

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(11) 030796

(13) B1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2018.09.28

(51) Int. Cl. A61K 39/395 (2006.01)

(21) Номер заявки
201492067

(22) Дата подачи заявки
2013.05.10

(54) ПРИМЕНЕНИЕ СВЯЗЫВАЮЩИХ СЕМАФОРИН-4D МОЛЕКУЛ ДЛЯ
ПРОМОТИРОВАНИЯ НЕЙРОГЕНЕЗА ПОСЛЕ ИНСУЛЬТА

(31) 61/646,119; 13/842,523

(56) US-A1-20100285036

(32) 2012.05.11; 2013.03.15

US-A1-20120027758

(33) US

US-A1-20080219971

(43) 2015.05.29

US-A1-20070098707

(86) PCT/US2013/040661

US-B1-6635742

(87) WO 2013/170221 2013.11.14

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

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

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

(57) Представлены способы промотирования нейрогенеза в нервной ткани пациента, имеющего по меньшей мере один из симптомов расстройства центральной нервной системы, включающие введение индивиду, нуждающемуся в этом, эффективного количества выделенной связывающей молекулы, которое специфически связывается с семафорином-4D (SEMA4D).

030796
B1

B1
—

030796
—

Перекрестная ссылка на родственные заявки

Настоящая заявка испрашивает приоритет заявки США 13/842523, поданной 15 марта 2013 г., и приоритет предварительной заявки США 61/646119, поданной 11 мая 2012 г., содержание которых включено в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме.

Ссылка на список последовательностей для заявки РСТ, представленный в электронном виде

Содержание списка последовательностей, поданного одновременно с заявкой РСТ, в электронном виде в виде текстового файла в кодировке ASCII (название: "1843072PC01_SequenceListing.txt"; размер: 7562 байт; дата создания: 10 мая 2013 г.), включено в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме.

Предпосылки создания изобретения

Семафорин 4D (SEMA4D), также известный как CD100, представляет собой трансмембранный белок (например, SEQ ID NO: 1 (человек); SEQ ID NO: 2 (мышь)), который принадлежит к семейству продуктов генов семафорина. SEMA4D экспрессируется на клеточной поверхности в виде гомодимера, но при активации клеток SEMA4D может высвобождаться с поверхности клетки с помощью протеолитического расщепления с получением растворимой формы белка, SSEMA4D, 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 экспрессируется на высоком уровне в лимфоидных органах, в том числе в селезенке, тимусе, лимфатических узлах, и в нелимфоидных органах, таких как мозг, сердце и почки. В лимфоидных органах SEMA4D экспрессируется на высоком уровне на покояющихся Т-клетках, но слабо экспрессируется на покояющихся В-клетках и антиген-презентирующих клетках (АРС), таких как дендритные клетки (DC). Его экспрессия в этих клетках положительно регулируется после активации с помощью различных стимулов. Высвобождение растворимого SEMA4D из иммунных клеток также увеличивается при активации этих клеток.

SEMA4D вовлечен в развитие аутоиммунных демиелинизирующих заболеваний, таких как рассеянный склероз, и некоторых видов рака. Отсутствие способности нервной системы млекопитающих к полной регенерации после травмы является главной клинической проблемой. Повреждения нейронов в результате инсульта или травмы мозга, а также в результате нейродегенеративных заболеваний, например болезни Альцгеймера, являются основной причиной смертности и инвалидности. В тоже время в отношении ангиогенеза признана сигнальная роль SEMA4D, действующего через свои рецепторы, например плексин-B1, но эффекты сигнального действия SEMA4D на промотирование нейрогенеза остаются неясными. Таким образом, сохраняется необходимость обеспечения неудовлетворенной потребности в терапевтических средствах для нейрогенерации.

Сущность изобретения

В настоящем описании раскрыты способы промотирования нейрогенеза, в которых используются связывающие семафорин-4D молекулы. Имеющиеся доказательства подтверждают, что SEMA4D может поставить под угрозу способность нервных клеток к регенерации. Согласно вариантам осуществления настоящего изобретения, показанным в настоящем документе, предложен способ промотирования нейрогенеза в нервной ткани пациента, у которого имеется по меньшей мере один из симптомов расстройства центральной нервной системы, при этом способ включает введение индивиду, нуждающемуся в этом, эффективного количества выделенной связывающей молекулы, которая специфически связывает и/или ингибирует семафорин-4D (SEMA4D).

В соответствии с вариантами осуществления настоящего изобретения, показанными в настоящем документе, предложен способ увеличения количества клеток-предшественников у индивида с расстройством центральной нервной системы, включающий введение индивиду эффективного количества выделенной связывающей молекулы, которая специфически связывается с семафорином-4D (SEMA4D), где связывание SEMA4D приводит к увеличению количества клеток-предшественников.

В соответствии с вариантами осуществления настоящего изобретения, показанными в настоящем документе, предложен способ промотирования нейрогенеза в нервной ткани пациента, у которого имеется по меньшей мере один из симптомов расстройства центральной нервной системы, включающий введение индивиду эффективного количества выделенной связывающей молекулы, которая специфически связывается с SEMA4D, где связывающая молекула конкурентно ингибирует референсное моноклональное антитело от специфического связывания с SEMA4D, где референсное антитело выбрано из группы, состоящей из VX15/2503 или 67.

В соответствии с вариантами осуществления настоящего изобретения, проиллюстрированных в настоящем документе, предложен способ облегчения симптомов заболевания или расстройства центральной нервной системы, в частности, инсульта, у пациента, включающий введение указанному индивиду эффективного количества выделенной связывающей молекулы, которая специфически связывает и/или ингибирует семафорин-4D (SEMA4D), где связывание с SEMA4D облегчает симптомы.

Краткое описание фигур

Фиг. 1 - схема экспериментального протокола для окклюзии средней мозговой артерии (МСА), описанной в примерах.

Фиг. 2А-2Е - показаны нейронные стволовые клетки/клетки предшественники в образцах мозга, окрашенных нестин/Sox2 в областях, указанных на фиг. 2Е, после окклюзии средней мозговой артерии (MCAO) и обработки с использованием изотипического контроля ("контроль IgG", фиг. 2А и 2С) или MAb 67-2 ("Анти-Sema4D-Ab", фиг. 2В и 2Д). Образцы мозга были получены через 7 дней после MCAO.

Фиг. 3А-3Д - показана (А) экспрессия мРНК, количественно определенная методом ОТ-ПЦР. (В) Sox2, (С) нестин и (Д) PLP, по отношению к актину (контроль) в ткани головного мозга мышей с MCAO, после обработки с использованием изотипического контроля ("Контроль IgG") или MAb 67-2 ("Анти-SEMA4D"). Ткани мозга были получены через 7 дней после MCAO. Нестин и Sox2 являются маркерами нейронных стволовых клеток-предшественников. PLP является маркером миелинизации.

Фиг. 4А-4Д - показан относительный общий объем головного мозга и полосатого тела в обработанных и необработанных полушариях мозга мышей с MCAO, после обработки с использованием изотипического контроля или MAb 67-2. Измерения проводились через 30 дней после MCAO. На фиг. 4А-4В показаны участки головного мозга, окрашенные NeuN из (А) 1 мыши, получавшей представительный изотипический контроль ("контроль IgG"), и (В) 1 мыши, получавшей антитело против SEMA4D ("Анти-SEMA4D"). Объем мозга отражает объем стриатума (сплошная линия) и полушария (пунктирная линия). На фиг. 4С-4Д показаны расчетные соотношения (L/R) для объемов полосатого тела и полушария, соответственно, для мышей, получавших изотипический контроль ("IgG") и антитело против SEMA4D ("SEMA").

Фиг. 5А-5В - показана экспрессия клеточного маркера зрелых нейронов, NeuN, у мышей с MCAO: (А) MAb 67-2 ("Sema4D-Ab") или (В) изотипический контроль ("Control IgG") через 30 дней после MCAO. Стриатум на границе церебрального инфаркта обозначен стрелками.

Фиг. 6А-С - показаны светлые и темные фазы открытого участка двигательной активности у мышей после MCAO и получавших изотипический контроль ("IgG") или MAb 67-2 ("SEMA4D") на 30 день после MCAO, или у мышей с ложным хирургическим вмешательством ("SHAM"). На фиг. 6А-6В показана двигательная активность в светлой фазе и темной фазе соответственно. На фиг. 6С показано отношение двигательной активности в темной/светлой фазе (D/L).

Фиг. 7 - показана схема экспериментального протокола, описанного в примере 6.

Подробное описание изобретения

I. Определения.

Следует отметить, что термины, представленные в настоящем описании в единственном числе, в полной мере относятся к одному или нескольким объектам; например термин "антитело против SEMA4D" подразумевает одно или несколько антител против SEMA4D. Таким образом, термины, представленные в единственном числе, а также указания "один или несколько" или "по крайней мере один" могут быть использованы в настоящем описании взаимозаменяющими.

Термин "нейрогенез" определяется в настоящем описании как пролиферация, дифференциация, миграция и/или выживание нервных клеток в условиях *in vivo* или *in vitro*. В различных вариантах осуществления изобретения нервные клетки являются клетками взрослого, фетальными или эмбриональными стволовыми нервными клетками или популяцией клеток. Клетки могут быть локализованы в центральной нервной системе или в другом месте организма животного или человека. Клетки также могут находиться в ткани, такой как нервная ткань. В некоторых вариантах осуществления изобретения нервные клетки являются клетками взрослого, фетальных или эмбриональных стволовых нервными клетками или популяцией клеток, или они могут представлять собой популяцию клеток, содержащую смесь стволовых клеток и клеток-предшественников. Нервные клетки включают все стволовые клетки мозга, все клетки-предшественники мозга и все клетки-прекурсоры мозга. Нейрогенез включает нейрогенез, который имеет место во время нормального развития, а также при регенерации нервной ткани, которая происходит после болезни, повреждения или терапевтического вмешательства, например, путем лечения, описанного в настоящем документе.

Термины "нервная клетка", "стволовая клетка", "нервная стволовая клетка", "клетка-предшественник", "нервная стволовая клетка/клетка-предшественник" (NSPC) или "нервная стволовая клетка/клетка-прекурсор" (NSPC) используются взаимозаменяющими для обозначения недифференцированной клетки, которая способна к самообновлению и дифференцировке в нейроны, астроциты и/или олигодендроциты.

Термин "клетки-предшественники" (например, нейронные клетки-предшественники), как используется в настоящем описании, относится к клетке, полученной из стволовой клетки, которая сама по себе не является стволовой клеткой. Некоторые клетки-предшественники могут производить потомство, которое способно дифференцироваться в более чем один тип клеток. Нервные клетки-предшественники включают нейронные клетки-предшественники, которые образуют нейроны и глиальные клетки-предшественники, которые образуют астраглиальные и/или олигодендроглиальные клетки.

Как используется в настоящем описании, термин "расстройства центральной нервной системы" или "расстройство ЦНС" относится к нейродегенеративному расстройству, острому повреждению головного мозга (например, такому как инсульт, черепно-мозговая травма, церебральный паралич, церебральный инфаркт, повреждение спинного мозга, травматическое повреждение) и к некоторым дисфункциям цен-

тральной нервной системы (ЦНС) (таким как, например, депрессия, эпилепсия и шизофрения).

Как используется в настоящем описании, термин "нейродегенеративное расстройство" относится к болезни Альцгеймера, болезни Гентингтона, боковому амиотрофическому склерозу, болезни Паркинсона и рассеянному склерозу. Следует отметить, что расстройства ЦНС могут также представлять собой нейровоспалительное расстройство. Следует иметь в виду, что нейродегенеративное расстройство может включать нейровоспаление. Тем не менее, нейродегенеративное расстройство может протекать и без явного нейровоспаления. Это имеет место, например, на поздней стадии вторичного прогрессирующего рассеянного склероза.

Как используется в настоящем описании, термин "острое повреждение мозга" относится к инсульту, черепно-мозговой травме, церебральному параличу, инфаркту головного мозга, повреждению спинного мозга и травматическому повреждению.

Как используется в настоящем описании, термин "дисфункции ЦНС" относятся к депрессии, эпилепсии и шизофрении.

Термин "терапевтически эффективное количество" относится к количеству антитела, полипептида, полинуклеотида, небольшой органической молекуле или другого лекарственного средства, эффективного для "лечения" заболевания или расстройства у индивида или млекопитающего. В случае нейровоспалительного расстройства, терапевтически эффективное количество лекарственного средства может промотировать нейрогенез путем увеличения, например пролиферации, дифференцировки, миграции и/или выживания нервных стволовых клеток/клеток-предшественников; уменьшать, замедлять или останавливать снижение количества нервных клеток; ингибировать, например, подавлять, замедлять, предотвращать, останавливать или обращать уменьшение количества нервных клеток; увеличить количество, плотность и/или концентрацию нервных клеток; изменять морфологию или функции нервных клеток; или изменять взаимодействия между нервными клетками; облегчать, в некоторой степени, один или несколько симптомов, связанных со снижением количества нервных клеток, например, при нейровоспалительных расстройствах; снижать уровень заболеваемости и смертности; улучшать качество жизни; или обеспечивать сочетание таких эффектов.

Такие термины, как "лечение", или "лечить", или "облегчение", или "смягчение" относятся к 1) терапевтическим мерам, в рамках которых излечивают, замедляют, ослабляют симптомы, обращают развитие и/или останавливают прогрессирование диагностированного патологического состояния или расстройства, и к 2) профилактическим или превентивным мерам, в рамках которых предотвращают и/или замедляют развитие целевого патологического состояния или расстройства. Таким образом, индивиды, которые нуждаются в лечении, включают индивидов, у которых уже имеется расстройство; индивидов, у которых имеется предрасположенность к расстройству; и индивидов, у которых нарушение должно быть предотвращено. Выгодные или желаемые клинические результаты включают, но не ограничиваются перечисленными, ослабление симптомов, уменьшение тяжести заболевания, стабилизацию (т.е. отсутствие ухудшения) тяжести заболевания, задержку или замедление прогрессирования заболевания, улучшение или временное облегчение болезненного состояния и ремиссию (частичную или полную), независимо от того, диагностированы они или нет. "Лечение" может также означать продление выживаемости по сравнению с выживаемостью, ожидаемой в случае отсутствия лечения. Индивиды, которые нуждаются в лечении, включают индивидов, у которых уже имеется заболевание или расстройство, а также индивидов, у которых имеется предрасположенность к заболеванию или расстройству, и индивидов, у которых нарушение должно быть предотвращено.

Под "индивидуом", или "животным", или "больным", или "пациентом", или "млекопитающим", имеется в виду любой индивид, в частности, млекопитающее, для которого желательно выполнить диагностику, прогнозирование или терапию. Индивиды-млекопитающие включают людей, домашних животных, сельскохозяйственных животных, и животных из зоопарка, спортивных животных или комнатных животных, включая собак, кошек, морских свинок, кроликов, крыс, мышей, лошадей, крупный рогатый скот, коров, медведей и т.п.

В настоящем описании такие фразы, как "индивиду, который получает пользу от введения антитела против SEMA4D" и "животное, нуждающееся в лечении", подразумевают индивидов, таких как млекопитающие, которые получают пользу от введения антитела против SEMA4D или другой молекулы, связывающей SEMA4D, например, для обнаружения полипептида SEMA4D (т.е. для диагностических процедур) и/или для лечения, включая временное облегчение или профилактику заболевания, с использованием антитела против SEMA4D или другой молекулы, связывающей SEMA4D.

Термин "связывающая молекула" или "антителосвязывающая молекула" в рамках настоящего изобретения относится в широком смысле к молекуле, которая специфически связывает антигенную детерминанту. В одном из вариантов осуществления изобретения связывающая молекула специфически связывается с SEMA4D, например с трансмембранным полипептидом SEMA4D, имеющим молекулярную массу приблизительно 150 кДа, или с растворимым полипептидом SEMA4D, имеющим молекулярную массу приблизительно 120 кДа (который, как правило, называют SSEMA4D). В другом варианте осуществления изобретения связывающая молекула по изобретению представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент. В другом варианте осуществления изобретения связывающая молекула по

изобретению содержит по меньшей мере одну CDR тяжелой или легкой цепи молекулы антитела. В другом варианте осуществления изобретения связывающая молекула по изобретению содержит по меньшей мере две CDR из одной или нескольких молекул антител. В другом варианте осуществления изобретения связывающая молекула по изобретению содержит по меньшей мере три CDR из одной или нескольких молекул антител. В другом варианте осуществления изобретения связывающая молекула по изобретению включает по меньшей мере четыре CDR из одной или нескольких молекул антител. В другом варианте осуществления изобретения связывающая молекула по изобретению содержит по меньшей мере пять CDR из одной или нескольких молекул антител. В другом варианте осуществления изобретения связывающая молекула по изобретению содержит по меньшей мере шесть CDR из одной или нескольких молекул антител.

Настоящее изобретение относится к способу промотирования нейрогенеза у индивида, имеющего нейродегенеративное расстройство, нейровоспалительное расстройство, острую травму головного мозга, а также некоторые дисфункции ЦНС, где способ включает введение индивиду молекулы, связывающей SEMA4D, например антитела или его антигена связывающего фрагмента, варианта или производного. Если нет специального указания на полноразмерные антитела, такие как встречающиеся в природе антитела, термин "антитело против SEMA4D" охватывает полноразмерные антитела, а также их антигена связывающие фрагменты, варианты, аналоги или производные этих антител, например природных антител или молекул иммуноглобулина, или сконструированных молекул антител или фрагментов, которые связываются с антигеном, как связываются молекулы антител.

В настоящем описании термины "человеческие" или "полностью человеческие" антитела включают антитела, имеющие аминокислотную последовательность иммуноглобулина человека, и включают антитела, выделенные из библиотек иммуноглобулинов человека или из животных, трансгенных по одному или нескольким иммуноглобулинам человека, и которые не экспрессируют эндогенные иммуноглобулины, как описано ниже, и, например, в патенте США 5939598, Kucherlapati et al. Термины "человеческие" или "полностью человеческие" антитела также включают антитела, содержащие, по меньшей мере, вариабельный домен тяжелой цепи или, по меньшей мере, вариабельные домены тяжелой цепи и легкой цепи, где вариабельный домен или домены имеют аминокислотную последовательность вариабельного домена или доменов иммуноглобулина человека.

Термины "человеческие" или "полностью человеческие" антитела также включают "человеческие" или "полностью человеческие" антитела, как описано выше, которые содержат, или состоят, по существу, или состоят из вариантов (в том числе производных) молекул антител (например, областей VH и/или VL), описанных в настоящем документе, где антитела или их фрагменты иммunoспецифически связываются с полипептидом SEMA4D или его фрагментом или вариантом. Могут быть использованы стандартные методы, известные специалистам в данной области, для введения мутаций в нуклеотидную последовательность, кодирующую антитело человека против SEMA4D, включая, но не ограничиваясь этим, сайт-направленный мутагенез и ПЦР-опосредованный мутагенез, которые приводят к аминокислотным заменам. Предпочтительно, когда варианты (в том числе производные) кодируют менее 50 аминокислотных замен, менее 40 аминокислотных замен, менее 30 аминокислотных замен, менее 25 аминокислотных замен, менее 20 аминокислотных замен, менее 15 аминокислотных замен, менее 10 аминокислотных замен, менее 5 аминокислотных замен, менее 4 аминокислотных замен, менее 3 аминокислотных замен, или менее 2 аминокислотных замен по отношению к базовым областям VH, VHCDR1, VHCDR2, VHCDR3, областям VL, VLCDR1, VLCDR2 или VLCDR3.

В некоторых вариантах осуществления изобретения аминокислотные замены являются консервативными заменами аминокислот, как обсуждается ниже. Альтернативно, мутации могут быть введены случайным образом вдоль всей или части кодирующей последовательности, например путем насыщающего мутагенеза, и полученные мутанты могут быть подвергнуты скринингу на биологическую активность для идентификации мутантов, которые сохраняют активность (например, способность связываться с полипептидом SEMA4D, например, человека или мыши, или с полипептидами SEMA4D человека и мыши). Такие варианты (или их производные) "человеческого" или "полностью человеческого" антитела также могут упоминаться как человеческие или полностью человеческие антитела, которые "оптимизированы" или "оптимизированы для связывания антигена", и включают антитела, которые имеют улучшенное средство к антигену.

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

Как используется в настоящем описании, термин "иммуноглобулин" включает различные широкие классы полипептидов, которые можно выделить биохимически. Специалистам в данной области известно, что тяжелые цепи классифицируют как гамма, мю, альфа, дельта, эпсилон, или γ , μ , α , δ , ϵ , с некоторыми их подклассами (например, $\gamma 1$ - $\gamma 4$). 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.п., хорошо охарактеризованы и, как известно, они связаны с функциональной специализацией. Модифицированные варианты каждого из этих классов и изотипов легко идентифицируются специалистами в данной области с учетом раскрытия настоящего описания, и, соответственно, они входят в объем данного изобретения. Ясно, что все классы иммуноглобулинов находятся в пределах объема притязаний настоящего изобретения, при этом последующее обсуждение, как правило, будет направлено на молекулы иммуноглобулинов класса IgG. Что касается IgG, стандартная молекула иммуноглобулина состоит из двух идентичных полипептидных легких цепей с молекулярной массой около 23000 Да и двух идентичных полипептидных тяжелых цепей с молекулярной массой 53000-70000 Да. Четыре цепи, как правило, соединены дисульфидными связями в конфигурации "Y", где легкие цепи присоединены к тяжелыми цепями, начиная с устья "Y", и продолжаются через вариабельную область.

Легкие цепи классифицируются как каппа или лямбда (κ , λ). Тяжелая цепь каждого класса может быть связана с легкой цепью каппа или с легкой цепью лямбда. В целом, легкие и тяжелые цепи ковалентно связаны друг с другом, и "хвостовые" участки двух тяжелых цепей соединены друг с другом посредством ковалентных дисульфидных связей или нековалентных связей, когда иммуноглобулины производятся с помощью гибридом, В-клетками или в генно-инженерных клетках-хозяевах. Аминокислотные последовательности тяжелой цепи считаются с N-конца на раздвоенных концах Y-структуры в направлении к C-концу в нижней части каждой цепи.

Как легкие, так и тяжелые цепи делятся на области по структурной и функциональной гомологии. Термины "константные" и "вариабельные" области отражают функциональности. В связи с этим следует иметь в виду, что вариабельные домены легкой (VL или VK) и тяжелой (VH) цепей определяют распознавание антигенов и специфичность. С другой стороны, константные домены легкой цепи (CL) и тяжелой цепи (CH1, CH2 или CH3) обуславливают важные биологические свойства, такие как секреция, трансплацентарное проникновение, связывание Fc-рецептора, связывание комплемента и т.п. По соглашению, нумерация доменов константной области растет по мере их дистального удаления от антигенсвязывающей области или от амино-конца антитела. N-концевая часть представляет собой вариабельную область, а на C-конце расположена константная область; домены CH3 и CL фактически охватывают карбокси-конец, соответственно, тяжелой цепи и легкой цепи.

Как указано выше, вариабельная область антитела позволяет избирательно распознавать и специфически связывать эпитопы на антигенах. То есть домен VL и домен VH, или подмножество областей, определяющих комплементарность (CDR), в пределах этих вариабельных доменов антитела объединены, образуя вариабельную область, которая определяет трехмерный антигенсвязывающий сайт. Эта четвертичная структура антитела образует сайт связывания антигена, присутствующий на конце каждого плеча структуры Y. Более конкретно, сайт связывания антигена определяется тремя CDR каждой из цепей VH и VL. В некоторых случаях, например, для некоторых молекул иммуноглобулинов, полученных из верблюдов видов или сконструированных на основе иммуноглобулинов верблюдов, полные молекулы иммуноглобулина могут состоять только из тяжелых цепей, без каких-либо легких цепей. См., например, Hamers-Casterman et al., Nature 363:446-448 (1993).

В природных антителах шесть "определяющих комплементарность областей" или "шесть CDR", присутствующих в каждом антигенсвязывающем домене, являются короткими, несмежными аминокислотными последовательностями, которые расположены специфически, с образованием антигенсвязывающего домена антитела, что обуславливает его трехмерную конформацию в водной среде. Остальная часть аминокислот в антигенсвязывающих доменах называется "каркасными" областями, имеют меньшую межмолекулярную вариабельность. Каркасные области имеют в значительной степени β -складчатую конформацию, и CDR образуют петли, которые соединяют, а в некоторых случаях и являются частью структуры β -складок. Таким образом, каркасные области формируют каркас, который обеспечивает размещение CDR в правильной ориентации посредством межцепочечных нековалентных взаимодействий. Антигенсвязывающий домен, образованный расположенными CDR, формирует поверхность, комплементарную эпитопу иммунореактивного антигена. Эта комплементарная поверхность способствует нековалентному связыванию антителу с его родственным эпитопом. Аминокислотные последовательности, содержащие CDR и каркасные области, соответственно, для любого вариабельного домена тяжелой или легкой цепи могут быть легко идентифицированы средним специалистом в данной области, так как они уже были точно определены (см. ниже).

В случае, когда представлены два или более определений термина, который используется и/или принят в данной области, определение термина, использованного в настоящем описании, включает все такие значения, если явно не указано иное. Конкретным примером является использование термина "определяющей комплементарность области" ("CDR"), для описания несмежных объединенных участков антигена, расположенных в вариабельной области обеих полипептидов тяжелых и легких цепей. Эта конкретная область была описана в работе Kabat et al. (1983) U.S. Dept. of Health and Human Services, "Sequences of Proteins of Immunological Interest" и в работе Chothia, Lesk, J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987), которые включены в настоящее описание в качестве ссылки, где определения включают перекрытия или

подмножества аминокислотных остатков, по сравнению друг с другом. Тем не менее, применение определения, относящегося к CDR антитела или его варианту, предназначено для определения объема притяжаний и признаков, и используется в настоящем документе. Соответствующие аминокислотные остатки, которые охватывают CDR, как определено с помощью каждой из приведенных выше ссылок, приведены ниже в таблице для сравнения. Точные количества остатков, которые охватывают определенную CDR, будут меняться в зависимости от последовательности и размера CDR. Специалисты в данной области могут определить, какие остатки соответствуют конкретной CDR для конкретной аминокислотной последовательности вариабельного участка антитела.

Определения для CDR¹

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

¹ Нумерация всех определений для CDR в таблице приведена в соответствии обычной нумерацией по Kabat (см. ниже).

В работе Kabat также определена система нумерации для последовательностей вариабельного домена, которая применяется для любого антитела. Специалист в данной области может однозначно использовать эту систему нумерации "по Kabat" к любой последовательности вариабельного домена, без использования каких-либо дополнительных экспериментальных данных, выходящих за пределы этой последовательности. Как в настоящем описании используется, обозначение "нумерация по Kabat" относится к системе нумерации, установленной в работе Kabat et al. (1983) U.S. Dept. of Health and Human Services, "Sequence of Proteins of Immunological Interest". Если не указано иное, ссылки на номера конкретных положений аминокислотных остатков в последовательностях антитела против SEMA4D или его антигенсвязывающего фрагмента, варианта или его производного, по настоящему изобретению, приведены в соответствии с системой нумерации по Kabat.

Антитела по изобретению или их антигенсвязывающие фрагменты, варианты или производные включают, но не ограничиваются ими, поликлональные, моноклональные, мультиспецифические, человеческие, гуманизированные, приматизированные или химерные антитела, одноцепочечные антитела, эпигопсвязывающие фрагменты, например, такие как Fab, Fab' и F(ab')₂, Fd, Fv, одноцепочечные Fv (ScFv), дисульфидсвязанные Fv (sdFv), фрагменты, содержащие домен VL или домен VH, фрагменты, полученные с помощью библиотеки, экспрессирующей Fab, и анти-идиотипические (анти-Id) антитела (в том числе, например, антитела против Id к антителам против SEMA4D, раскрытых в настоящем документе). Молекулы ScFv известны в данной области и описаны, например, в патенте США 5892019. Иммуноглобулины или молекулы антител по изобретению могут быть молекулами иммуноглобулина любого типа (например, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA и IgY), любого класса (например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и IgA2 и т.п.) или любого подкласса.

Как используется в настоящем описании, термин "часть тяжелой цепи" включает аминокислотные последовательности, полученные из тяжелой цепи иммуноглобулина. В некоторых вариантах осуществления изобретения полипептид, содержащий часть тяжелой цепи, содержит по меньшей мере одно из следующего: домен VH, домен CH1, шарнирную область (например, верхнюю, среднюю и/или нижнюю шарнирную область), домен CH2, домен CH3 или его вариант или фрагмент. Например, связывающий полипептид, используемый в настоящем изобретении, может содержать полипептидную цепь, содержащую домен CH1; полипептидную цепь, содержащую домен CH1, по меньшей мере часть шарнирной области и домен CH2; полипептидную цепь, содержащую домен CH1 и домен CH3; полипептидная цепь, содержащая домен CH1, по меньшей мере часть шарнирной области и домен CH3; или полипептидную цепь, содержащую домен CH1, по меньшей мере часть шарнирной области, домен CH2 и домен CH3. В другом варианте осуществления изобретения полипептид по настоящему изобретению содержит полипептидную цепь, содержащую домен CH3. Кроме того, в связывающем полипептиде, применяемом в настоящем изобретении, может отсутствовать по меньшей мере часть домена CH2 (например, все или часть домена CH2). Как указано выше, любому специалисту в данной области понятно, что эти домены (например, части тяжелой цепи) могут быть модифицированы таким образом, чтобы они различались по аминокислотной последовательности от природной молекулы иммуноглобулина.

В некоторых антителах против SEMA4D или их антигенсвязывающих фрагментах, вариантах или их производных, раскрытых в настоящем описании, части тяжелой цепи одной полипептидной цепи мультимера идентичны тем, которые представлены во второй полипептидной цепи мультимера. В каче-

стве альтернативы, мономеры, содержащие участок тяжелой цепи, по изобретению не являются идентичными. Например, каждый мономер может содержать различные связывающие сайты, нацеленные на конкретные мишени, образуя, например, биспецифические антитела.

Части тяжелой цепи связывающей молекулы, используемой в способах, раскрытых в настоящем документе, могут быть получены из различных молекул иммуноглобулинов. Например, полипептид из части тяжелой цепи может содержать домен CH1, полученный из молекулы IgG1, и шарнирную область, полученную из молекулы IgG3. В другом примере, часть тяжелой цепи может содержать шарнирную область, полученную, в частности, из молекулы IgG1, и шарнирную область, полученную, в частности, из молекулы IgG3. В другом примере часть тяжелой цепи может содержать химерный шарнир, полученный, в частности, из молекулы IgG1 и, в частности, из молекулы IgG4.

Как используется в настоящем описании, термин "часть легкой цепи" подразумевает аминокислотные последовательности, полученные из легкой цепи иммуноглобулина, например из легкой цепи каппа или лямбда. Предпочтительно, когда часть легкой цепи содержит по меньшей мере один домен VL или CL.

Антитела против SEMA4D или антигенсвязывающие фрагменты, варианты или их производные, раскрытые в настоящем описании, могут быть описаны или определены признаками эпитопа(эпитопов) или части(частей) антигена, например признаками полипептида-мишени, раскрытоого в настоящем описании (например, SEMA4D), который они распознают или специфически связываются с ним. Часть полипептида-мишени, который специфически взаимодействует с антигенсвязывающим доменом антитела представляет собой "эпигон" или "антigenную детерминанту". Полипептид-мишень может содержать один эпигон, но, как правило, он содержит по меньшей мере два эпигона, и может включать любое количество эпигонов, в зависимости от размера, конформации и типа антигена. Кроме того, следует отметить, что "эпигон" на полипептиде-мишени может представлять собой или может включать неполипептидные элементы, например эпигон может включать углеводную боковую цепь.

Минимальный размер эпигона пептида или полипептида для антитела, как полагают, состоит из 4-5 аминокислот. Эпигоны пептида или полипептида предпочтительно содержат по меньшей мере семь, более предпочтительно по меньшей мере девять и наиболее предпочтительно от приблизительно 15 до приблизительно 30 аминокислот. Так как CDR может распознавать антигенный пептид или полипептид в своей третичной форме, то аминокислоты, входящие в эпигон, не обязательно должны быть смежными, а в некоторых случаях даже могут находиться на разных пептидных цепях. Эпигоны пептида или полипептида, распознаваемые антителами против SEMA4D по настоящему изобретению, могут содержать последовательность по меньшей мере из 4, по меньшей мере из 5, по меньшей мере из 6, по меньшей мере из 7, более предпочтительно по меньшей мере из 8, по меньшей мере из 9, по меньшей мере из 10, по меньшей мере из 15, по меньшей мере из 20, по меньшей мере из 25 или от приблизительно 15 до приблизительно 30 смежных или несмежных аминокислот SEMA4D.

Выражение "специфически связывает" обычно означает, что антитело связывается с эпигоном через его антигенсвязывающий домен, и что связывание влечет за собой некоторые комплементарности антигенсвязывающего домена и эпигона. В соответствии с этим определением, антитело "специфически связывается" с эпигоном, когда оно связывается с его эпигоном с помощью своего антигенсвязывающего домена более легко, чем он бы связывался со случайным, не родственным этому антителу, эпигоном. Термин "специфичность" используется в настоящем описании для определения относительной аффинности, с которой конкретное антитело связывается с определенным эпигоном. Например, антитело "A" может рассматриваться как имеющее более высокую специфичность для данного эпигона, чем антитело "B", или можно сказать, что антитело "A" связывается с эпигоном "C" с более высокой специфичностью, чем это имеет место в отношении эпигона "D".

Указание "преимущественно связывается" означает, что антитело специфически связывается с эпигоном более легко, чем оно могло бы связываться со схожим, близким, гомологичным или аналогичным эпигоном. Таким образом, антитело, которое "преимущественно связывается" с данным эпигоном, более вероятно связывается с таким эпигоном, чем со схожим эпигоном, несмотря на то, что такие антитела могут перекрестно реагировать со схожим эпигоном.

В качестве неограничивающего примера могут быть рассмотрены антитела, которые предпочтительно связываются с первым эпигоном, если он связывается с указанным первым эпигоном с константой диссоциации (K_D), которая меньше, чем K_D антитела для второго эпигона. В другом неограничивающем примере антитело может быть определено как преимущественно связывающееся с первым антигеном, если оно связывается с первым эпигоном с аффинностью, которая по меньшей мере на один порядок меньше, чем K_D антитела для второго эпигона. В другом неограничивающем примере антитело может быть определено как предпочтительно связывающееся с первым эпигоном, если оно связывается с первым эпигоном с аффинностью, которая по меньшей мере на два порядка меньше, чем K_D антитела для второго эпигона.

В другом неограничивающем примере может быть рассмотрено антитело, которое предпочтительно связывается с первым эпигоном, если оно связывается с первым эпигоном со скоростью диссоциации (k_{off}), которая меньше чем k_{off} антитела для второго эпигона. В другом неограничивающем примере

антитело может быть определено как предпочтительно связывающееся с первым эпитопом, если оно связывается с первым эпитопом с аффинностью, которая по меньшей мере на один порядок меньше, чем $k(\text{off})$ антитела для второго эпитопа. В другом неограничивающем примере антитело может быть определено как предпочтительно связывающееся с первым эпитопом, если оно связывается с первым эпитопом с аффинностью, которая по меньшей мере на два порядка меньше чем $k(\text{off})$ антитела для второго эпитопа. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, вариант или производное, раскрытое в настоящем описании, может быть определено как связывающее целевой полипептид (пептид-мишень), раскрытый в настоящем описании (например, SEMA4D человека или мыши, или SEMA4D человека и мыши), или его фрагмент или вариант со скоростью диссоциации ($k(\text{off})$), которая меньше или равна $5 \times 10^{-2} \text{ c}^{-1}$, 10^{-2} c^{-1} , $5 \times 10^{-3} \text{ c}^{-1}$ или 10^{-3} c^{-1} . Более предпочтительно, когда антитело по изобретению может быть определено как связывающее целевой полипептид, раскрытый в настоящем описании (например, SEMA4D человека или мыши или SEMA4D человека и мыши), или его фрагмент или вариант со скоростью диссоциации ($k(\text{off})$), которая меньше или равна $5 \times 10^{-4} \text{ c}^{-1}$, 10^{-4} c^{-1} , $5 \times 10^{-5} \text{ c}^{-1}$ или 10^{-5} c^{-1} , $5 \times 10^{-6} \text{ c}^{-1}$, 10^{-6} c^{-1} , $5 \times 10^{-7} \text{ c}^{-1}$ или 10^{-7} c^{-1} .

Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, вариант или производное, раскрытое в настоящем описании, может быть определено как связывающее целевой полипептид (пептид-мишень), раскрытый в настоящем описании (например, SEMA4D, например человека или мыши или SEMA4D человека и мыши), или его фрагмент или вариант, со скоростью ассоциации ($k(\text{on})$), которая больше или равна $10^3 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$, $5 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$, $10^4 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$ или $5 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$. Более предпочтительно, когда антитело по изобретению может быть определено как связывающее целевой полипептид, раскрытый в настоящем описании (например, SEMA4D человека или мыши или SEMA4D человека и мыши), или его фрагмент или вариант со скоростью ассоциации ($k(\text{on})$), которая больше или равна $10^5 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$, $5 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$, $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$ или $5 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$ или $10^7 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$.

Считается, что антитело конкурентно ингибитирует связывание референсного антитела с данным эпитопом, если оно преимущественно связывается с этим эпитопом в такой степени, что оно в определенной степени блокирует связывание референсного антитела с эпитопом. Конкурентное ингибирование может быть определено с помощью любого способа, известного в данной области, например, с помощью конкурентного иммуноферментного твердофазного анализа (ELISA). Антитело по изобретению может быть определено как конкурентно ингибирующее связывание референсного 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 не менее чем на 50%.

Как используется в настоящем описании, термин "аффинность" относится к мере прочности связывания отдельного эпитопа с CDR молекулы иммуноглобулина. См., например, Harlow et al. (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed.) pages 27-28. Как используется в настоящем описании, термин "авидность" относится к общей стабильности комплекса между популяцией (совокупностью) иммуноглобулинов и антигеном, т.е. к функциональной прочности объединения смеси иммуноглобулинов с антигеном. См., например, Harlow et al., pages 29-34. Авидность относится к аффинности отдельных молекул иммуноглобулинов, находящихся в популяции, к конкретным эпитопам, а также к валентности иммуноглобулинов и антигена. Например, взаимодействие между двухвалентным моноклональным антителом и антигеном с высокоповторяющейся структурой эпитопа, например такого как полимер, будет являться примером высокой авидности.

Антитела против SEMA4D по изобретению или их антигенсвязывающие фрагменты, варианты или производные могут быть также описаны или определены через их перекрестную активность. Как используется в настоящем описании, термин "перекрестная активность" относится к способности антитела, специфического в отношении одного антигена, реагировать со вторым антигеном; и отражает меру схожести между двумя разными антигенными веществами. Таким образом, антитело обладает перекрестной активностью, если оно связывается с эпитопом, отличным от того, который индуцировал формирование этого антитела. Эпитоп с перекрестной активностью обычно содержит многие из одинаковых комплементарных структурных особенностей, как и у индуцирующего эпитопа, а в некоторых случаях он может подходить лучше, чем оригинальный эпитоп.

Например, некоторые антитела имеют некоторую степень перекрестной активности, состоящей в том, что они связывают схожие, но не идентичные эпитопы, например эпитопы, имеющие 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% идентичности (на основании расчета с использованием способов, известных в данной области и описанных в настоящем документе) с референсным эпитопом. Считается, что антитело практически не имеет перекрестной активности, если оно не связывается с эпитопом, имеющим менее 95%, менее 90%, менее 85%, менее 80%, менее 75%, менее 70%, менее 65%, менее 60%, менее 55% и менее 50% идентичности (на основании расчета с использованием способов, известных в данной области и описанных в настоящем документе) с референсным эпитопом. Антитело считается "высокоспецифичным" в отношении определенного эпитопа, если оно не связывается с любым другим аналогом, ортологом или

гомологом этого эпитопа.

Молекулы, связывающие SEMA4D, например антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, варианты или производные по изобретению, могут также быть описаны или определены по их аффинности связывания с полипептидом по изобретению, например с SEMA4D человека или мыши или SEMA4D человека и мыши. Предпочтительные аффинности связывания включают такие, которые характеризуются константой диссоциации или величиной K_d меньшей, чем 5×10^{-2} М, 10^{-2} М, 5×10^{-3} М, 10^{-3} М, 5×10^{-4} М, 10^{-4} М, 5×10^{-5} М, 10^{-5} М, 5×10^{-6} М, 10^{-6} М, 5×10^{-7} М, 10^{-7} М, 5×10^{-8} М, 10^{-8} М, 5×10^{-9} М, 10^{-9} М, 5×10^{-10} М, 10^{-10} М, 5×10^{-11} М, 10^{-11} М, 5×10^{-12} М, 10^{-12} М, 5×10^{-13} М, 10^{-13} М, 5×10^{-14} М, 10^{-14} М, 5×10^{-15} М или 10^{-15} М. В некоторых вариантах осуществления изобретения молекула, связывающая SEMA4D, например антитело или антигенсвязывающий фрагмент по изобретению, связывается с SEMA4D человека с K_d от приблизительно 5×10^{-9} до приблизительно 6×10^{-9} . В другом варианте осуществления изобретения молекула, связывающая SEMA4D, например антитело или антигенсвязывающий фрагмент по изобретению, связывается с SEMA4D мыши с K_d от приблизительно 1×10^{-9} до приблизительно 2×10^{-9} .

Как используется в настоящем описании, термин "химерное антитело" подразумевает любое антитело, в котором иммунореактивная область или сайт получен или выделен из первого вида, и константная область (которая может быть интактной, частичной или модифицированной в соответствии с настоящим изобретением) получена из второго вида. В предпочтительных вариантах осуществления изобретения область или сайт связывания мишени происходит из источника, не являющегося человеком (например, от мыши или примата), а константная область является областью человека.

Как используется в настоящем описании, термин "сконструированное антитело" относится к антителу, в котором вариабельный домен в тяжелой или легкой цепи или в обеих цепях изменен по меньшей мере путем частичной замены одного или нескольких CDR из антитела с известной специфичностью и, в случае необходимости, путем частичной замены каркасной области и изменения последовательности. Несмотря на то, что CDR могут быть получены из антитела такого же класса или даже подкласса антитела, из которого получают каркасные области, предполагается, что CDR получают из антитела другого класса и предпочтительно из антитела от других видов. Сконструированное антитело, в котором одна или несколько "донорных" CDR из антитела, полученного из источника, не являющегося человеком, с известной специфичностью привиты к тяжелой или легкой цепи каркасной области антитела человека, называется в настоящем описании как "гуманизированное антитело". Иногда нет необходимости заменять все CDR на полные CDR из вариабельного домена доноров для переноса антигенсвязывающей емкости одного вариабельного домена в другой. Скорее может быть необходимо только перенести такие остатки, которые необходимы для поддержания активности сайта связывания с мишенью.

Кроме того, считается, что каркасные области в пределах вариабельного домена в тяжелой или легкой цепи или в обеих цепях гуманизированного антитела могут содержать только остатки, характерные для антитела человека, то в этом случае эти каркасные области гуманизированного антитела, называются "полностью человеческие каркасные области" (например, MAb VX 15/2503, раскрытое в заявке на патент США US 2010/0285036 A1 как MAb 2503, включенной в настоящее изобретение в полном объеме в качестве ссылки). В качестве альтернативы один или несколько остатков каркасной области(областей) вариабельного домена донора могут быть встроены в соответствующие положения человеческой каркасной области(областей) вариабельного домена тяжелой или легкой цепи или в обеих цепях из гуманизированного антитела, если необходимо поддерживать необходимое связывание или повышенное связывание с антигеном SEMA4D. Каркасная область человека, которая сконструирована таким образом, будет включать смесь остатков из человеческого каркаса и каркаса донора, упоминается в настоящем описании как "частично человеческая каркасная область".

Например, гуманизация антитела против SEMA4D может быть, по существу, выполнена способом, разработанным Winter и сотрудниками (Jones et al., Nature 321:522-525 (1986); Riechmann et al., Nature 332:323-327 (1988); Verhoeven et al., Science 239:1534-1536 (1988)), путем замены CDR грызуна или мутантной CDR грызуна или последовательностей CDR на соответствующие последовательности антитела человека против SEMA4D. См. также патент США 5225539; 5585089; 5693761; 5693762; 5859205; содержание которых включено в настоящее описание в качестве ссылки. Полученное гуманизированное антитело против SEMA4D будет содержать по меньшей мере одну CDR грызуна или мутантную CDR грызуна в пределах полностью человеческих каркасных областей вариабельного домена тяжелой и/или легкой цепи гуманизированного антитела. В некоторых случаях остатки в каркасных областях одного или нескольких вариабельных доменов гуманизированного антитела против SEMA4D заменены на соответствующие остатки, не происходящие из антитела человека (например, от антитела грызунов) (см., например, патенты США 5585089; 5693761; 5693762 и 6180370), и в этом случае полученное гуманизированное антитело против SEMA4D будет включать частично человеческие каркасные области в пределах вариабельного домена тяжелой и/или легкой цепи.

Кроме того, гуманизированные антитела могут содержать остатки, которые не встречаются в антите-реципiente или в антителе-доноре. Эти модификации выполняют для дополнительного улучшения свойств антител (например, для получения желаемой аффинности). В целом, гуманизированное антитело

будет содержать, по существу, все CDR из по меньшей мере одного, а обычно из двух вариабельных доменов, где все или, по существу, все CDR соответствуют таковым в нечеловеческом иммуноглобулине, а все или, по существу, все каркасные области имеют последовательности иммуноглобулина человека. Гуманизированное антитело необязательно также будет содержать по меньшей мере часть константной области иммуноглобулина (Fc), обычно иммуноглобулина человека. Для получения более подробной информации см. Jones et al., *Nature* 331:522-525 (1986); Riechmann et al., *Nature* 332:323-329 (1988); и Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2:593-596 (1992); содержание которых включено в настоящее описание в качестве ссылки. Соответственно, такие "гуманизированные" антитела могут включать антитела, в которых, по существу, менее чем интактный человеческий вариабельный домен заменен на соответствующую последовательность из видов, не относящихся к человеку. На практике гуманизированные антитела являются, как правило, антителами человека, в которых некоторые остатки в CDR и, возможно, некоторые остатки в каркасе заменены остатками из аналогичных участков антител грызунов. См., например, патенты США 5225539; 5585089; 5693761; 5693762 и 5859205. См. также патент США 6180370 и международную публикацию WO 01/27160, где раскрыты гуманизированные антитела и способы получения гуманизированных антител, обладающих улучшенной аффинностью к заранее определенным антигенам.

II. Нервные стволовые клетки/клетки-прекурсоры или нервные стволовые клетки/клетки-предшественники (NSPC).

Нейрогенез в целом относится к продуцированию новых нейронов. Традиционно считалось, что нейрогенез происходит только во время эмбрионального и раннего постнатального периода, и не имеет важной роли в мозге взрослого. Однако в последние годы установлено, что нейрогенез происходит в отдельных областях мозга взрослых млекопитающих, и он может быть стимулирован в них, а также в других областях, в ответ на повреждение.

Нервные стволовые клетки во время развития центральной нервной системы и периферической нервной системы пролиферируют и разделяются на клетки-предшественники, которые в конечном итоге дифференцируются в клеточные типы, которые составляют мозг взрослого человека. Клетки, полученные из нервной ткани, дают начало нейронам и глии в ЦНС, в то время как клетки, полученные из нервного гребешка, дают начало клеткам периферической нервной системы (ПНС).

Нейрональные стволовые клетки/клетки-предшественники и их терапевтические применения описаны в уровне техники, см., например, патент США 6638501, Bjornson et al.; патент США 6541255, Snyder et al.; патент США 6498018, Carpenter; заявка на патент США 20020012903, Goldman et al.; Palmer et al. (2001) *Nature* 411 (6833):42-3; Palmer et al. (1997) *Mol Cell Neurosci.* 8(6):389-404; Svendsen et al. (1997) *Exp. Neurol.* 148(1):135-46; и Shihabuddin (1999) *Mol Med Today.* 5 (11):474-80. Способы выделения и культивирования нервных стволовых клеток также известны в данной области, см. патент США 6777233; патент США 6497872 и заявка на патент США 20030143737 A1. Все эти документы включены в настоящее описание в качестве ссылки.

Нервные стволовые и клетки-прекурсоры участвуют в нормальном развитии посредством миграции по хорошо известным путям миграции в диссеминируемые области ЦНС, с дифференциацией в типы клеток в ответ на сигналы микросреды, и внедрения в хозяина клеток-предшественников с созданием потомства. Человеческие нервные стволовые клетки способны к экспрессии чужеродных трансгенов в этих местах диссеминации в условиях *in vivo*. Как таковые, эти клетки имеют потенциал для их использования при лечении различных состояний, влияющих на центральную нервную систему, в том числе дегенеративных расстройств (например, болезней Альцгеймера и Паркинсона), острой черепно-мозговой травмы (например, как инсульт, черепно-мозговая травма, церебральный паралич) и большого количества дисфункций ЦНС (например, как депрессия, эпилепсия и шизофrenия).

В последние годы нейродегенеративные заболевания стали важной проблемой в связи с ростом группы населения пожилого возраста, которая подвергается наибольшей опасности в отношении этих расстройств. Эти заболевания, в том числе болезнь Альцгеймера, болезнь Хантингтона, боковой амиотрофический склероз и болезнь Паркинсона, связаны с дегенерацией нервных клеток в определенных областях ЦНС, что приводит к неспособности этих клеток или области мозга выполнять свои предназначенные функции.

Дегенерация в области мозга, известной как базальные ганглии, может привести к заболеваниям с различными познавательными симптомами и моторными симптомами, в зависимости от ее точного положения. Базальные ганглии состоят из множества отдельных участков, в том числе стриатума (полосатое тело, которое состоит из хвостатой доли и путамена), бледного шара, черной субстанции, безымянной субстанции, эллипсоидального участка промежуточного мозга, базального ядра Мейнerta, вентральной области покрышки и субталамического ядра.

При болезни Альцгеймера, например, имеет место дегенерация клеток мозга и коры головного мозга. Кроме того, считается, что дегенерации локализованы в области базального ядра Мейнerta базальных ганглиев. Это ядро обычно посыпает холинергические сигналы в кору головного мозга, которые, как считается, участвуют в познавательных функциях, включая память. С другой стороны, в случае хореи Хантингтона имеет место дегенерация нейронов в полосатом теле, что приводит к непроизвольным подергиваниям тела. Кроме того, при болезни Паркинсона наблюдается дегенерация в другой области ба-

зальных ганглиев, а именно в компактном веществе черной субстанции. Эта область обычно посыпает допаминергические сигналы в дорсальный стриатум, которые играют важную роль в регуляции движения. Терапия болезни Паркинсона направлена на восстановление допаминергической активности в этой цепи. Также возможна дегенерация других участков и областей базальных ганглиев. Например, дегенерация малой области, называемой гипоталамическим ядром, связана с размашистыми колебательными движениями конечностей при состоянии, которое называется баллизм, в то время как дегенерация в путамене и бледном шаре связана с состоянием, при котором имеют место медленные ритмические движения, или с атетозом.

В дополнение к нейродегенеративным заболеваниям острые травмы головного мозга часто приводят к потере нервных клеток, аномальному функционированию пораженного участка мозга и к последующим нарушениям поведения. В дополнение к потере клеток человек может страдать от аномального функционирования оставшихся нервных клеток. Это может иметь место из-за неправильной активации нейронов или из-за аномального синтеза, высвобождения и процессинга нейротрансмиттеров. Эти дисфункции могут быть результатом хорошо изученных и охарактеризованных расстройств, таких как депрессия и эпилепсия, или менее понятных расстройств, таких как неврозы и психозы. Другие формы неврологических нарушений могут возникать в результате дегенерации нейронов, например, при боковом амиотрофическом склерозе и при церебральном параличе, или в результате более острой травмы ЦНС, например, как это имеет место при черепно-мозговой травме (ЧМТ) и инсульте.

III. Описание полипептида-мишени.

В настоящем описании термины "семафорин-4D", "SEMA4D" и "полипептид SEMA4D" используются взаимозаменяющими, так же как и "SEMA4D" и "Sema4D". В некоторых вариантах осуществления изобретения SEMA4D экспрессируется на поверхности клетки или секретируется клеткой. В другом варианте осуществления изобретения SEMA4D связан с мембраной. В других вариантах осуществления изобретения SEMA4D является растворимым, например SSEMA4D. В других вариантах осуществления изобретения SEMA4D может представлять полноразмерный SEMA4D или его фрагмент, или вариант полипептида SEMA4D, где фрагмент SEMA4D или вариант полипептида SEMA4D сохраняет некоторые или все функциональные свойства полноразмерного SEMA4D.

Полноразмерный белок SEMA4D человека представляет собой гомодимерный трансмембранный белок, состоящий из двух полипептидных цепей с молекулярной массой 150 кДа. SEMA4D принадлежит к семейству семафоринов, которые являются рецепторами на клеточной поверхности, и также он упоминается как CD100. Полипептиды SEMA4D/Sema4D человека и мыши протеолитически расщепляются из их трансмембранных форм, с образованием растворимых форм с молекулярной массой 120 кДа, что указывает на существование двух изоформ Sema4D (Kumanogoh et al., J. Cell Science 116(7):3464 (2003)). Семафорины состоят из растворимых и мембраносвязанных белков, которые первоначально были определены как факторы поиска аксонального пути при развитии, которые играют важную роль в установлении точных связей между нейронами и их соответствующей цели. Структурно известный SEMA4D, семафорин класса IV, состоит из аминотерминальной сигнальной последовательности и следующих за ней характерного домена "Sema", который содержит 17 консервативных остатков цистеина, Ig-подобного домена, участка обогащенного лизином, гидрофобной трансмембранной области и цитоплазматического хвоста.

Каждая полипептидная цепь SEMA4D включает сигнальную последовательность из приблизительно 13 аминокислот и следующих за ней доменом семафорина, состоящим из приблизительно 512 аминокислот, Ig-подобного домена, состоящего из приблизительно 65 аминокислот, участка обогащенного лизином, состоящего из 104 аминокислот, гидрофобной трансмембранной области, состоящей из приблизительно 19 аминокислот, и цитоплазматического хвоста, состоящего из 110 аминокислот. Консенсусный сайт для тирозин-fosфорилирования в цитоплазматическом хвосте обеспечивает прогнозируемую связь SEMA4D с тирозинкиназой (Schlossman, et al., Eds. (1995) Leucocyte Typing V (Oxford University Press, Oxford).

Как известно, SEMA4D имеет по меньшей мере три рецептора: плексин-B1, плексин-B2 и CD72. Один из рецепторов, плексин-B1, экспрессируется в нелимфоидных тканях и, как было показано, является для SEMA4D рецептором с высокой аффинностью (1 нМ) (Tamagnone et al., Cell 99:71-80 (1999)). В некоторых вариантах осуществления изобретения плексин-B1 экспрессируют эндотелиальные клетки. Было показано, что стимуляция сигнального пути плексина-B1 за счет воздействия SEMA4D, вызывает коллапс конуса роста нейронов и вызывает развитие коллапса и апоптоза олигодендроцитов (Giraudon et al., J. Immunol. 172:1246-1255 (2004); Giraudon et al., NeuroMolecular Med. 7:207-216 (2005)). После связывания с SEMA4D, сигнальный путь плексина-B1 опосредует инактивацию R-Ras, что приводит к уменьшению опосредованного интегрином прикрепления к внеклеточному матриксу, а также может привести к активации RhoA, что приводит к коллапсу клеток за счет реорганизации цитоскелета. См. Kruger et al., Nature Rev. Mol. Cell Biol. 6:789-800 (2005); Pasterkamp, TRENDS in Cell Biology 15:61-64 (2005)). Плексин-B2 имеет промежуточную аффинность к SEMA4D, и в недавнем сообщении было отмечено, что PLXNB2 экспрессируется на кератиноцитах и активирует SEMA4D-положительные γδ Т-клетки, обеспечивая восстановление эпителия (Witherden et al., Immunity. 2012 Aug; 37 (2):314-25).

Белок CD72 в лимфоидной ткани действует в качестве рецептора SEMA4D с низкой аффинностью (300 нМ) (Kumanogoh et al., Immunity 13:621-631 (2000)). В-клетки и APC экспрессируют CD72, и антитела против CD72 проявляют многие аналогичные эффекты как и sSEMA4D, такие как повышение индуцированных CD40 ответов В-клеток и шеддинг CD23 В-клетками. Как полагают, CD72 действует как негативный регулятор ответов В-клеток путем рекрутирования тирозин-fosфатазы SHP-1, которая может ассоциироваться со многими ингибирующими рецепторами. Взаимодействие CD72 с SEMA4D приводит к диссоциации SHP-1, и к потере этого негативного активирующего сигнала. Было показано, что SEMA4D промотирует стимуляцию Т-клеток, и агрегацию и выживаемость В-клеток в условиях *in vitro*. Добавление клеток, экспрессирующих SEMA4D, или sSEMA4D усиливает пролиферацию В-клеток, индуцированную CD40, и продуцирование иммуноглобулина в условиях *in vitro*, а также ускоряет ответ антител в условиях *in vivo* (Ishida et al., Inter. Immunol. 15:1027-1034 (2003); Kumanogoh and H. Kukutani, Trends in Immunol. 22:670-676 (2001)). Растворимый белок sSEMA4D усиливает созревание DC, индуцированное CD40, включая повышающую регуляцию костимуляторных молекул и повышенную секрецию IL-12. Кроме того, sSEMA4D не может ингибировать миграции иммунных клеток, которое можно обратить добавлением блокаторов антител против SEMA4D (Elhabazi et al., J. Immunol. 166:4341-4347 (2001); Delaire et al., J. Immunol. 166:4348-4354 (2001)).

Белок Sema4D экспрессируется на высоком уровне в лимфоидных органах, включая селезенку, thymus и лимфатические узлы, а также в нелимфоидных органах, таких как мозг, сердце и почки. В лимфоидных органах Sema4D в значительной степени экспрессируется на покоящихся Т-клетках, но слабо экспрессируется на покоящихся В-клетках и антигенпрезентирующих клетках (APC), таких как дендритные клетки (DC). Активация клеток увеличивает поверхностную экспрессию SEMA4D, также как и образование растворимого SEMA4D (sSEMA4D).

Характер экспрессии SEMA4D предполагает, что он играет важную физиологическую и патологическую роль в иммунной системе. Было показано, что SEMA4D промотирует активацию В-клеток, агрегацию и выживание; повышает индуцированную CD40 пролиферацию и продукцию антител; улучшает ответ антител на антигены, зависящие от Т-клеток; увеличивает пролиферацию Т-клеток; улучшает созревание дендритных клеток и способность стимулировать Т-клетки; и он непосредственно вовлечен в демиелинизацию и дегенерацию аксонов (Shi et al., Immunity 13:633-642 (2000); Kumanogoh et al., J. Immunol. 169:1175-1181 (2002); и Watanabe et al., J. Immunol. 167:4321-4328 (2001)).

Мыши с нокаутом SEMA4D (SEMA4D^{-/-}) предоставили дополнительные доказательства, что SEMA4D играет важную роль в гуморальном и клеточном иммунном ответе. У мышей SEMA4D^{-/-} отсутствуют аномалии нелимфоидных тканей. Дендритные клетки (DC) мышей SEMA4D^{-/-} обладают слабой аллостимуляторной способностью и имеют дефекты в экспрессии костимулирующих молекул, которые могут быть устранены путем добавления sSEMA4D. У мышей, дефицитных по SEMA4D (SEMA4D^{-/-}), не развивается экспериментальный аутоиммунный энцефаломиелит, индуцированный миелин-олигодендроцитарным гликопротеиновым пептидом, поскольку при отсутствии SEMA4D миелин-олигодендроцитарные гликопротеин-специфические Т-клетки пролиферируются на низком уровне (Kumanogoh et al., J. Immunol. 169:1175-1181 (2002)). Значительное количество растворимого SEMA4D также обнаружено в сыворотке мышей MRL/LPR с высоким риском аутоиммунных нарушений (модель системных аутоиммунных заболеваний, таких как SLE), но не в сыворотке нормальных мышей. Кроме того, уровни sSEMA4D коррелируют с уровнем аутоантител и увеличиваются с возрастом (Wang et al., Blood 97:3498-3504 (2001)). Также было показано, что растворимый SEMA4D накапливается в спинномозговой жидкости и сыворотке пациентов с демиелинизирующим заболеванием, и sSEMA4D индуцирует апоптоз человеческих плорипотентных нервных клеток-прекурсоров (клетки Dev), ингибирует процесс роста и индуцирует апоптоз олигодендроцитов крысы в условиях *in vitro* (Giraudon et al., J. Immunol. 172(2):1246-1255 (2004)). Этот апоптоз блокировался моноклональными антителами против SEMA4D.

IV. Антитела против SEMA4D.

Антитела, которые связываются с SEMA4D, были описаны в данной области ранее. См., например, заявки на патент США 2008/0219971 A1, 2010/0285036 A1 и 2006/0233793 A1, публикации международных патентных заявок WO 93/14125, WO 2008/100995 и WO 2010/129917, и Herold et al., Int. Immunol. 7(1): 1-8 (1995), при этом каждый из указанных документов включен в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме.

Настоящее изобретение в целом относится к способу промотирования нейрогенеза у индивида, имеющего нейродегенеративные расстройства, нейровоспалительные расстройства, острые травмы головного мозга и некоторые дисфункции ЦНС, например, у пациента-человека, где способ включает введение антитела, которое специфически связывается с SEMA4D, или его антигенсвязывающего фрагмента, варианта или производного. В некоторых вариантах осуществления изобретения, антитело блокирует взаимодействие SEMA4D с одним или несколькими его рецепторами, например, с плексином-B1. Антитела против SEMA4D, имеющие эти свойства, могут быть использованы в представленных в настоящем документе способах. Антитела, которые могут быть использованы, включают, но не ограничиваются перечисленными, моноклональные антитела (MAb) VX15/2503, 67 и 76 и их антигенсвязывающие фраг-

менты, варианты или производные, которые подробно описаны в заявке на патент США 2010/0285036 A1. Дополнительные антитела, которые могут быть использованы в предлагаемых в настоящем описании способах, включают антитела BD16 и BB18, описанные в заявке на патент США 2006/0233793 A1, а также их антигенсвязывающие фрагменты, варианты или производные; или любое из MAb 301, MAb 1893, MAb 657, MAb 1807, MAb 1656, MAb 1808, MAb 59, MAb 2191, MAb 2274, MAb 2275, MAb 2276, MAb 2277, MAb 2278, MAb 2279, MAb 2280, MAb 2281, MAb 2282, MAb 2283, MAb 2284 и MAb 2285, а также любые их фрагменты, варианты или производные, как описано в заявке на патент США 2008/0219971 A1. В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело против SEMA4D для использования в способах, представленных в настоящем описании, связывает SEMA4D человека или мыши или связывает SEMA4D человека и мыши. Также пригодными являются антитела, которые связываются с тем же эпигеном, что и любое из указанных выше антител, и/или антитела, которые конкурентно ингибируют любое из указанных выше антител.

Аминокислотные последовательности VH и VK антитела MAb 67 показаны ниже, где области CDR1, CDR2 и CDR3 подчеркнуты.

VH MAb 67:

QVQLQQSGPELVKPGASVKISCKASGYSFSDYYMHWVKQSPENSLEWIGQINPTT
GGASYNQKFKGKATLTVDKSSSTAYMQLKSLTSEESAVYYCTRYYYGRHFDVW
GQGTTVTVSS (SEQ ID NO: 1)

VK MAb 67:

DIVMTQSPASLAVSLGQRATISCKASSVDYDGDSYMNWYQQKPGQPPKLLIYA
ASNLESGIPARFSGSGSGTDFTLNIHPVEEEDAATYYCQQSNEDPYTFGGGTKEI
K (SEQ ID NO: 2)

Аминокислотные последовательности VH (H2160) и VK (L553) гуманизированного антитела MAb 67 ("MAb VX15/2503") показаны ниже, где области CDR1, CDR2 и CDR3 подчеркнуты.

Последовательность H2160:

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYSFSDYYMHWVRQAPGQGLEWMGQIN
PTTGGASYNQKFKGKATITVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARYYYGRHFD
VWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO: 3)

Последовательность L553:

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKASSVDYDGDSYMNWYQQKPGQPPKLLIYA
ASNLESGVPDRFSGSGSGTDFTLTSSLQAEDVAVYYCQQSNEDPYTFGQGTKLEI
K (SEQ ID NO: 4)

В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело против SEMA4D или его антигенсвязывающий фрагмент, вариант или производное, используемое в представленных в настоящем описании способах, имеет аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере приблизительно на 80%, приблизительно на 85%, приблизительно на 88%, приблизительно на 89%, приблизительно на 90%, приблизительно на 91%, приблизительно на 92%, приблизительно на 93%, приблизительно на 94% или приблизительно на 95% идентична аминокислотной последовательности референсной молекулы антитела против SEMA4D, например, такой как VX15/2503 и 67, описанных выше. В дополнительном варианте осуществления изобретения связывающая молекула идентична по меньшей мере приблизительно на 96%, приблизительно на 97%, приблизительно на 98%, приблизительно на 99% или на 100% идентична последовательности референсного антитела.

В другом варианте осуществления изобретения антитело против SEMA4D или его антигенсвязывающий фрагмент, вариант или производное, используемое в способах настоящего изобретения, содержит, состоит, по существу, или состоит из вариабельного домена тяжелой цепи (VH домена) иммуноглобулина, где по меньшей мере одна из CDR домена VH имеет аминокислотную последовательность, которая идентична по меньшей мере приблизительно на 80%, приблизительно на 85%, приблизительно на 90%, приблизительно на 95%, приблизительно на 96%, приблизительно на 97%, приблизительно на 98% приблизительно на 99% или полностью идентична CDR1, CDR2 или CDR3 из последовательности SEQ ID NO: 1 или 3.

В другом варианте осуществления изобретения антитело против SEMA4D или его антигенсвязывающий фрагмент, вариант или производное, используемое в способах настоящего изобретения, содержит, состоит, по существу, или состоит из вариабельного домена тяжелой цепи (VH домена) иммуноглобулина, где по меньшей мере одна из CDR домена VH имеет аминокислотную последовательность, которая идентична по меньшей мере приблизительно на 80%, приблизительно на 85%, приблизительно на 90%, приблизительно на 95%, приблизительно на 96%, приблизительно на 97%, приблизительно на 98%, приблизительно на 99% или полностью идентична последовательности SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6 или SEQ ID NO: 7.

В другом варианте осуществления изобретения антитело против SEMA4D или его антигенсвязывающий фрагмент, вариант или производное, используемое в способах настоящего изобретения, содержит

жит, состоит, по существу, или состоит из вариабельного домена тяжелой цепи (VH домена) иммуноглобулина, где по меньшей мере одна из CDR домена VH имеет аминокислотную последовательность, которая идентична, за исключением 1, 2, 3, 4 или 5 консервативных аминокислотных замен, последовательности SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6 или SEQ ID NO: 7.

В другом варианте осуществления изобретения антитело против SEMA4D или его антигенсвязывающий фрагмент, вариант или производное, используемое в способах настоящего изобретения, содержит, состоит, по существу, или состоит из домена VH, который имеет аминокислотную последовательность, которая идентична по меньшей мере приблизительно на 80%, приблизительно на 85%, приблизительно на 90%, приблизительно на 91%, приблизительно на 92%, приблизительно на 93%, приблизительно на 94%, приблизительно на 95%, приблизительно на 96%, приблизительно на 97%, приблизительно на 98%, приблизительно на 99% или на 100% идентична последовательности SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 3, где антитело против SEMA4D, содержащее кодированный домен VH, специфически или преимущественно связывается с SEMA4D.

В другом варианте осуществления изобретения антитело против SEMA4D или его антигенсвязывающий фрагмент, вариант или производное, используемое в способах настоящего изобретения, содержит, состоит, по существу, или состоит из вариабельного домена (VL домена) легкой цепи иммуноглобулина, где по меньшей мере одна из CDR домена VL имеет аминокислотную последовательность, которая идентична по меньшей мере приблизительно на 80%, приблизительно на 85%, приблизительно на 90%, приблизительно на 95%, приблизительно на 96%, приблизительно на 97%, приблизительно на 98%, приблизительно на 99% или полностью идентична CDR1, CDR2 или CDR3 последовательности SEQ ID NO: 2 или 4.

В другом варианте осуществления изобретения антитело против SEMA4D или его антигенсвязывающий фрагмент, вариант или производное, используемое в способах настоящего изобретения, содержит, состоит, по существу, или состоит из вариабельного домена (VL домена) легкой цепи иммуноглобулина, где по меньшей мере один из CDR домена VL имеет аминокислотную последовательность, которая идентична приблизительно на 80%, приблизительно на 85%, приблизительно на 90%, приблизительно на 95%, приблизительно на 96%, приблизительно на 97%, приблизительно на 98%, приблизительно на 99% или полностью идентична последовательности SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 или SEQ ID NO: 10.

В другом варианте осуществления изобретения антитело против SEMA4D или его антигенсвязывающий фрагмент, вариант или производное, используемое в способах настоящего изобретения, содержит, состоит, по существу, или состоит из вариабельного домена (VL домена) легкой цепи иммуноглобулина, где по меньшей мере одна из CDR домена VL имеет аминокислотную последовательность, которая идентична за исключением 1, 2, 3, 4 или 5 консервативных аминокислотных замен последовательности SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 или SEQ ID NO: 10.

В другом варианте осуществления изобретения антитело против SEMA4D или его антигенсвязывающий фрагмент, вариант или производное, используемое в способах настоящего изобретения, содержит, состоит, по существу, или состоит из домена VL, который имеет аминокислотную последовательность, которая идентична по меньшей мере приблизительно на 80%, приблизительно на 85%, приблизительно на 90%, приблизительно на 91%, приблизительно на 92%, приблизительно на 93%, приблизительно на 94%, приблизительно на 95%, приблизительно на 96%, приблизительно на 97%, приблизительно на 98%, приблизительно на 99% или на 100% идентична последовательности SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 4, где антитело против SEMA4D, содержащее кодированный домен VL, специфически или преимущественно связывается с SEMA4D.

Кроме того, в способах, представленных в настоящем описании, где используются кодированные полипептиды, антитела против SEMA4D, или их антигенсвязывающие фрагменты, варианты или производные, как описано в настоящем документе, могут использоваться полинуклеотиды, кодирующие такие полипептиды, векторы, содержащие такие полинуклеотиды, и клетки-хозяева, содержащие такие векторы или полинуклеотиды, все из которых способны продуцировать антитела против SEMA4D или их антигенсвязывающие фрагменты, варианты или производные в рамках описанных в настоящем документе способов.

Подходящие биологически активные варианты антител против SEMA4D по изобретению могут быть использованы в способах по настоящему изобретению. Такие варианты сохраняют требуемые свойства родительского антитела против SEMA4D в отношении связывания. Способы получения вариантов антител в данной области в целом известны.

Способы мутагенеза и изменений нуклеотидной последовательности хорошо известны в данной области. См., например, Walker and Gaastra, eds. (1983) Techniques in Molecular Biology (MacMillan Publishing Company, New York); Kunkel, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:488-492 (1985); Kunkel et al., Methods Enzymol. 154:367-382 (1987); Sambrook et al. (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor, N.Y.); патент США 4873192; а также другие документы, цитированные в настоящем описании; все эти документы включены в описание посредством ссылки. Руководство по соответствующим аминокислотным заменам, которые не влияют на биологическую активность представляющего интерес полипептида, может быть найдено в белковой модели (Dayhoff et al. (1978), Atlas of Protein Sequence and Struc-

ture (Natl. Biomed. Res. Found., Washington, D.C.), pp. 345-352); этот документ включен в описание посредством ссылки. Модель Dayhoff использует приемлемую точечную мутацию (PAM) аминокислоты в матрице подобия (матрица PAM 250), чтобы определить подходящие консервативные аминокислотные замены. Консервативные замены, такие как замена одной аминокислоты на другую, имеющую аналогичные свойства, могут оказаться предпочтительными. Примеры консервативных аминокислотных замен, как предполагается в матрице PAM 250 по модели Dayhoff включают, но не ограничиваются перечисленными, Gly↔Ala, Val↔Ile↔Leu, Asp↔Glu, Lys↔Arg, Asn↔Gln и Phe↔Trp↔Tyr.

При конструировании вариантов молекулы, связывающей SEMA4D, например антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, представляющих интерес полипептидов, модификации выполняют таким образом, что варианты по-прежнему обладают требуемыми свойствами, например способностью специфически связываться с SEMA4D, например с SEMA4D человека или мыши, или с SEMA4D человека и мыши, например, способностью экспрессии на поверхности клетки или секретироваться клеткой, и обладать активностью по блокированию SEMA4D, как описано в настоящем описании. Очевидно, что любые мутации, выполненные в ДНК, кодирующей вариант полипептида, не должны выходить за последовательность рамки считывания и предпочтительно не должны создавать комплементарные участки, которые могут создавать вторичную структуру мРНК. См. патент EP 75444.

Способы оценки свойств связывающей молекулы против SEMA4D, например антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, варианта или производного по специфичности связывания включают, но не ограничиваются перечисленными, стандартные анализы конкурентного связывания, анализы по мониторингу секреции иммуноглобулина Т-клетками или В-клетками, анализы пролиферации Т-клеток, анализы апоптоза, анализы ELISA и тому подобное. См., например, такие анализы, которые описаны в 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), при этом все эти документы включены в настоящее описание в качестве ссылки.

При обсуждении в настоящем документе вопроса о том, является ли какой-либо конкретный полипептид, в том числе константные области, CDR, VH домены или VL домены, описанные в настоящем документе, идентичным по меньшей мере приблизительно на 65%, приблизительно на 70%, приблизительно на 75%, приблизительно на 80%, приблизительно на 85%, приблизительно на 90%, приблизительно на 91%, приблизительно на 92%, приблизительно на 93%, приблизительно на 94%, приблизительно на 95%, приблизительно на 96%, приблизительно на 97%, приблизительно на 98%, приблизительно на 99% или даже идентичными приблизительно на 100% другому полипептиду, то процент идентичности может быть определен с использованием методов и компьютерных программ/программного обеспечения, которые известны в данной области, например, но не ограничиваясь этой программой, программа BESTFIT (Wisconsin Sequence Analysis Package, Version 8 for Unix, Genetics Computer Group, University Research Park, 575 Science Drive, Madison, Wis. 53711). Программа BESTFIT использует алгоритм локальной гомологии Смита и Уотермана (Smith and Waterman (1981) *Adv. Appl. Math.* 2:482-489) для поиска лучшего сегмента гомологии между двумя последовательностями. При использовании программы BESTFIT или любой другой программы выравнивания последовательностей для определения того, является ли конкретная последовательность идентична, например, на 95% референсной последовательности в соответствии с настоящим изобретением, то устанавливают параметры таким образом, чтобы процент идентичности вычислялся в отношении полной длины последовательности референсного полипептида и чтобы пробелы в гомологии составляли до 5% от общего количества аминокислот в референсной последовательности.

Для целей настоящего изобретения процент идентичности последовательности может быть определен с помощью алгоритма поиска гомологии Смит-Уотермана с использованием поиска аффинного пропуска со штрафом за открытие равным 12, и штрафа расширения пропуска равным 2, с использованием матрицы BLOSUM 62. Алгоритм поиска гомологии Смит-Уотермана раскрыт в Smith and Waterman (1981) *Adv. Appl. Math.* 2:482-489. Вариант, например, может отличаться от референсного антитела против SEMA4D (например, антитела MAb VX15/2503, 67 или 76) всего лишь на 1-15 аминокислотных остатков, на 1-10 аминокислотных остатков, на 6-10, на 5, на 4, на 3, на 2 или даже на 1 аминокислотный остаток.

Константная область антитела против SEMA4D может быть мутирована для изменения эффекторной функции несколькими способами. Например, см. патент США 6737056 B1 и заявку на патент США 2004/0132101 A1, где раскрыты Fc мутации, которые оптимизируют связывания антитела с Fc-рецепторами.

В некоторых случаях у антител против SEMA4D или их фрагментов, вариантов или производных, полезных в рамках представленных в настоящем описании способов, часть Fc может быть мутирована для снижения эффекторной функции, используя способы, известные в данной области. Например, делеция или инактивация (через точечные мутации или другим образом) константной области домена может уменьшить связывание Fc рецептора с циркулирующим модифицированным антителом, увеличивая тем самым локализацию опухоли. В других случаях модификации константной области в рамках настоящего

изобретения модерирует связывание комплемента и, таким образом, уменьшает время полужизни в сыворотке. Другие модификации константной области также могут быть использованы для модификации дисульфидных мостиков или олигосахаридных фрагментов, что обеспечивает повышение локализации благодаря увеличению антигенной специфичности антител или гибкости. Результирующий физиологический профиль, биодоступность и другие биохимические эффекты от модификаций, такие как локализация опухоли, биодоступность и время полужизни в сыворотке крови, могут быть легко измерены и подсчитаны с использованием хорошо известных иммунологических методов, без излишнего экспериментирования.

Антитела против SEMA4D, применяемые в способах, представленных в настоящем описании, включают производные, которые модифицированы, например, с помощью ковалентного присоединения любого типа молекулы к антителу, и включают такие, у которых ковалентное присоединение не мешает антителу специфически связываться с родственным эпитопом. Например, но не в качестве ограничения, производные антител включают антитела, которые были модифицированы, например, путем гликозилирования, ацетилирования, ПЭГилирования, фосфорилирования, амидирования, дериватизацией известных защитных/блокирующих групп, протеолитическим расщеплением, связыванием с клеточным лигандром или с другим белком и т.п. Любая из множества химических модификаций может быть выполнена с помощью известных методов, в том числе, но ими не ограничиваясь, специфическим химическим расщеплением, ацетилированием, формилированием и т.п. Кроме того, производное может содержать одну или несколько неклассических аминокислот.

"Консервативная замена аминокислоты" представляет собой такую замену, где аминокислотный остаток заменен на другой аминокислотный остаток, имеющий боковую цепь с аналогичным зарядом. Семейства аминокислотных остатков, имеющих боковые цепи с аналогичными зарядами известны в уровне техники. Эти семейства включают аминокислоты с основными боковыми цепями (например, лизин, аргинин, гистидин), кислотными боковыми цепями (например, аспарагиновая кислота, глутаминовая кислота), полярными боковыми цепями не имеющими заряда (например, глицин, аспарагин, глутамин, серии, треонин, тирозин, цистеин), неполярными боковыми цепями (например, аланин, валин, лейцин, изолейцин, пролин, фенилаланин, метионин, триптофан), бета-разветвленными боковыми цепями (например, треонин, валин, изолейцин) и ароматическими боковыми цепями (например, тирозин, фенилаланин, триптофан, гистидин). Альтернативно, мутации могут быть введены случайным образом вдоль всей кодирующей последовательности или ее части, например, путем насыщающего мутагенеза, и полученные мутанты могут быть подвергнуты скринингу на биологическую активность для идентификации мутантов, которые сохранили активность (например, способность связывать полипептид SEMA4D, чтобы блокировать взаимодействие SEMA4D с его рецептором, или промотировать нейрогенез у индивида).

Например, можно ввести мутации только в каркасные области или только в области CDR молекулы антитела. Введенные мутации могут быть молчащими или нейтральными миссенс мутациями, то есть не имеющими действия, или имеющими незначительное действие на способность антитела связываться с антигеном. Эти типы мутаций могут быть полезны для оптимизации кодонов или улучшения продукции антител гибридомой. С другой стороны, миссенс мутации, которые не являются нейтральными, могут изменять способность антитела связываться с антигеном. Специалисты в данной области могут разработать и протестировать мутантные молекулы с желаемыми свойствами, такими как без изменений в части активности связывания с антигеном, или с измененной активностью связывания (например, с улучшенной активностью связывания антигена или с измененной специфичностью). После мутагенеза кодируемый белок может быть экспрессирован обычными способами, и функциональные и/или биологические активности кодируемого белка (например, способность иммunoспецифически связываться с по меньшей мере одним эпитопом полипептида SEMA4D) могут быть определены с помощью описанных в настоящем документе способов или с помощью модифицированных способов, известных в данной области.

В некоторых вариантах осуществления изобретения антитела против SEMA4D, применяемые в способах, представленных в настоящем описании, содержат по меньшей мере одну оптимизированную определяющую комплементарность область (CDR). Под "оптимизированной CDR" подразумевается, что CDR была изменена и оптимизирована для улучшения аффинности связывания и/или увеличения активности против SEMA4D, которую получило антитело против SEMA4D за счет включения оптимизированной CDR. "Активность против SEMA4D" или "активность по блокированию SEMA4D" может включать активность, которая модулирует одно или несколько из следующих активностей, связанных с SEMA4D: активации, агрегации и выживание В-клеток; индуцированная CD40 пролиферация и выработка антител; ответ антител на зависимые от Т-клеток антигены; пролиферация Т-клеток или других иммунных клеток; созревание дендритных клеток; демиелинизация и дегенерация аксонов; апоптоз пллюрипотентных нейронных прекурсоров и/или олигодендроцитов; индукция миграции клеток эндотелия; ингибирование спонтанной миграции моноцитов; связывание с клеточной поверхностью плексина-B1 или другого рецептора, или любую другую активность, связанную с растворимым SEMA4D или с SEMA4D, который экспрессируется на поверхности SEMA4D+ клеток. Активность в отношении SEMA4D также может быть связана со снижением заболеваемости или тяжести заболеваний, связанных с экспрессией SEMA4D, включая, но ими не ограничиваясь, некоторые виды рака, включая лимфомы, аутоиммунные

заболевания, воспалительные заболевания, включая воспалительные заболевания центральной нервной системы (ЦНС) и периферической нервной системы (ПНС), отторжения трансплантатов и инвазивный анигогенез. Примеры оптимизированных антител против SEMA4D на основе антител мыши MAAb BD16 и MAAb BB18, описаны в заявке на патент США 2008/0219971 A1, международной заявке на патент WO 93/14125 и в работе Herold et al., Int. Immunol. 7(1): 1-8 (1995), при этом каждый из цитированных документов включен в настоящее описание во всей своей полноте путем ссылки. Модификации могут включать замену аминокислотных остатков в пределах CDR таким образом, что антитело против SEMA4D сохраняет специфичность в отношении антигена SEMA4D и имеет улучшенную аффинность связывания и/или увеличенную активность в отношении SEMA4D.

В некоторых вариантах осуществления изобретения связывающая молекула, например антитело против SEMA4D или его антигенсвязывающий фрагмент, ингибирует активность SEMA4D и/или взаимодействие SEMA4D с рецептором SEMA4D или его частью. В некоторых вариантах осуществления изобретения ингибирование активности SEMA4D включает одно или несколько из следующего: активация, агрегация и/или выживание В-клеток; пролиферация и/или продукция антител, индуцированная CD40; ответ антител на антигены, зависящие от Т-клеток; пролиферация Т-клеток или других иммунных клеток; созревание дендритных клеток; демелинизация и дегенерация аксонов; апоптоз пллюрипотентных нейронных прекурсоров и/или олигодендроцитов; индукция миграции клеток эндотелия; ингибирование спонтанной миграции моноцитов; димеризация SEMA4D; связывание с клеточной поверхности плексина-B1 или другого рецептора, или любая другая активность, связанная с растворимым SEMA4D или с SEMA4D, который экспрессируется на поверхности SEMA4D+ клеток.

Термин "ингибирование", используемый в настоящем описании, может включать частичное или полное блокирование, например, связывания, активности, функции, взаимодействия или другой изменяемой функции.

V. Способы лечения с использованием терапевтических антител против SEMA4D.

Способы по изобретению направлены на использование связывающих SEMA4D молекул, например антител, включая их антигенсвязывающие фрагменты, варианты и производные, для промотирования нейрогенеза у индивида, имеющего нейродегенеративные расстройства, нейровоспалительные расстройства, острые травмы головного мозга и некоторые дисфункции ЦНС. Хотя последующее обсуждение относится к введению антитела против SEMA4D, описанные в настоящем документе способы применимы также к антигенсвязывающим фрагментам, вариантам и производным этих антител против SEMA4D, которые сохраняют желаемые свойства антител против SEMA4D по изобретению, например, они способны специфически связывать SEMA4D, например SEMA4D человека или мыши или SEMA4D человека и мыши, обладают активностью по нейтрализации SEMA4D и/или блокируют взаимодействие SEMA4D с его рецептором, например с плексином-B1.

В одном из вариантов осуществления изобретения лечение включает применение или введение связывающей SEMA4D молекулы, например антитела или антигенсвязывающего фрагмента, как описано в настоящем документе, пациенту, где пациент имеет риск развития или он уже имеет нейродегенеративные расстройства, нейровоспалительные расстройства, острые травмы головного мозга, а также некоторые дисфункции ЦНС. В другом варианте осуществления изобретения лечение включает применение или введение фармацевтической композиции, содержащей связывающую SEMA4D молекулу, например антитело или антигенсвязывающий фрагмент пациенту, где пациент имеет риск развития или он уже имеет нейродегенеративные расстройства, нейровоспалительные расстройства, острые травмы головного мозга, а также некоторые дисфункции ЦНС.

В одном из вариантов осуществления изобретения фармацевтическая композиция, содержащая связывающую SEMA4D молекулу, например антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, может быть доставлена в любой обычной форме, в том числе в любой форме, известной в уровне техники, где оно может пройти гематоэнцефалический барьер (BBB) (то есть действовать на стороне мозга). Из-за взаимодействия SEMA4D с рецептором на астроцитах, которые являются резидентными клетками мозга, важными для поддержания целостности гематоэнцефалического барьера (BBB), применение или введение связывающей SEMA4D молекулы можно выполнять на мозговой стороне гематоэнцефалического барьера, с целью исключения взаимодействия SEMA4D с его рецептором на астроцитах. Способы, обеспечивающие факторы для прохождения через гематоэнцефалический барьер, включают минимизацию величины фактора, обеспечение гидрофобных факторов, которые могут более легко проходить через барьер, конъюгирование модулирующего агента с молекулой-носителем, которая имеет значительный коэффициент проникновения через гематоэнцефалический барьер.

В другом варианте осуществления изобретения фармацевтическая композиция, содержащая связывающую SEMA4D молекулу, например антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, может быть доставлена в любой обычной форме, в том числе в любой форме, известной в уровне техники, где оно может обойти гематоэнцефалический барьер (то есть действовать на стороне крови). Благодаря взаимодействию SEMA4D с рецептором на клетках эндотелия применение или введение связывающей SEMA4D молекулы может происходить на стороне крови гематоэнцефалического барьера. При введении связывающей SEMA4D молекулы путем, который обеспечивает ее действие со стороны крови, в том

числе, например, но не ограничиваясь указанным, внутривенным введением, связывающая SEMA4D молекула будет ингибировать взаимодействие SEMA4D с рецептором SEMA4D или частью рецептора, который экспрессируется на клетках эндотелия. В другом варианте осуществления изобретения гематоэнцефалический барьер может быть обойден, например, путем трансфекции клеток в условиях *in vivo* векторами экспрессии, содержащими гены, которые кодируют факторы роста, так что сами клетки будут продуцировать фактор. Любая полезная генетическая модификация клеток находится в рамках объема настоящего изобретения. Например, в дополнение к генетической модификации клеток для экспрессии факторов роста, клетки могут быть модифицированы для экспрессии других типов неврологических агентов, таких как нейротрансмиттеры. Предпочтительно, когда генетическая модификация выполняется путем инфицирования клеток, выстилающих желудочковые области, рекомбинантными ретровирусами или путем трансфекции, с использованием способов, известных в данной области.

Связывающие SEMA4D молекулы, например антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, как описано в настоящем документе, являются полезными для лечения различных расстройств центральной нервной системы, таких как нейродегенеративные расстройства, нейровоспалительные расстройства, острые травмы головного мозга, а также некоторые дисфункции ЦНС. В некоторых вариантах осуществления изобретения, лечение расстройств центральной нервной системы, таких как нейродегенеративные расстройства, нейровоспалительные расстройства, острые травмы головного мозга и некоторые дисфункции ЦНС, включают промотирование нейрогенеза. В других вариантах осуществления изобретения, лечение расстройств центральной нервной системы, таких как нейродегенеративные расстройства, нейровоспалительные расстройства, острые травмы головного мозга и некоторые дисфункции ЦНС, предназначены для увеличения пролиферации клеток-предшественников. В других вариантах осуществления изобретения лечение расстройств центральной нервной системы, таких как нейродегенеративные расстройства, нейровоспалительные расстройства, острые травмы головного мозга и некоторые дисфункции ЦНС, предназначены для повышения дифференцировки клеток-предшественников. В других вариантах осуществления изобретения, лечение расстройств центральной нервной системы, таких как нейродегенеративные расстройства, нейровоспалительные расстройства, острые травмы головного мозга и некоторые дисфункции ЦНС, предназначено для увеличения выживаемости клеток-предшественников или клеток-прекурсоров.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретение относится к применению связывающих SEMA4D молекул, например антител или их антигенсвязывающих фрагментов, вариантов или производных, в качестве лекарственного средства, в частности, для применения при лечении или профилактики расстройств центральной нервной системы, таких как нейродегенеративные расстройства, нейровоспалительные расстройства, острых травм головного мозга и некоторые дисфункции ЦНС, для промотирования нейрогенеза путем увеличения пролиферации, усиления дифференцировки и/или увеличения выживаемости клеток-предшественников или клеток-прекурсоров. В некоторых вариантах осуществления изобретения, применение увеличивает количество, усиливает дифференцировку и/или увеличивает выживаемость клеток-предшественников.

В соответствии со способами по изобретению по меньшей мере одна связывающая SEMA4D молекула, например антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, вариант или производное, как определено в настоящем описании, может быть использована для промотирования положительного терапевтического ответа в отношении расстройств центральной нервной системы, таких как нейродегенеративные расстройства, нейровоспалительные расстройства, острые травмы головного мозга и некоторые дисфункции ЦНС.

"Положительный терапевтический ответ" в отношении центральной нервной системы подразумевает улучшение состояния при заболевании в сочетании с противовоспалительной активностью, антиangiогенной активностью, антиапоптозной активностью и т.п. этих антител и/или улучшение симптомов, связанных с заболеванием. То есть может наблюдаться антипролиферативное действие, предотвращение дальнейшей пролиферации экспрессирующих SEMA4D клеток или экспрессирующих рецептор SEMA4D клеток, снижение воспалительной реакции, включая, но не ограничиваясь этим, снижение секреции воспалительных цитокинов, молекул адгезии, протеаз, иммуноглобулинов (в случаях, когда клетки, несущие SEMA4D или рецептор SEMA4D, представляют собой В-клетки), их комбинации и т.п., увеличение продукции противовоспалительных белков, снижение количества аутореактивных клеток, увеличение иммунной толерантности, ингибирование выживания аутореактивных клеток, уменьшение апоптоза, снижение миграции клеток эндотелия, увеличение спонтанной миграции моноцитов, уменьшение и/или снижение одного или нескольких симптомов опосредованных стимуляцией клеток, экспрессирующих sSEMA4D или SEMA4D. Такие положительные терапевтические ответы не ограничиваются за счет способов введения, и они могут включать введение донору, в донорную ткань (например, путем перфузии органов), хозяину, любой их комбинации, и тому подобное. В частности, способы, представленные в настоящем описании, направлены на ингибирование, предотвращение, уменьшение, облегчение или снижение развития нейровоспалительного расстройства у пациента. Так, например, улучшение состояния при заболевании может быть охарактеризовано как отсутствие клинически наблюдаемых симптомов, увеличение пролиферации, дифференцировки и/или выживания клеток-предшественников или клеток-

прекурсоров. Связывающие SEMA4D молекулы, например антитела или антигенсвязывающие фрагменты, варианты или производные, могут использоваться в комбинации по меньшей мере с одним или несколькими другими средствами/способами лечения нейровоспалительных расстройств; где дополнительную терапию выполняют до, во время или после терапии с использованием связывающей SEMA4D молекулы, например антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, варианта или производного. Таким образом, когда комбинированные способы лечения включают введение связывающей SEMA4D молекулы, например антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, варианта или производного, в сочетании с введением другого терапевтического средства, способы по изобретению включают совместное введение отдельных препаратов с одновременным или последовательным введением, выполняемым в любом порядке, или введение одного фармацевтического препарата.

VI. Фармацевтические композиции и способы введения.

Способы получения и введения связывающих SEMA4D молекул, например антител или их антигенсвязывающих фрагментов, вариантов или производных, индивиду, нуждающемуся в этом, хорошо известны или могут быть легко определены специалистами в данной области. Способ введения связывающей SEMA4D молекулы, например антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, варианта или производного, может быть, например, пероральным, парентеральным, ингаляционным или топическим. Термин парентеральный, используемый в настоящем описании, включает, например, внутривенное, внутриартериальное, внутрибрюшинное, внутримышечное, подкожное, ректальное или вагинальное введение. Поскольку все эти формы введения рассматриваются как входящие в объем настоящего изобретения, пример формы для введения будет представлять собой раствор для инъекций, в частности раствор для внутривенных или внутриартериальных инъекций или для капельного введения. Подходящая фармацевтическая композиция для инъекций может содержать буфер (например, ацетатный, фосфатный или цитратный буфер), поверхностно-активное вещество (например, полисорбат), необязательно стабилизатор (например, человеческий альбумин) и т.п. Однако в других способах, совместимых с раскрытиями настоящего документа, связывающие SEMA4D молекулы, например антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, варианты или производные, могут быть доставлены непосредственно в область расположения клеточной популяции, требующей такой обработки, увеличивая тем самым воздействие терапевтического агента на большую ткань.

Как уже обсуждалось в настоящем документе, связывающие SEMA4D молекулы, например антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, варианты или производные, могут быть введены в фармацевтически эффективном количестве для лечения нейровоспалительных расстройств в условиях *in vivo*. В этой связи следует понимать, что раскрытые связывающие молекулы могут быть представлены в форме препарата таким образом, чтобы облегчить введение и способствовать стабильности активного средства. В некоторых вариантах осуществления изобретения фармацевтические композиции содержат фармацевтически приемлемый, нетоксичный, стерильный носитель, такой как физиологический раствор, нетоксичные буферы, консерванты и тому подобное. Для целей настоящего изобретения фармацевтически эффективное количество связывающей SEMA4D молекулы, например антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, варианта или производного, подразумевается как количество, достаточное для достижения эффективного связывания с мишенью и достижения преимущества, например, такого, как промотирование нейрогенеза у индивида, имеющего расстройства центральной нервной системы, такие как нейродегенеративные расстройства, нейровоспалительные расстройства, острые травмы головного мозга и некоторые дисфункции ЦНС.

Фармацевтические композиции, используемые в настоящем изобретении, содержат фармацевтически приемлемые носители, включая, например, ионообменные агенты, окись алюминия, стеарат алюминия, лецитин, сывороточные белки, например сывороточный альбумин человека, буферные вещества, такие как фосфаты, глицин, сорбиновая кислота, сорбат калия, смеси неполных глицеридов насыщенных растительных жирных кислот, воду, соли или электролиты, такие как сульфат протамина, динатрий гидрофосфат, гидрофосфат калия, хлорид натрия, соли цинка, коллоидная окись кремния, трисиликат магния, поливинилпирролидон, вещества на основе целлюлозы, полиэтиленгликоль, натриевая соль карбоксиметилцеллюлозы, полиакрилаты, воски, блок-полимеры полиэтилен-полиоксипропилена, полиэтиленгликоль и ланолин.

Препараторы для парентерального введения включают стерильные водные или неводные растворы, супспензии и эмульсии. Примерами неводных растворителей являются пропиленгликоль, полиэтиленгликоль, растительные масла, такие как оливковое масло, и инъекционные органические сложные эфиры, например этилолеат. Водные носители включают, например, воду, спиртовые/водные растворы, эмульсии или супспензии, включая солевые и буферные среды. Фармацевтически приемлемые носители в рамках изобретения включают, но не ограничиваются ими, 0,01-0,1 М и предпочтительно 0,05 М фосфатный буфер или 0,8% физиологический раствор. Другие общепринятые носители для парентеральных форм включают растворы фосфата натрия, декстрозный раствор Рингера, декстрозу и хлорид натрия, раствор Рингера с лактатом или жирные масла. Носители для внутривенных форм включают жидкые и питательные добавки, электролитные добавки, такие как добавки на основе декстрозного раствора Рингера, и тому подобное. Также могут присутствовать консерванты и другие добавки, такие как, например, противо-

микробные средства, антиоксиданты, хелатирующие средства, инертные газы и тому подобное.

Более конкретно, фармацевтические композиции, подходящие для применения в форме инъекций, включают стерильные водные растворы (когда действующее вещество является водорастворимым) или дисперсии и стерильные порошки для получения стерильных инъекционных растворов или дисперсий. В таких случаях композиция должна быть стерильной и должна быть жидкой в такой степени, что ее можно было бы легко вводить с помощью шприца. Она должна быть стабильной в условиях производства и хранения и предпочтительно должна быть защищена от контаминации микроорганизмами, такими как бактерии и грибы. Носитель может быть растворителем или дисперсионной средой, содержащей, например, воду, этанол, полиол (например, глицерин, пропиленгликоль и жидкий полиэтиленгликоль и т.п.) и их подходящие смеси. Необходимую текучесть в случае дисперсии можно поддерживать, например, путем использования покрытия частиц, таким веществом, как лецитин, путем поддержания требуемого размера частиц и путем использования поверхностно-активных веществ. Подходящие композиции для применения в терапевтических способах, раскрытых в настоящем описании, описаны в Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Publishing Co.) 16th ed. (1980).

Предотвращение воздействия микроорганизмов может быть достигнуто за счет использования различных антибактериальных и противогрибковых средств, таких как, например, парабены, хлорбутанол, фенол, аскорбиновая кислота, тимеросал и тому подобное. Во многих случаях в композиции предпочтительно включать изотонические средства, например сахара, многоатомные спирты, такие как маннит, сорбит или хлорида натрия. Пролонгированное всасывание инъекционных композиций может быть достигнуто за счет включения в композицию средства, которое задерживает поглощение, такого как, например, моностеарат алюминия и желатин.

В любом случае стерильные инъекционные растворы могут быть получены путем включения активного соединения (например, антитела против SEMA4D или его антигенсвязывающего фрагмента, варианта или производного, одного или в комбинации с другими активными агентами) в требуемом количестве в соответствующий растворитель с одним ингредиентом или с комбинацией ингредиентов, перечисленных в настоящем описании, при необходимости, с последующей стерилизацией фильтрованием. Как правило, дисперсии получают включением активного соединения в стерильный носитель, который содержит, основную дисперсионную среду и другие необходимые ингредиенты из числа перечисленных выше. В случае стерильных порошков, предназначенных для получения стерильных растворов для инъекций, предпочтительными способами получения являются вакуумная сушка и сушка вымораживанием, которые дают порошок активного ингредиента, плюс любой дополнительный желательный ингредиент из раствора, предварительно подвергнутого стерилизующему фильтрованию. Полученные препараты для инъекций помещают в контейнеры, такие как ампулы, пакеты, пузырьки, шприцы или флаконы, и запечатывают в асептических условиях в соответствии со способами, известными в данной области. Кроме того, препараты могут быть упакованы и представлены для продажи в форме набора. Такие промышленные изделия могут иметь наклейки или вкладыши, указывающие, что находящиеся в них композиции полезны для лечения индивида, страдающего заболеванием или расстройством, или предрасположенного к этим заболеваниям или расстройствам.

Парентеральные композиции могут быть представлены в виде единичной болюсной дозы, дозы для инфузии или первичной болюсной дозы с последующей поддерживающей дозой. Эти композиции могут быть введены с конкретными фиксированными или переменными интервалами, например, один раз в день, или "по необходимости".

Некоторые фармацевтические композиции, используемые в настоящем изобретении, могут быть введены перорально в приемлемой лекарственной форме, включая, например, капсулы, таблетки, водные суспензии или растворы. Некоторые фармацевтические композиции могут быть также введены в виде назального аэрозоля или с помощью ингаляции. Такие композиции могут быть получены в виде растворов в физиологическом растворе с использованием бензилового спирта или других подходящих консервантов, промоторов абсорбции для повышения биодоступности и/или других обычных солнобилизирующих или диспергирующих средств.

Количество связывающей SEMA4D молекулы, например антитела или его фрагмента, варианта или производного, которое может быть объединено с материалами-носителями для получения единичной дозированной лекарственной формы, изменяется в зависимости от состояния подвергаемого лечению индивида и конкретного способа введения. Композицию можно вводить в виде единичной дозы, множественных доз или в течение установленного периода времени в виде инфузии. Режимы дозирования также можно регулировать, чтобы обеспечить оптимальный желаемый ответ (например, терапевтический или профилактический ответ).

В соответствии с настоящим изобретением и в рамках объема его притязаний, антитела против SEMA4D или его антигенсвязывающие фрагменты, варианты или производные могут быть введены человеку или другому животному в соответствии с вышеуказанными способами лечения в количестве, достаточном для получения терапевтического эффекта. Антитела против SEMA4D или их антигенсвязывающие фрагменты, варианты или производные могут быть введены такому человеку или другому животному в обычной лекарственной форме, полученной путем объединения антитела по изобретению с

обычным фармацевтически приемлемым носителем или разбавителем в соответствии с известными методами. Специалистом в данной области известно, что форма и характер фармацевтически приемлемого носителя или разбавителя определяется количеством активного ингредиента, с которым он должен быть объединен, способом введения и другими хорошо известными переменными. Специалистам в данной области техники понятно, что может использоваться коктейль, содержащий один или более видов связывающих SEMA4D молекул, например антител или их антигенсвязывающих фрагментов, вариантов или производных по изобретению.

Указание "терапевтически эффективная доза или количество" или "эффективное количество" подразумевает количество связывающей SEMA4D молекулы, например антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, варианта или производного, которое при введении пациенту приводит к положительно-му терапевтическому ответу в случае лечения пациента, имеющего подлежащее лечению заболевание, например, к увеличению пролиферации, усилинию дифференцировки и/или увеличению выживаемости клеток-предшественников или клеток-прекурсоров.

Терапевтически эффективные дозы композиций по изобретению, обеспечивающие промотирование нейрогенеза, варьируют в зависимости от многих различных факторов, в том числе от пути введения, целевой области действия, физиологического состояния пациента, от того, является ли пациент человеком или животным, от введения других препаратов и от условия, является ли лечение является профилактическим или терапевтическим. В некоторых вариантах осуществления изобретения пациент является человеком, однако способами по изобретению можно лечить млекопитающих, не относящихся к человеку, включая трансгенных млекопитающих. С целью оптимизации безопасности и эффективности лечения дозировки можно оттитровать с использованием обычных методов, известных специалистам в данной области.

Количество по меньшей мере одной связывающей SEMA4D молекулы, например антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, варианта или производного, которое должно быть введено, легко определяется средним специалистом в данной области без чрезмерного экспериментирования, базируясь на раскрытии настоящего изобретения. Факторы, влияющие на режим введения и соответствующего количества по меньшей мере одной связывающей SEMA4D молекулы, например антитела, его антигенсвязывающего фрагмента, варианта или производного, включают, но не ограничиваются перечисленными, тяжесть заболевания, историю болезни, а также возраст, рост, вес, состояние здоровья и физического состояния индивидуума, подвергаемого лечению. Аналогично, количество связывающей SEMA4D молекулы, например антитела или его фрагмента, варианта или производного, используемого для введения, будет зависеть от режима введения и от того, будет ли индивид получать одну дозу или несколько доз этого средства.

Настоящее изобретение также относится к применению связывающей SEMA4D молекулы, например антитела по изобретению или его антигенсвязывающего фрагмента, варианта или производного, при получении лекарственного средства для лечения индивида, применяемого для лечения нейровоспалительного заболевания, где лекарственное средство применяется в отношении индивида, который предварительно получал по меньшей мере одно другое лечение. Указание "предварительно" или "предварительное лечение" подразумевает, что индивид получал одно или несколько других лечений (например, получал по меньшей мере одно другое средство для нейровоспалительной терапии) до получения лекарственного средства, содержащего связывающую SEMA4D молекулу, например антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, вариант или производное. Индивид, который получал "предварительное лечение" или "предварительно лечился", включает индивиды, которые получали, по меньшей мере, другое лечение в течение 2 лет, в течение 18 месяцев, в течение 1 года, в течение 6 месяцев, в течение 2 месяцев, в течение 6 недель, в течение 1 месяца, в течение 4 недель, в течение 3 недель, в течение 2 недель, в течение 1 недели, в течение 6 дней, в течение 5 дней, в течение 4 дней, в течение 3 дней, в течение 2 дней или даже в течение 1 дня до начала лечения с использованием лекарственного средства, содержащего связывающую SEMA4D молекулу, например моноклональное антитело VX15/2503, как описано в настоящем документе, или его антигенсвязывающий фрагмент, вариант или производное. Нет необходимости, чтобы индивид имел ответ на предварительное лечение, выполненное до лечения по способу настоящего изобретения. Таким образом, индивид, который получает лекарственное средство, содержащее связывающую SEMA4D молекулу, например антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, вариант или производное, может иметь ответ или не он не имел ответа на предварительное лечение с помощью одной или нескольких терапий, если предварительное лечение включало использование нескольких терапевтических средств и методов.

Для осуществления настоящего изобретения использованы, если нет других указаний, обычные методики клеточной биологии, клеточного культивирования, молекулярной биологии, трансгенной биологии, микробиологии, методики рекомбинантных ДНК и иммунологии, которые известны специалистам в данной области. Такие методы подробно 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 and II; Gait, ed. (1984) Oligonucleotide Synthesis; патент США No. 4683195,

Mullis et al.; 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 and 155; Mayer and Walker, eds. (1987) Immunological 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 Ausubel et al. (1989) Current Protocols in Molecular Biology (John Wiley and Sons, Baltimore, Md.).

Общие принципы инженерии антител изложены в работе Borrebaeck, ed. (1995) Antibody Engineering (2nd ed.; Oxford Univ. Press). Общие принципы белковой инженерии изложены в работе Rickwood et al., eds. (1995) Protein Engineering, A Practical Approach (IRL Press at Oxford Univ. Press, Oxford, Eng.). Общие принципы работы с антителами и связывание антител с гаптенами изложены в: 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, стандартные методы иммунологии, известные в данной области, хоть они и не описаны в деталях, представлены в следующих документах: 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 работы, где представлены общие принципы иммунологии включают следующие: 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 and Dveksler (2003) PCR Primer (Cold Spring Harbor Press).

Каждый из указанных выше документов, так же как и все цитированные в настоящем описании документы, включены в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме.

Следующие примеры представлены в качестве иллюстративного варианта осуществления изобретения, и не предназначены для его ограничения.

Примеры

Пример 1. Схема эксперимента.

Основная схема эксперимента показана на фиг. 1. Самцов мышей линии CB-17/lcr-1/1Jcl в возрасте 6 недель, ("мыши CB-17") использовали для оценки эффекта антител против SEMA4D в отношении нейрогенеза после инсультного повреждения мозга. У мышей выполняли окклюзию средней мозговой артерии (MCA) (MCAO). Вкратце, животных вводили в глубокий наркоз, индуцированный 4% галотана в смеси 30% кислорода и 70% закиси азота, и состояние анестезии поддерживали с использованием 1-2% галотана. Постоянный очаг ишемии головного мозга получали путем лигирования и отсоединения дистальной части левой средней мозговой артерии (MCA), как описано в другом документе (Taguchi et al., 2004, 2007). У животного под галотановой анестезией отделяли левую часть MCA, подвергали ее электрокардиографии и отключали дистальнее от места пересечения с обонятельным трактом (дистальная часть M1). Церебральный поток крови (CBF) в области MCA контролировали, как описано ранее в документе Matsushita et al., 1998. Церебральный инфаркт, полученный в этой линии мышей, характеризуется высокой воспроизводимостью и он ограничен ипсилатеральной корой головного мозга (Taguchi et al., 2004, 2007).

После выполнения окклюзии мышей разделяли на две группы: группа лечения, где мышам вводили антитела против SEMA4D Mab 67-2, и контрольная группа, где мышам инъектировали изотипичный IgG контроля MAbs 2B8. Мыши получали 0,6 мг/кг моноклональных антител с помощью внутрибрюшинной (IP) инъекции через 1 ч, через 3 ч, на 3 день, на 7 день, на 14 день и на 21 день после выполнения MCAO.

В день 7 после MCAO подгруппу животных из каждой группы, получавшей антитела, умерщвляли, извлекали мозг и ткани анализировали с помощью иммуногистохимии и полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (RT-PCR).

Для иммуногистохимических анализов срезов головного мозга животные подвергались перфузии фиксатором, который представлял собой 2%-ный раствор параформальдегида-лизина-периодата (PLP) (0,75 М лизин-HCl/0,01 М периодат/0,075 М фосфатный буфер), и из их мозга готовили серийные срезы толщиной 20 мкм в кроистате. Срезы мозга обрабатывали 0,1% H₂O₂ для фиксации, затем промывали в фосфатно-солевом буфере (PBS) и инкубировали в течение ночи с одним или несколькими из следующих первичных антител: анти-NeuN для нейронов, антинестин и анти-Sox2 для нейронных стволовых кле-

ток/клеток-прекурсоров в буфере для разведения (0,3% Тритон X-100/5% лошадиной сыворотки/PBS). После этого срезы промывали три раза в PBS, инкубировали с соответствующими вторичными антителами в течение 3 ч, а для окрашивания NeuN, их визуализировали путем ABC-реакции с использованием набора ABC Elite Kit (Vector Laboratories, Burlingame, Calif.) с диаминобензидином (DAB; Sigma). Для двойной иммуноцитохимии Нестин/Sox2 использовали FITC (для Sox2) и СуЗ-меченные вторичные антитела (для нестина). Флуоресцентные микрофотографии были получены с помощью лазерного конфокального микроскопа. Результаты показаны на фиг. 2А-Е и подробно обсуждаются ниже.

Для проведения анализа с помощью RT-PCR, выделяли общую РНК из микрорезов мозговой ткани на 7 день после МСАО и получали кДНК. кДНК амплифицировали с помощью ПЦР при следующих условиях: 15 с при 94°C, 30 с при 56°C и 1 мин при 68°C (40 циклов). Использовали следующие последовательности праймеров: нестин прямой, CACTAGAAAGCAGGAACCAG (SEQ ID NO: 11), нестин обратный, AGATGGTTCACAATCCTCTG (SEQ ID NO: 12) (размер ампликона - 307 п.н.); Sox2 прямой, TTGGGAGGGGTGCAAAAGA (SEQ ID NO: 13) и Sox2 обратный, CCTGCGAACGCCAACGTA (SEQ ID NO: 14) (размер ампликона - 312 п.н.); протеолипидный белок (PLP) прямой, TGAGCGCAAC GGTAACAGG (SEQ ID NO: 15), PLP обратный, GGGAGAACACCATACTCTGG (SEQ ID NO: 16) (размер ампликона - 295 п.н.); β-актин прямой, GCTCGTCGTCGACAAAGGGCTC (SEQ ID NO: 17), β-актин обратный, CAAACATGATCTGGTCATCTTCTC (SEQ ID NO: 18) (размер ампликона - 353 п.н.). Результаты показаны на фиг. 3А-Д и подробно обсуждаются ниже.

Поведенческие исследования были выполнены на остальных подгруппах мышей на 14 и 30 дни после МСАО. Для оценки корковой функции мышей подвергали поведенческому тестированию с использованием задачи открытого поля. Вкратце, животные давали возможность свободного поиска в квадратной акриловой коробке (30×3×30 см) в течение 20 мин. Источник света на крышке включали в течение первых 10 мин (световой период) и выключали в течение последующего 10-минутного периода (период темноты). По осям X и Y открытого поля на высоте 2 см над полом устанавливали по два инфракрасных излучателя с 10-сантиметровыми интервалами, образуя триггерной участок между ними. Общее количество пересечений луча животным подсчитывали и оценивали как двигательное поведение (перемещения). Результаты показаны на фиг. 6А-С и подробно обсуждаются ниже.

На 30 день после МСАО оставшиеся подгруппы мышей умерщвляли и готовили образцы мозга для NeuN иммуноистохимии. Мышей подвергали транскардиальной перфузии 4%-ным параформальдегидом, удаляли мозг и коронарные срезы (14 мкм) окрашивали антителом мыши против NeuN, с последующей реакцией с биотинилированным антителом козы против IgG мыши (Chemicon, Temecula, CA; 1/500), используя набор ABC Elite Kit (Vector Laboratories, Burlingame, CA) и DAB (Sigma) в качестве хромогена. Измеряли площадь ипсолатерального и контраплатерального полушария головного мозга, занимаемую нейронным ядерным маркером NeuN, используя программное обеспечение Image J. Объем ипсолатерального и контраплатерального полушария головного мозга рассчитывали путем интегрирования с использованием фронтально ориентированных размеров ипсолатеральной и контраплатеральной областей полушарий головного мозга. Дегенерацию объема ипсолатерального полушария головного мозга рассчитывали как отношение объема ипсолатерального полушария головного мозга к объему контраплатерального полушария головного мозга. Результаты показаны на фиг. 4А-Д и 5А-В и подробно обсуждаются ниже.

Пример 2. Влияние антитела против SEMA4D на присутствие нервных стволовых клеток/клеток-прекурсоров в мозге после МСАО.

На день 7 после МСАО оценивали влияние антитела против SEMA4D на присутствие нервных стволовых клеток/клеток-прекурсоров. На фиг. 2 представлены изображения иммуноцитохимического окрашивания ишемической ткани из 2 репрезентативных участков на границе зоны инфаркта (обозначены на фиг. 2Е): изотипический контроль (левые панели А и С) и мыши получавшие антитела против SEMA4D (правые панели, В и Д). Эти результаты показывают, что у мышей, получавших антитела против SEMA4D, увеличена экспрессия маркерных белков нервных стволовых клеток/клеток-предшественников по сравнению с мышами, получавшими контрольное антитело. Эти данные свидетельствуют о том, что антитело против SEMA4D может защитить популяции нервных стволовых клеток/клеток-предшественников и/или индуцировать нейрогенез в ишемическом мозге.

Экспрессию мРНК нервных стволовых клеток/клеток-прекурсоров у мышей, получавших антитела против SEMA4D и изотипический контроль, определяли с помощью обычной ОТ-ПЦР в ишемической ткани на 7-й день после МСАО. Эти результаты показаны на фиг. 3А-Д. Полученные результаты показывают значительное увеличение ($p<0,05$) экспрессии Sox2, нестина и PLP по отношению к гену "домашнего хозяйства", β-актина, у мышей, получавших антитела против SEMA4D, по сравнению с животными, получавшими изотипический контроль. Поскольку Sox2 и нестин являются маркерами нервных стволовых клеток/клеток-прекурсоров, то повышенная экспрессия этих маркеров после лечения антителами против SEMA4D позволяет предположить, что антитело против SEMA4D может способствовать нейрогенезу. Увеличение нейрогенеза наблюдалось после лечения ишемии мозга с использованием антител против SEMA4D, что может быть результатом повышенной пролиферации нервных стволовых кле-

ток/клеток-прекурсоров, и/или повышенной выживаемости вновь образованных нервных стволовых клеток/клеток-прекурсоров.

Пример 3. Влияние антитела против SEMA4D на объем мозга после инфаркта головного мозга.

На 30 день после MCAO оценивали действие антитела против SEMA4D на объем мозга. На фиг. 4А-4В показаны срезы мозга, окрашенные антителом, специфичным в отношении NeuN, маркера зрелой нервной ткани, полученные от одной мыши, получавшей изотипический контроль (слева, 4А), и от одной мыши, получавшей антитело против SEMA4D (справа, 4В). Объем мозга представлен объемом стриатума (сплошная линия) и объемом полушария головного мозга (пунктирная линия). На фиг. 4С-4Д показаны расчетные соотношения (L/R) объемов стриатума и полушария для каждой группы мышей соответственно. Хотя статистически значимые различия в общем объеме полушария мозга (пунктирная линия) у мышей, получавших антитела против SEMA4D, и у мышей, получавших изотипический контроль, отсутствуют, следует отметить, что у мышей, получавших антитела против SEMA4D, имеется значительно больший объем стриатума (сплошная линия), чем у мышей, получавших контрольное антитело. Эти данные свидетельствуют о том, что области стриатума, проксимальные по отношению к очагу ишемического инсульта, могут быть защищены с помощью обработки антителом против SEMA4D.

Пример 4. Влияние антитела против SEMA4D на состояние нейронов в мозге после MCAO.

На 30 день после MCAO оценивали действие антитела против SEMA4D на состояние нейронов в головном мозге. На фиг. 5 показаны NeuN-окрашенные образы ишемической мозговой ткани, полученные от одной мыши, получавшей изотипический контроль (нижняя панель, 5В), и от одной мыши, получавшей антитело против SEMA4D (верхняя панель, 5А). Эти результаты показывают, что у мышей, получавших антитела против SEMA4D, увеличена экспрессия NeuN, маркера зрелых нервных клеток, в стриатуме на границе церебрального инфаркта (стрелки), по сравнению с мышами, получавшими контрольное антитело. Эти данные свидетельствуют о том, что лечение антителами против SEMA4D способствуют развитию зрелых нейронов путем защиты популяции нервных стволовых клеток/клеток-прекурсоров и/или индукцией нейрогенеза в ишемическом мозге.

Пример 5. Влияние антитела против SEMA4D на поведенческую активность мышей после MCAO.

На 30 день после MCAO оценивали действие антитела против SEMA4D на поведенческую активность. Мыши, которым вводили антитела против SEMA4D и контрольный IgG, были подвергнуты испытанию в открытом поле в течение 10 мин после воздействия света и темноты. На фиг. 6А-6В показано, что мыши после MCAO (мыши, получавшие как контрольный IgG, так и антитела против SEMA4D) имеют значительно более высокую активность в фазе воздействия света ($p<0,05$) по сравнению с ложнооперированными мышами, но не в фазе темноты. Мыши обычно увеличивают свою активность, когда они переводятся в фазу темноты из фазы воздействия света. На фиг. 6С показано, что отношение двигательной активности на фазах темноты/света было значительно улучшено у мышей, получавших антитела против SEMA4D, сравнимое с ложнооперированными мышами, в отличие от мышей, получавших контрольное антитело ($p<0,05$). Отношения для фаз темноты/света существенно не различались между группой мышей, получавшими антитела против SEMA4D, и ложнооперированными мышами. Эти результаты позволяют предположить, что лечение мышей с MCAO с использованием антител против SEMA4D может нормализовать ответы на стимулы на фазах темноты/света, в то время как у мышей, получавших контрольный IgG, сохраняется аномальная активность для фаз темноты/света, которая типично проявляется у мышей с MCAO.

Пример 6. Влияние антитела против SEMA4D на целостность гематоэнцефалического барьера и нейрогенез.

Еще одно исследование было проведено для оценки эффекта(эффектов) действия антител против SEMA4D на гематоэнцефалический барьер (на целостность BBB) и нейрогенез в модели постоянной окклюзии средней мозговой артерии (MCAO) на крысах.

Основная схема эксперимента показана на фиг. 7. Крысы подвергают окклюзии средней мозговой артерии (MCA) (MCAO). После окклюзии крысы разделяются на три группы по 15 крыс: группа лечения, которая получает антитела против SEMA4D MAb 67-2, контрольная группа, которая получает IgG изотипического контроля MAb 2B8, и группа, которую не подвергали MCAO и которая получала IgG изотипического контроля MAb 2B8. Крысы получают 15,0 мг/кг моноклональных антител с помощью внутрибрюшинной (IP) инъекции через 1 ч, на 3 день, на 7 день, на 14 день и на 21 день после MCAO. Образцы крови периодически отбирают для последующей оценки уровней лекарственного средства. Крысы получают регулярные инъекции антител и подвергаются исследованиям поведения (тест цилиндров и тест положения конечностей) в течение 4-недельного периода времени.

Для оценки целостности BBB у 5 случайно выбранных крыс из каждой группы обработки используют магнитно-резонансную томографию (МРТ). Другая подгруппа крыс (т.е. 5 крыс) получает внутрибрюшинные инъекции BrdU (маркер нервных клеток) в дни 4-6. На стадии завершения эксперимента подгруппу крыс, получавших BrdU, подвергают перфузии 4%-ным параформальдегидом и из крыс извлекают мозги. Третьью подгруппу крыс подвергают перфузии физиологическим раствором, затем мозги подвергают микродиссекции и ткани замораживают. Извлеченные мозги/микросрезы ткани подвергают иммуногистохимическому и биохимическому исследованию для оценки активации микроглии и нейро-

генеза.

Многие модификации и другие варианты осуществления изобретения, изложенные в настоящем документе, являются очевидными для специалистов в данной области, к которой относятся эти изобретения, с достижением преимуществ и результатов, указанных в настоящем описании и на прилагаемых фигурах. Таким образом, следует понимать, что изобретения не должны быть ограничено конкретными раскрытыми вариантами осуществления, и что модификации и другие варианты осуществления также входят в объем изобретения, определяемого прилагаемой формулой изобретения и перечнем вариантов осуществления, как раскрыто в настоящем документе. Хотя в настоящем описании используются конкретные термины, они используются только в общем и описательном смысле, но не для целей ограничения.

СПИСОК ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ
 <110> Smith, Ernest S.
 Zauderer, Maurice

<120> ПРИМЕНЕНИЕ СВЯЗЫВАЮЩИХ СЕМАФОРИН-4D МОЛЕКУЛ ДЛЯ ПРОМОТИРОВАНИЯ НЕЙРОГЕНЕЗА ПОСЛЕ ИНСУЛЬТА

<130> 1843.072PC01/EJH/BNC

<140> To be assigned
 <141> Herewith

<150> US 13/842,523
 <151> 2012-03-15

<150> US 61/646,119
 <151> 2012-05-11

<160> 18

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
 <211> 118
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> MAb 67 VH

<400> 1

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

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

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

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

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

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

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

Thr Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 2
 <211> 111
 <212> БЕЛОК

030796

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> MAb 67 VK

<400> 2

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

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

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

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

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

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

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

<210> 3

<211> 118

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> MAb 2503 H2160

<400> 3

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

030796

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

Thr Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 4
<211> 111
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> MAb 2503 L553

<400> 4

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

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

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

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

Arg Phe Ser Gly Ser Gly 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> 5
<211> 10
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Полипептид CDR1 в VH антитела против CD100

<400> 5

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

<210> 6
<211> 17
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Полипептид CDR2 в VH антитела против CD100

<400> 6

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

Gly

<210> 7

<211> 9

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Полипептид CDR3 в VH антитела против CD100

<400> 7

Tyr	Tyr	Tyr	Gly	Arg	His	Phe	Asp	Val
1				5				

<210> 8

<211> 15

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Полипептид CDR1 в VL антитела против CD100

<400> 8

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

<210> 9

<211> 7

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Полипептид CDR2 в VL антитела против CD100

<400> 9

Ala	Ala	Ser	Asn	Leu	Glu	Ser
1			5			

<210> 10

<211> 9

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Полипептид CDR3 в VL антитела против CD100

<400> 10

Gln	Gln	Ser	Asn	Glu	Asp	Pro	Tyr	Thr
1			5					

<210> 11

<211> 20 <212> ДНК <213> Искусственная последовательность	
<220> <223> нестин, прямой праймер	
<400> 11 сactagaaaag caggaaccag	20
<210> 12 <211> 20 <212> ДНК <213> Искусственная последовательность	
<220> <223> нестин, обратный праймер	
<400> 12 agatggttca caatcctctg	20
<210> 13 <211> 20 <212> ДНК <213> Искусственная последовательность	
<220> <223> Sox2, прямой праймер	
<400> 13 ttgggggggg tgcaaaaaga	20
<210> 14 <211> 20 <212> ДНК <213> Искусственная последовательность	
<220> <223> Sox2, обратный праймер	
<400> 14 cctgcgaagc gcctaacgta	20
<210> 15 <211> 19 <212> ДНК <213> Искусственная последовательность	
<220> <223> PLP, прямой праймер	
<400> 15 tgagcgcaac ggttaacagg	19
<210> 16 <211> 22 <212> ДНК <213> Искусственная последовательность	
<220> <223> PLP, обратный праймер	
<400> 16 gggagaacac catacattct gg	22
<210> 17 <211> 21 <212> ДНК <213> Искусственная последовательность	
<220> <223> бета-актин, прямой праймер	
<400> 17 gctcgtcgtc gacaagggtc с	21
<210> 18 <211> 25 <212> ДНК <213> Искусственная последовательность	
<220> <223> бета-актин, обратный праймер	
<400> 18 caaacatgat ctgggtcatc ttctc	25

2
1

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

- Способ нейрорегенерации у индивида, включающий введение индивиду, нуждающемуся в регенерации после инсульта, эффективного количества выделенного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которое специфически связывает семафорин-4D (SEMA4D), причем антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит VH, содержащую аминокислотные последовательности VH-CDR1, VH-CDR2 и VH-CDR3, показанные в SEQ ID NO: 5, 6 и 7 соответственно, и VL, содержащую аминокислотные последовательности VL-CDR1, VL-CDR2 и VL-CDR3, показанные в SEQ ID NO: 8, 9 и 10 соот-

ветственно; и где введение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента увеличивает одно или более из: пролиферации, дифференцировки или миграции нейронных клеток-предшественников.

2. Способ по п.1, отличающийся тем, что антитело или его антигенсвязывающий фрагмент ингибирует активность SEMA4D.

3. Способ по п.2, отличающийся тем, что ингибирование активности SEMA4D представляет собой димеризацию.

4. Способ по п.1, отличающийся тем, что антитело или его антигенсвязывающий фрагмент ингибирует взаимодействие SEMA4D с рецептором или частью рецептора.

5. Способ по п.4, отличающийся тем, что receptor выбран из группы, состоящей из плексина-B1, плексина-B2 или CD72.

6. Способ по любому из пп.1-5, отличающийся тем, что антитело или его антигенсвязывающий фрагмент является химерным, человеческим или гуманизированным.

7. Способ по любому из пп.1-6, отличающийся тем, что антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит VH, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, и VL, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2.

8. Способ по любому из пп.1-6, отличающийся тем, что антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит VH, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3, и VL, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4.

9. Способ по любому из пп.1-8, отличающийся тем, что антитело или антигенсвязывающий фрагмент вводят на стороне крови гематоэнцефалического барьера.

10. Способ по любому из пп.1-8, отличающийся тем, что антитело или антигенсвязывающий фрагмент вводят на мозговой стороне гематоэнцефалического барьера.

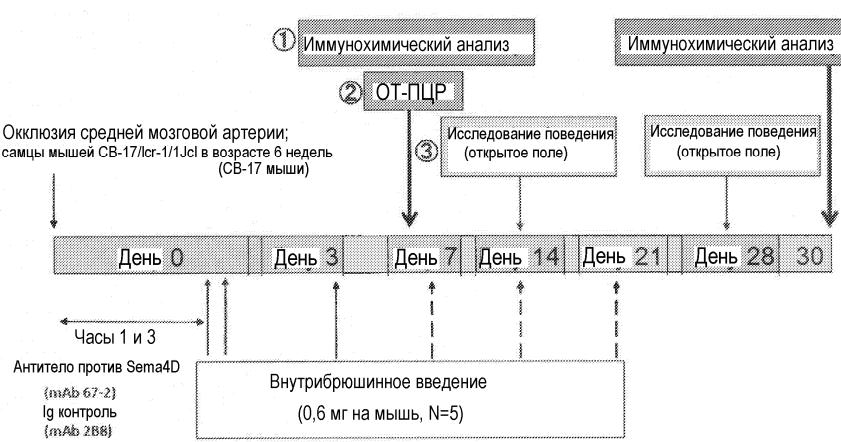
11. Способ по любому из пп.1-8, отличающийся тем, что способ увеличивает количество, усиливает дифференцировку и/или увеличивает выживаемость клеток-предшественников.

12. Способ по любому из пп.1-8, отличающийся тем, что индивидом является человек.

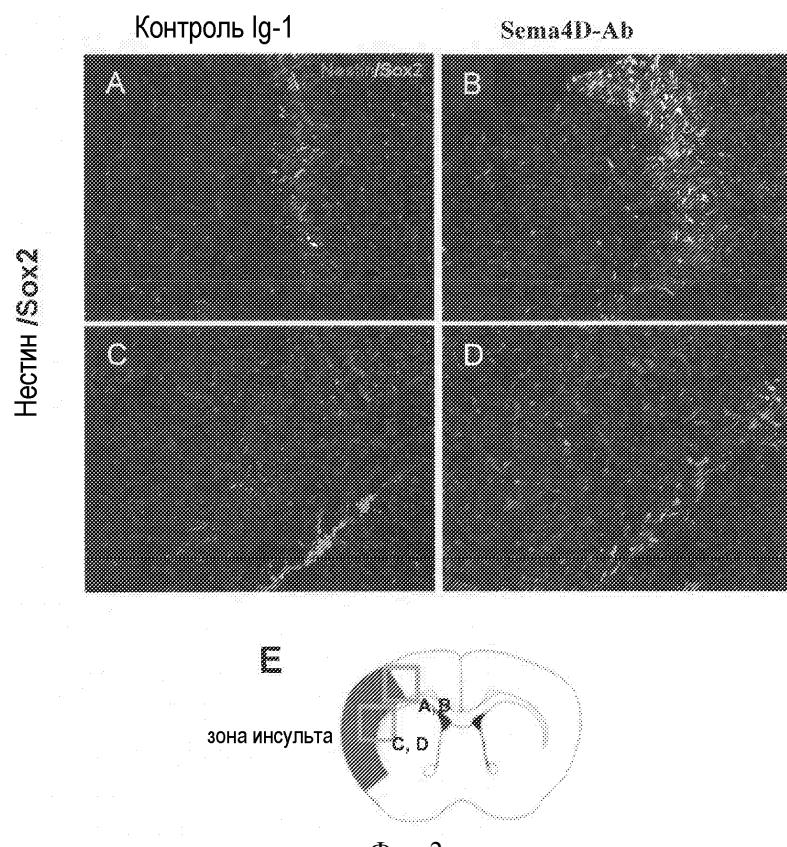
13. Способ по любому из пп.1-12, отличающийся тем, что введение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента индивиду обеспечивает увеличение экспрессии нейронных предшественников или маркерных клеток-предшественников у индивида.

14. Способ по п.13, отличающийся тем, что маркером является Sox2 и/или нестин.

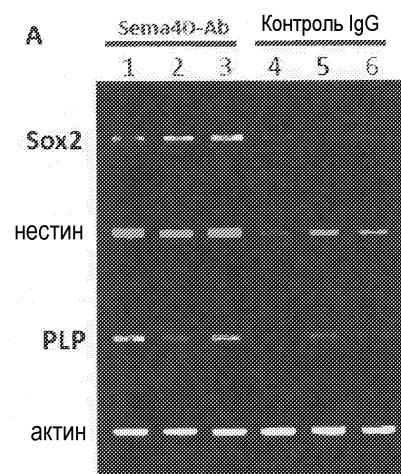
15. Способ по любому из пп.1-14, отличающийся тем, что антитело или его антигенсвязывающий фрагмент относятся к IgG изотипу.



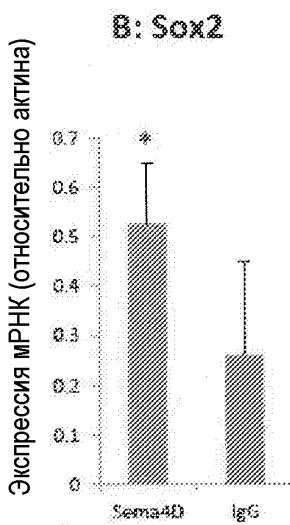
Фиг. 1



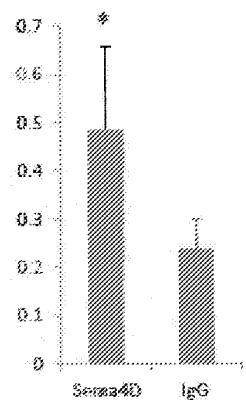
Фиг. 2



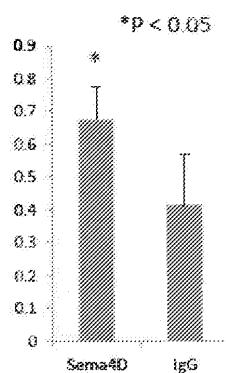
Фиг. 3А



Фиг. 3В

C: нестин

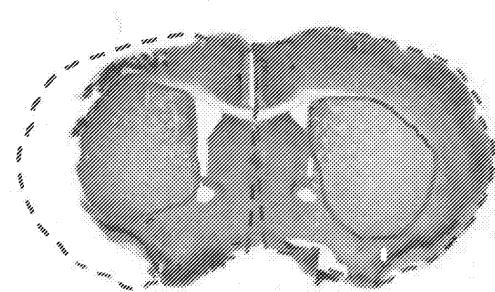
Фиг. 3С

D: PLP

среднее ± станд. откл.

Фиг. 3Д

Контрольный Ig

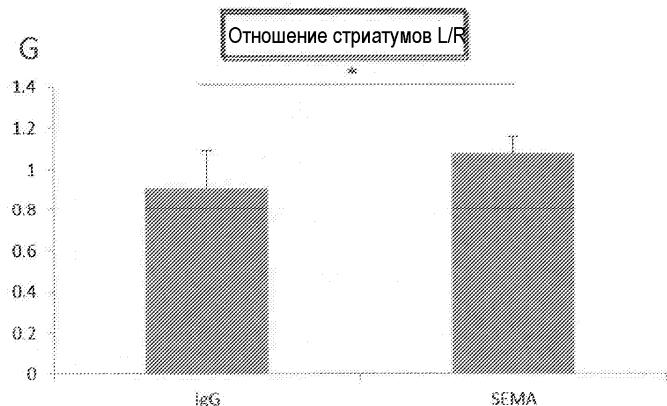


Фиг. 4А

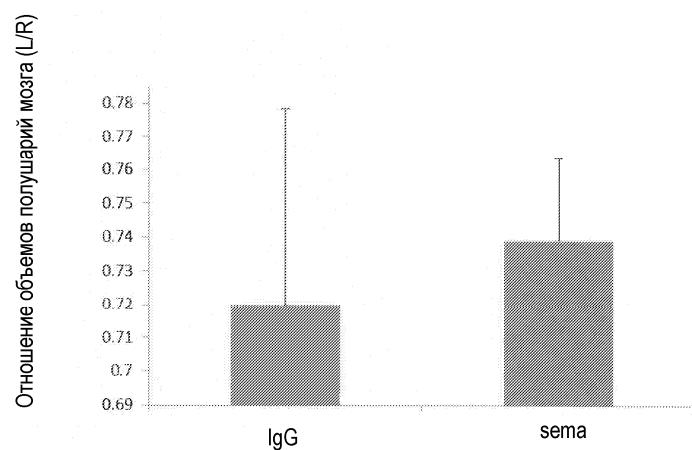
Антилого против SEMA4D



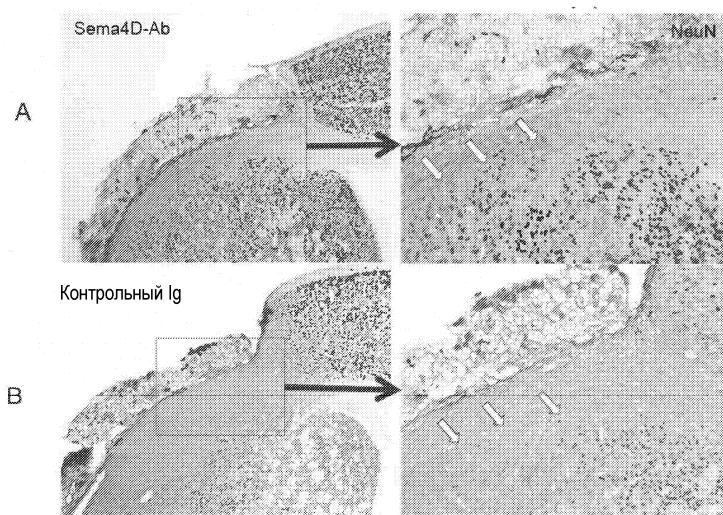
Фиг. 4В



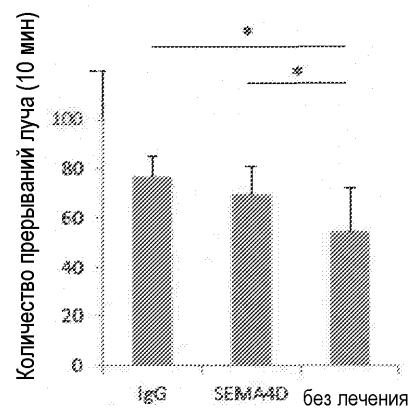
Фиг. 4С



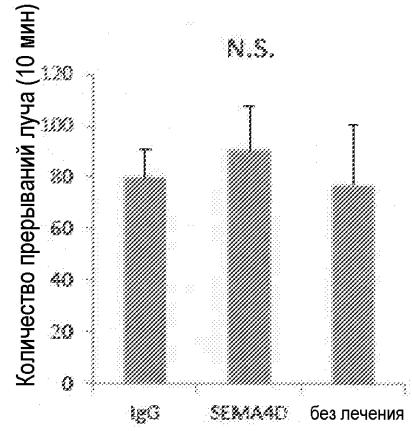
Фиг. 4Д



Фиг. 5

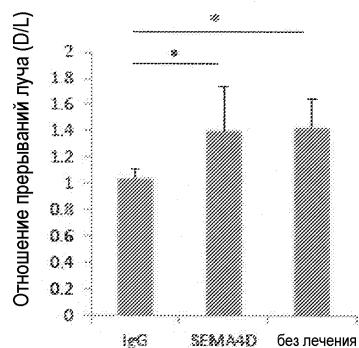
A. Фаза освещения

Фиг. 6А

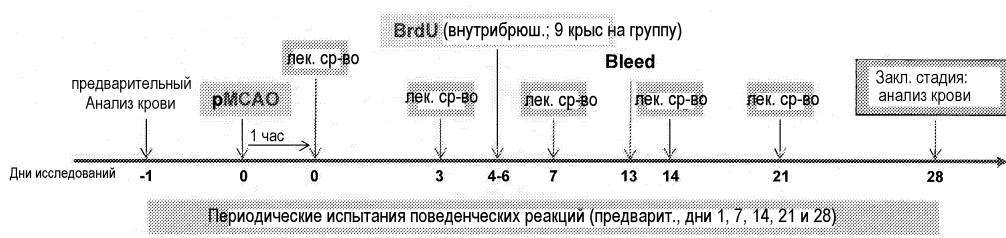
B. Фаза без света

Фиг. 6В

С. Увеличение активности на фазе D



Фиг. 6С



Фиг. 7

