arg Thr Leu Gln Lys Lys Trp Thr  
 260 265 270  
 Ser Phe Leu Lys Ala Arg Leu Ile Cys Ser Lys Pro Asp Ser Gly Leu  
 275 280 285  
 Val Phe Asn Ile Leu Gln Asp Val Phe Val Leu Arg Ala Pro Gly Leu  
 290 295 300  
 Lys Glu Pro Val Phe Tyr Ala Val Phe Thr Pro Gln Leu Asn Asn Val  
 305 310 315 320  
 Gly Leu Ser Ala Val Cys Ala Tyr Thr Leu Ala Thr Val Glu Ala Val  
 325 330 335  
 Phe Ser Arg Gly Lys Tyr Met Gln Ser Ala Thr Val Glu Gln Ser His  
 340 345 350  
 Thr Lys Trp Val Arg Tyr Asn Gly Pro Val Pro Thr Pro Arg Pro Gly  
 355 360 365  
 Ala Cys Ile Asp Ser Glu Ala Arg Ala Ala Asn Tyr Thr Ser Ser Leu  
 370 375 380  
 Asn Leu Pro Asp Lys Thr Leu Gln Phe Val Lys Asp His Pro Leu Met  
 385 390 395 400  
 Asp Asp Ser Val Thr Pro Ile Asp Asn Arg Pro Lys Leu Ile Lys Lys  
 405 410 415  
 Asp Val Asn Tyr Thr Gln Ile Val Val Asp Arg Thr Gln Ala Leu Asp  
 420 425 430  
 Gly Thr Phe Tyr Asp Val Met Phe Ile Ser Thr Asp Arg Gly Ala Leu  
 435 440 445  
 His Lys Ala Val Ile Leu Thr Lys Glu Val His Val Ile Glu Glu Thr  
 450 455 460  
 Gln Leu Phe Arg Asp Ser Glu Pro Val Leu Thr Leu Leu Leu Ser Ser  
 465 470 475 480  
 Lys Lys Gly Arg Lys Phe Val Tyr Ala Gly Ser Asn Ser Gly Val Val  
 485 490 495  
 Gln Ala Pro Leu Ala Phe Cys Glu Lys His Gly Ser Cys Glu Asp Cys  
 500 505 510  
 Val Leu Ala Arg Asp Pro Tyr Cys Ala Trp Ser Pro Ala Ile Lys Ala  
 515 520 525  
 Cys Val Thr Leu His Gln Glu Ala Ser Ser Arg Gly Trp Ile Gln  
 530 535 540  
 Asp Met Ser Gly Asp Thr Ser Ser Cys Leu Asp Lys Ser Lys Glu Ser  
 545 550 555 560

Phe Asn Gln His Phe Phe Lys His Gly Gly Thr Ala Glu Leu Lys Cys  
 565 570 575  
 Phe Gln Lys Ser Asn Leu Ala Arg Val Val Trp Lys Phe Gln Asn Gly  
 580 585 590  
 Glu Leu Lys Ala Ala Ser Pro Lys Tyr Gly Phe Val Gly Arg Lys His  
 595 600 605  
 Leu Leu Ile Phe Asn Leu Ser Asp Gly Asp Ser Gly Val Tyr Gln Cys  
 610 615 620  
 Leu Ser Glu Glu Arg Val Arg Asn Lys Thr Val Ser Gln Leu Leu Ala  
 625 630 635 640  
 Lys His Val Leu Glu Val Lys Met Val Pro Arg Thr Pro Pro Ser Pro  
 645 650 655  
 Thr Ser Glu Asp Ala Gln Thr Glu Gly Ser Lys Ile Thr Ser Lys Met  
 660 665 670  
 Pro Val Ala Ser Thr Gln Gly Ser Ser Pro Pro Thr Pro Ala Leu Trp  
 675 680 685  
 Ala Thr Ser Pro Arg Ala Ala Thr Leu Pro Pro Lys Ser Ser Ser Gly  
 690 695 700  
 Thr Ser Cys Glu Pro Lys Met Val Ile Asn Thr Val Pro Gln Leu His  
 705 710 715 720  
 Ser Glu Lys Thr Val Tyr Leu Lys Ser Ser Asp Asn Arg Leu Leu Met  
 725 730 735  
 Ser Leu Leu Leu Phe Ile Phe Val Leu Phe Leu Cys Leu Phe Ser Tyr  
 740 745 750  
 Asn Cys Tyr Lys Gly Tyr Leu Pro Gly Gln Cys Leu Lys Phe Arg Ser  
 755 760 765  
 Ala Leu Leu Leu Gly Lys Lys Thr Pro Lys Ser Asp Phe Ser Asp Leu  
 770 775 780  
 Glu Gln Ser Val Lys Glu Thr Leu Val Glu Pro Gly Ser Phe Ser Gln  
 785 790 795 800  
 Gln Asn Gly Asp His Pro Lys Pro Ala Leu Asp Thr Gly Tyr Glu Thr  
 805 810 815  
 Glu Gln Asp Thr Ile Thr Ser Lys Val Pro Thr Asp Arg Glu Asp Ser  
 820 825 830  
 Gln Arg Ile Asp Glu Leu Ser Ala Arg Asp Lys Pro Phe Asp Val Lys  
 835 840 845  
 Cys Glu Leu Lys Phe Ala Asp Ser Asp Ala Asp Gly Asp  
 850 855 860  
  
 <210> 3  
 <211> 30  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная  
  
 <220>  
 <223> полинуклеотид анти-CD100 VH CDR1  
  
 <400> 3  
 ggctacagct tcagcgacta ctacatgcac 30  
  
 <210> 4  
 <211> 51  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная  
  
 <220>  
 <223> полинуклеотид анти-CD100 VH CDR2  
  
 <400> 4  
 cagattaatc ctaccactgg cggcgctagc tacaaccaga agttcaaggg c 51  
  
 <210> 5  
 <211> 27  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная  
  
 <220>  
 <223> полинуклеотид анти-CD100 VH CDR3  
  
 <400> 5  
 tattactacg gcagacactt cgatgtc 27  
  
 <210> 6  
 <211> 10  
 <212> Белок  
 <213> Искусственная  
  
 <220>  
 <223> полипептид анти-CD100 VH CDR1  
  
 <400> 6  
 Gly Tyr Ser Phe Ser Asp Tyr Tyr Met His  
 1 5 10  
  
 <210> 7  
 <211> 17  
 <212> Белок  
 <213> Искусственная  
  
 <220>  
 <223> полипептид анти-CD100 VH CDR2  
  
 <400> 7

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

Gly

<210> 8  
<211> 9  
<212> Белок  
<213> Искусственная  
  
<220>  
<223> Полипептид анти-CD100 VH CDR3

<400> 8  
Tyr Tyr Tyr Gly Arg His Phe Asp Val  
1 5

<210> 9  
<211> 118  
<212> Белок  
<213> Искусственная  
  
<220>  
<223> полипептид анти-CD100 VH 2503

<400> 9  
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser  
1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

Thr Val Thr Val Ser Ser  
115

<210> 10  
<211> 118  
<212> Белок  
<213> Искусственная  
  
<220>  
<223> полипептид анти-CD100 VH 67

<400> 10  
Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala  
1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

Thr Val Thr Val Ser Ser  
115

<210> 11  
<211> 45  
<212> ДНК  
<213> Искусственная  
  
<220>  
<223> Полинуклеотид анти-CD100 VL CDR1

<400> 11  
aaggccagcc aaagcgtgga ttatgatggc gatagctata tgaac 45

<210> 12  
<211> 21  
<212> ДНК  
<213> Искусственная  
  
<220>  
<223> Полинуклеотид анти-CD100 VL CDR2

<400> 12  
gctgcatcca atctggaag c 21

<210> 13  
<211> 27  
<212> ДНК  
<213> Искусственная  
  
<220>

<223> Полинуклеотид анти-CD100 VL CDR3

<400> 13  
cagcaagca atgaggatcc ctacacc

27

<210> 14  
<211> 15  
<212> Белок  
<213> Искусственная

<220>  
<223> Полипептид анти-CD100 VL CDR1

<400> 14

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

<210> 15  
<211> 7  
<212> Белок  
<213> Искусственная

<220>  
<223> Полипептид анти-CD100 VL CDR2

<400> 15

Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser  
1 5

<210> 16  
<211> 9  
<212> Белок  
<213> Искусственная

<220>  
<223> Полипептид анти-CD100 VL CDR3

<400> 16

Gln Gln Ser Asn Glu Asp Pro Tyr Thr  
1 5

<210> 17  
<211> 111  
<212> Белок  
<213> Искусственная

<220>  
<223> Полипептид анти-CD100 VL 2503

<400> 17

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

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

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

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

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

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

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

<210> 18  
<211> 111  
<212> Белок  
<213> Искусственная

<220>  
<223> Полипептид анти-CD100 VL 67

<400> 18

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

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

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

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

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

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

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

<210> 19  
<211> 354  
<212> ДНК  
<213> Искусственная

<220>  
<223> Полинуклеотид анти-CD100 VH 2503

<400> 19

cagggtgcagc tgggtgcagag cggcgctgag gtgaagaagc ctggcagcag cgtgaaggtc 60  
tcctgaagg ctagcggcta cagcttcagc gactactaca tgcaactgggt gagacaggcc 120

cctggccaag	gcctggagtg	gatgggccag	attaatccta	ccactggcgg	cgctagctac	180
aaccagaagt	tcaagggcaa	ggccaccatt	accgtggaca	aaagcaccag	cacagcctac	240
atggagctga	gcagcctgag	aagcgaggac	accgccgtgt	attactgtgc	cagatattac	300
tacggcagac	acttcgatgt	ctggggccaa	ggcaccacgg	tcaccgtctc	ttca	354
<210>	20					
<211>	354					
<212>	ДНК					
<213>	Искусственная					
<220>						
<223>	Полинуклеотид анти-CD100 VH 67					
<400>	20					
caggtccagc	tgcagcagtc	tggacctgag	ctgggtgaagc	ctggggcttc	agtgaagata	60
tcctgcaagg	cttctggtta	ctcattcagt	gactactaca	tgcactgggt	gaagcaaaagt	120
ctgaaaaata	gtcttgagtg	gattggacag	attaatccta	ccactggggg	tgctagctac	180
aaccagaagt	tcaagggcaa	ggccacatta	actgtagata	aatcctccag	cacagcctac	240
atgcagctca	agagcctgac	atctgaagag	tctgcagtct	attactgtac	aagatattac	300
tacggtagac	acttcgatgt	ctggggccaa	gggaccacgg	tcaccgtttc	ctca	354
<210>	21					
<211>	333					
<212>	ДНК					
<213>	Искусственная					
<220>						
<223>	Полинуклеотид анти-CD100 VL 2503					
<400>	21					
gacatctgta	tgacccagag	cccagacagc	ctggctgtga	gcctgggcga	gagggccacc	60
atcaactgca	aggccagcca	aagcgtggat	tatgatggcg	atagctatat	gaactggtac	120
cagcagaaac	caggccagcc	tcctaagctg	ctgatttacg	ctgcatcaa	tctgaaaagc	180
ggcgtgcctg	acagattcag	cggcagcggc	agcggcacag	atttcaactc	gaccatcagc	240
agcctgcagg	ctgaagatgt	ggcagtgtat	tactgtcagc	aaagcaatga	ggatccctac	300
accttcggcc	aagggaccaa	gctcgagatc	aaa			333
<210>	22					
<211>	333					
<212>	ДНК					
<213>	Искусственная					
<220>						
<223>	Полинуклеотид анти-CD100 VL 67					
<400>	22					
gacattgtga	tgacccagtc	tccagcttct	ttggctgtgt	ctctagggca	gagggccacc	60
atctcctgca	aggccagcca	aagtgttgat	tatgatgggt	atagtatat	gaactggtac	120
caacagaaac	caggacagcc	accctaaactc	ctcatctatg	ctgcatcaa	tctagaatct	180
gggatcccg	ccaggtttag	tggcagtggg	tctgggacag	acttcaccct	caacatccat	240
ctctgggagg	aggagatgct	tgcaacctat	tactgtcagc	aaagtaatga	ggatccgtac	300
acgttcggag	gggggaccaa	gctcgagatc	aaa			333
<210>	23					
<211>	2586					
<212>	ДНК					
<213>	Homo sapiens					
<400>	23					
atgaggatgt	gcacccccat	tagggggctg	ctcatggccc	ttgcagtgat	gtttgggaca	60
gcgatggcat	ttgcacccat	accctggatc	accctggagc	acagagaggt	gcacctgggt	120
cagtttcagt	agccagacat	ctacaactac	tcagccttgc	tgctgagcga	ggacaaggac	180
accttgtaga	taggtgccc	ggaggcggtc	ttcgtgtgta	acgcaactca	catctccgag	240
aagcagcatg	aggtgtattg	gaaggtctca	gaagacaaaa	aagcaaaatg	tgcaaaaag	300
gggaaatcaa	aacagacaga	gtgcctcaac	tacatccggg	tgctgcagcc	actcagcgcc	360
acttcctttt	acgtgtgtgg	gaccaacgca	ttccagccgg	cctgtgacca	cctgaactta	420
acatccttta	agtttctggg	gaaaaatgaa	gatggcaaa	gaagatgtcc	ctttgaccca	480
gcacacagct	acacatccgt	catggttgat	ggagaaactt	attcggggac	gtcgtataat	540
tttttgggaa	gtgaacccat	catctcccga	aattcttccc	acagtcctct	gaggacagaa	600
tatgcaatcc	cttggttgaa	cgagcctagt	ttcgtgtttg	ctgacgtgat	ccgaaaaagc	660
ccagacagcc	ccgacggcga	ggatgacagg	gtctacttct	tcttcacgga	ggtgtctgtg	720
gagtatgagt	ttgtgttcag	ggtgctgac	ccacggatag	caagagtgtg	caagggggac	780
cagggcggcc	tgaggacctt	gcagaagaaa	tggacctcct	tcctgaaaagc	ccgactcatc	840
tgctcccggc	cagacagcgg	cttggtcttc	aatgtgctgc	gggatgtctt	cgctctcagg	900
tccccgggcc	tgaaggtgcc	tgtgttctat	gcactcttca	ccccacagct	gaacaacgtg	960
gggtgtctcg	cagtgtgcgc	ctacaacctg	tccacagccg	aggaggtctt	ctcccacggg	1020
aagtacatgc	agagcaccac	agtggagcag	tcccacacca	agtgggtgcg	ctataatggc	1080
ccgtatccca	agccgcggcc	tggagcgtgc	atcgacagcg	aggcacgggc	cgccaactac	1140
accagctcct	tgaatttgcc	agacaagacg	ctgcagtctg	ttaagacca	ccctttgatg	1200
gatgactcgg	taaccccaat	agacaacagg	cccaggttaa	tcaagaaga	tgtgaactac	1260
accagatcg	tgggtgaccg	gaccagggcc	ctggatggga	ctgtctatga	tgtcatgttt	1320
gtcagcacag	accggggagc	tctgcacaaa	gccatcagcc	tcgagcacgc	tggtcacatc	1380
atcgaggaga	cccagctctt	ccaggacttt	gagccagtcc	agaccctgct	gctgtcttca	1440
aagaagggca	acaggtttgt	ctatgctggc	tctaactcgg	gcgtggtcca	ggccccgctg	1500
gccttctgtg	ggaagcacgg	cacctgcgag	gactgtgtgc	tggcgcgggg	ccccactgc	1560
gcctggagcc	cgcccacagc	gacctgcgtg	gctctgcacc	agaccgagag	ccccagcagg	1620

```

ggtttgattc aggagatgag cggcgatgct tctgtgtgcc cggataaaag taaaggaagt 1680
taccggcagc attttttcaa gcacgggtggc acagcggaac tgaaatgtc ccaaaaatcc 1740
aacctggccc gggctctttg gaagttccag aatggcgtgt tgaaggccga gagccccaag 1800
tacggtctta tgggcagaaaa aaacttgctc atcttcaact tgtcagaagg agacagtggg 1860
gtgtaccagt gcctgtcaga ggaaggggtt aagaacaaaa cggctctcca agtggtcgcc 1920
aagcacgtcc tggaagtga ggtggttcca aagcccgtag tggcccccac cttgtcagtt 1980
gttcagacag aaggtagtag gattgccacc aaagtgttg tggcatccac ccaagggtct 2040
tctcccca cccagccgt gcaaggccacc tcctccgggg ccatcacct tcctcccaag 2100
cctgcgcca ccggcacatc ctgcgaacca aagatcgta tcaacacggt ccccgagctc 2160
cactcgaga aaaccatgta tcttaagtcc agcgacaacc gcctcctcat gtccctcttc 2220
ctctcttct ttgttctctt cctctgcctc ttttctaca actgctataa gggatacttg 2280
cccagacagt gcttgaatt ccgctcggcc ctactaattg ggaagaagaa gcccaagtca 2340
gatttctgt accgtgagca gagcctgaag gagacgttag tagagccagg gagcttctcc 2400
cagcagaatg gggagcacc caagccagcc ctggacaccg gctatgagac cgagcaagac 2460
accatcacca gcaaagtccc cacggaagg gaggactcac agaggatcga cgacctttct 2520
gccagggaca agccctttga cgtcaagtgt gagctgaagt tcgctgactc agacgcagat 2580
ggagac 2586

```

<210> 24  
 <211> 13  
 <212> Белок  
 <213> Искусственная

<220>  
 <223> Пептидный эпитоп протеолипидного белка PLP (аминокислоты 139-151)

<400> 24

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

<210> 25  
 <211> 118  
 <212> Белок  
 <213> Искусственная

<220>  
 <223> полипептид анти-CD100 VH 76

<400> 25

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

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

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

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

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

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

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

Leu Val Thr Val Ser Ser  
115

<210> 26  
 <211> 10  
 <212> Белок  
 <213> Искусственная

<220>  
 <223> Полипептид анти-CD100 VH 76 CDR1

<400> 26

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

<210> 27  
 <211> 17  
 <212> Белок  
 <213> Искусственная

<220>  
 <223> Полипептид анти-CD100 VH 76 CDR2

<400> 27

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

Asp

<210> 28  
 <211> 9  
 <212> Белок  
 <213> Искусственная

<220>  
 <223> Полипептид анти-CD100 VH 76 CDR3

<400> 28

Asp Pro Tyr Gly Trp Thr Met Asp Ser  
1 5

<210> 29  
 <211> 107  
 <212> Белок  
 <213> Искусственная  
  
 <220>  
 <223> Полипептид анти-CD100 VL 76  
  
 <400> 29  
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly  
 1 5 10 15  
  
 Asp Thr Ile Thr Ile Thr Cys His Ala Ser Gln Asn Ile Asn Val Trp  
 20 25 30  
  
 Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Asn Ile Pro Lys Leu Leu Ile  
 35 40 45  
  
 Tyr Lys Ala Ser Asn Leu His Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60  
  
 Ser Gly Ser Gly Thr Gly Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
 65 70 75 80  
  
 Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Gln Ser Tyr Pro Tyr  
 85 90 95  
  
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
 100 105  
  
 <210> 30  
 <211> 11  
 <212> Белок  
 <213> Искусственная  
  
 <220>  
 <223> Полипептид анти-CD100 VL 76 CDR1  
  
 <400> 30  
 His Ala Ser Gln Asn Ile Asn Val Trp Leu Ser  
 1 5 10  
  
 <210> 31  
 <211> 7  
 <212> Белок  
 <213> Искусственная  
  
 <220>  
 <223> Полипептид анти-CD100 VL 76 CDR2  
  
 <400> 31  
 Lys Ala Ser Asn Leu His Thr  
 1 5  
  
 <210> 32  
 <211> 9  
 <212> Белок  
 <213> Искусственная  
  
 <220>  
 <223> полипептид анти-CD100 VL 76 CDR3  
  
 <400> 32  
 Gln Gln Gly Gln Ser Tyr Pro Tyr Thr  
 1 5  
  
 <210> 33  
 <211> 354  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная  
  
 <220>  
 <223> полинуклеотид анти-CD100 VH 76  
  
 <400> 33  
 caggtccagc tgcagcagtc tggggctgaa ctggcaaaac ctggggccctc agtgaagatg 60  
 tcctgcaagg cttctggcta cacttttact aggtactgga tgcactgggt aaaacagagg 120  
 cctggacagg gctctggaatg gattggatac attaatccta gcactgggta ttctgattac 180  
 aatcagaagt tcaaggacaa ggccacattg actgcagaca aatcctccag cacagcctac 240  
 atgcaactga gcagcctgac atctgaggac tctgcagtct attactgtgc aagagacccc 300  
 tacggctgga ctatggactc ctggggccaa gggactctgg tcaccgtctc ctca 354  
  
 <210> 34  
 <211> 30  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная  
  
 <220>  
 <223> полинуклеотид анти-CD100 VH 76 CDR1  
  
 <400> 34  
 ggctacacct ttactaggta ctggatgcac 30  
  
 <210> 35  
 <211> 51  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная  
  
 <220>  
 <223> полинуклеотид анти-CD100 VH 76 CDR2  
  
 <400> 35  
 tacattaatc ctagcactgg ttattctgat tacaatcaga agttcaagga c 51  
  
 <210> 36  
 <211> 27  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная  
  
 <220>  
 <223> полинуклеотид анти-CD100 VH 76 CDR3  
  
 <400> 36

```

gacccctacg gctggactat ggactcc 27

<210> 37
<211> 321
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Полинуклеотид анти-CD100 VL 76

<400> 37
gacatccaga tgaccagtc tccatccagt ctgtctgcat cccttgaga cacaattacc 60
atcacttgcc atgccagtc gaacattaat gtttggttaa gctggtagca gcagaacca 120
ggaatatatt ctaactatt gatctataag gctccaact tgcacacagg cgtcccatca 180
aggtttagtg gcagtggatc tggaacaggt ttacattaa ccatcagcag cctgcgcct 240
gaagacattg ccacttacta ctgtcaacag ggtcaaatgt atccgtacac gttcggaggg 300
gggaccaagc tcgagatcaa a 321

<210> 38
<211> 33
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Полинуклеотид анти-CD100 VL 76 CDR1

<400> 38
catgccagtc agaacattaa tgtttgggta agc 33

<210> 39
<211> 21
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Полинуклеотид анти-CD100 VL 76 CDR2

<400> 39
aaggcttcca acttgscacac a 21

<210> 40
<211> 27
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Полинуклеотид анти-CD100 VL 76 CDR3

<400> 40
caacaggggc aaagttatcc gtacacg 27

```

## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ уменьшения проницаемости гематоэнцефалического барьера у индивида, имеющего повышенную проницаемость гематоэнцефалического барьера, связанную с нейровоспалительным расстройством, включающий введение индивиду эффективного количества выделенного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которые специфически связываются с семафорином-4D (SEMA4D), где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельную область тяжелой цепи (VH), содержащую VH CDR 1-3, имеющие SEQ ID NO:6, 7 и 8 соответственно, и вариабельную область легкой цепи (VL), содержащую VLCDR 1-3, имеющие SEQ ID NO:14, 15 и 16 соответственно, причем антитело или его фрагмент способны уменьшать проницаемость гематоэнцефалического барьера у индивида.

2. Способ по п.1, отличающийся тем, что антитело или его антигенсвязывающий фрагмент ингибируют взаимодействие SEMA4D с рецептором SEMA4D.

3. Способ по п.2, отличающийся тем, что рецептор SEMA4D представляет собой плексин-B1.

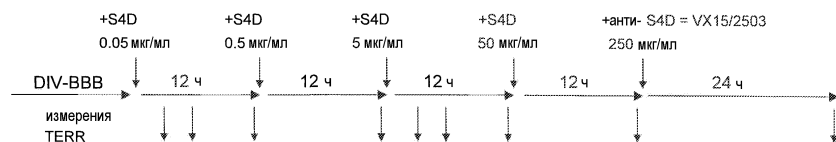
4. Способ по п.1, отличающийся тем, что нейровоспалительное расстройство выбрано из группы, состоящей из рассеянного склероза, бокового амиотрофического склероза, эпилепсии, болезни Альцгеймера, болезни Паркинсона, менингита, отека мозга и мозговой травмы.

5. Способ по любому из пп.1-4, отличающийся тем, что дополнительно осуществляют один или несколько других видов лечения нейровоспалительного расстройства до, во время или после использования антитела или его антигенсвязывающего фрагмента.

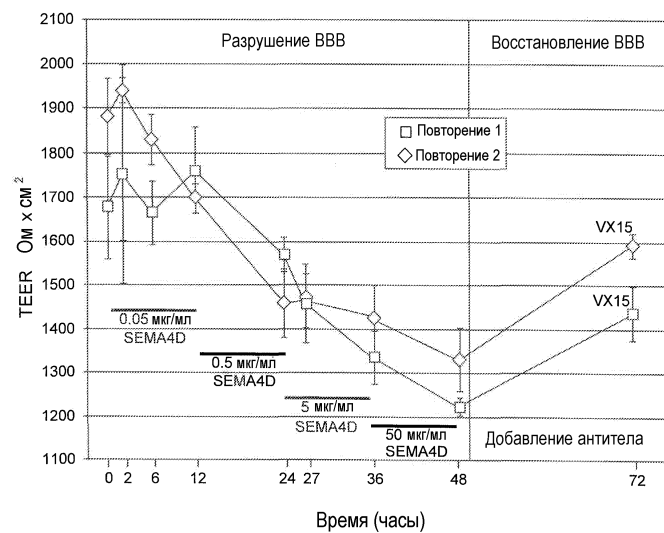
6. Способ по любому из пп.1-4, отличающийся тем, что индивид представляет собой млекопитающее.

7. Способ по п.6, отличающийся тем, что млекопитающее представляет собой человека.

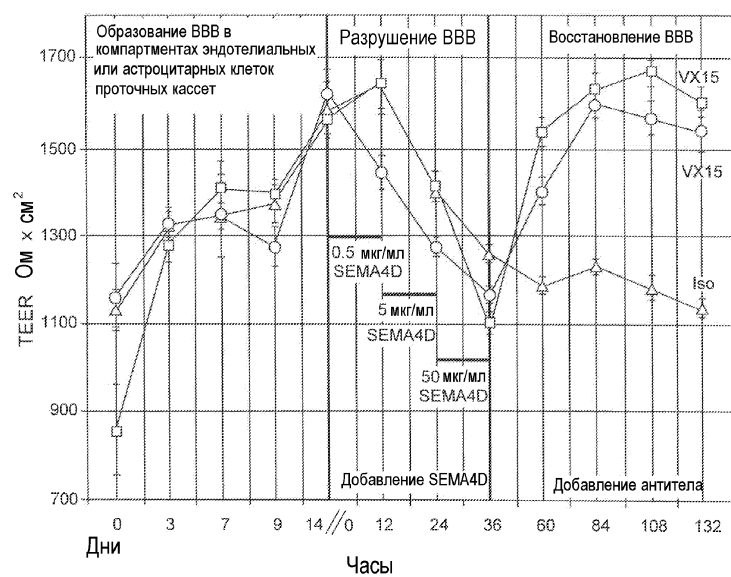
8. Способ по любому из пп.1-4, отличающийся тем, что антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляет собой человеческое или гуманизированное антитело.



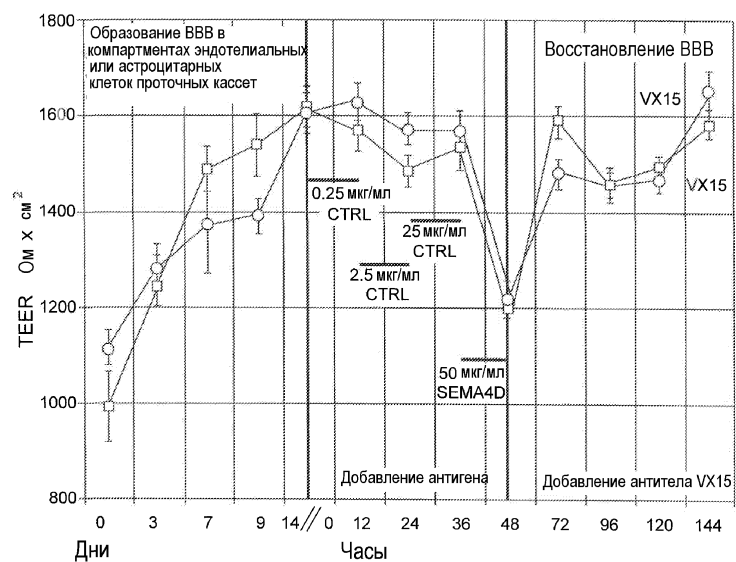
Фиг. 1



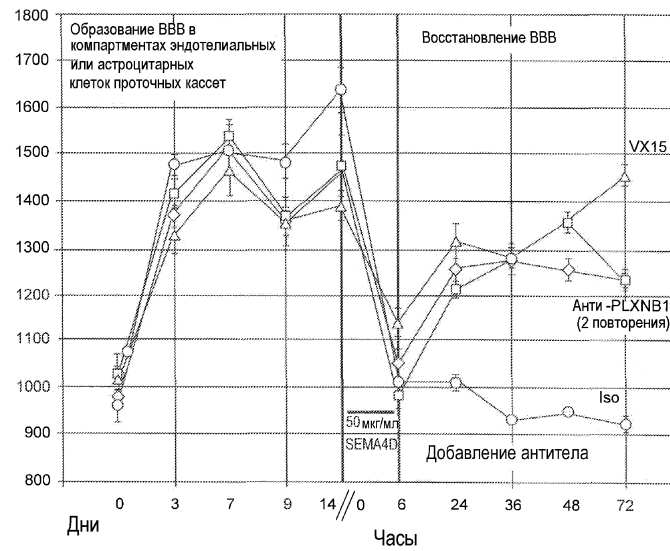
Фиг. 2



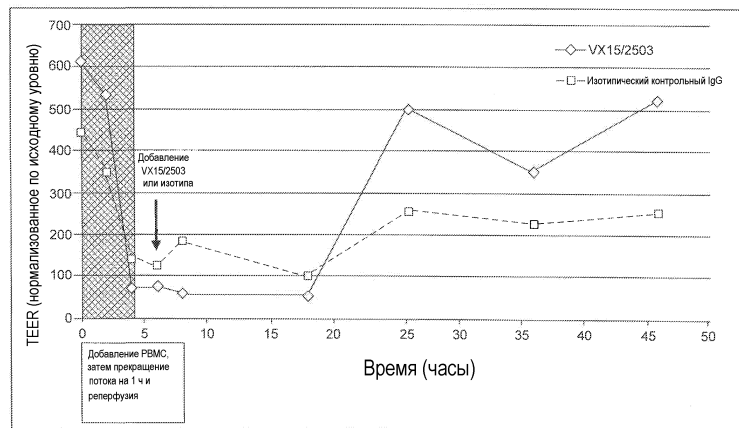
Фиг. 3



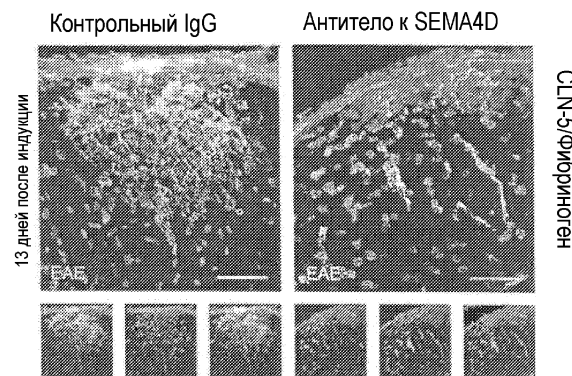
Фиг. 4



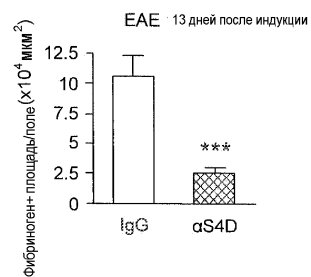
Фиг. 5



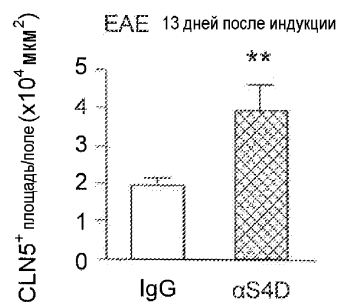
Фиг. 6



Фиг. 7А

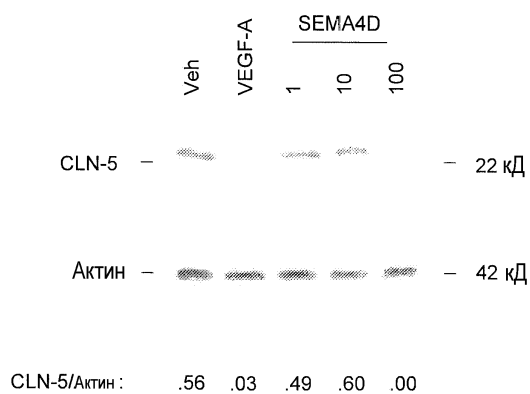


Фиг. 7В



Фиг. 7С

Эндотелий ЦНС мыши



Фиг. 8



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2