



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

(11) BR 112014008885-3 B1



(22) Data do Depósito: 11/10/2012

(45) Data de Concessão: 17/02/2021

(54) Título: USO DE UM ANTICORPO ISOLADO OU FRAGMENTO DE LIGAÇÃO AO ANTÍGENO DO MESMO QUE SE LIGA ESPECIFICAMENTE À SEMAFORINA-4D PARA DIMINUIR PERMEABILIDADE DA BARREIRA HEMATOENCEFÁLICA (BBB) EM UM INDIVÍDUO COM PERMEABILIDADE DA BBB AUMENTADA E UM TRANSTORNO NEUROINFLAMATÓRIO

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

(30) Prioridade Unionista: 01/02/2012 US 61/593,641; 04/11/2011 US 61/555,726; 11/10/2011 US 61/545,809.

(73) Titular(es): VACCINEX, INC.

(72) Inventor(es): ERNEST S SMITH; MAURICE ZAUDERER.

(86) Pedido PCT: PCT US2012059757 de 11/10/2012

(87) Publicação PCT: WO 2013/055922 de 18/04/2013

(85) Data do Início da Fase Nacional: 11/04/2014

(57) Resumo: USO DE MOLÉCULAS DE LIGAÇÃO PARA A SEMAFORINA-4D PARA A MODULAÇÃO DE PERMEABILIDADE DA BARREIRA HEMATOENCEFÁLICA. Fornecido aqui métodos para diminuir a permeabilidade da barreira hemato-encefálica em um sujeito com um transtorno neuroinflamatório, compreendendo administrar ao sujeito uma quantidade eficaz de uma molécula de ligação isolada, que se liga especificamente à semaforina-4D (SEMA4D) ou a seu receptor de Plexina-B1 de alta afinidade.

“USO DE UM ANTICORPO ISOLADO OU FRAGMENTO DE LIGAÇÃO AO ANTÍGENO DO MESMO QUE SE LIGA ESPECIFICAMENTE À SEMAFORINA-4D PARA DIMINUIR PERMEABILIDADE DA BARREIRA HEMATOENCEFÁLICA (BBB) EM UM INDIVÍDUO COM PERMEABILIDADE DA BBB AUMENTADA E UM TRANSTORNO NEUROINFLAMATÓRIO”

REFERÊNCIA À LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS SUBMETIDA ELETRONICAMENTE

[001]O conteúdo da listagem de sequências submetida eletronicamente em arquivo de texto ASCII (Nome: “1843_068PC03_SequenceListing_ascii.txt”; Tamanho: 33,807 bytes; e Data de Criação: 10 de outubro de 2012) depositado com o pedido está aqui incorporado como referência em sua totalidade.

FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

[002]Semaforina 4D (SEMA4D), também conhecida como CD100, é uma proteína transmembranar (por exemplo, SEQ ID NO: 1 (ser humano); SEQ ID NO: 2 (murino)) que pertence à família do gene da semaforina. SEMA4D é expressa na superfície celular como um homodímero, mas na SEMA4D de ativação celular pode ser liberada a partir da superfície celular por intermédio de clivagem proteolítica para gerar sSEMA4D, uma forma solúvel da proteína, que também é biologicamente ativa. Veja, Suzuki *et al.*, *Nature Rev. Immunol.* 3: 159 - 167 (2003); Kikutani *et al.*, *Nature Immunol.* 9: 17 - 23 (2008).

[003]SEMA4D é expressa em altos níveis em órgãos linfoides, incluindo o baço, timo e linfonodos, e em órgãos não-linfoides, tais como o cérebro, coração e rim. Em órgãos linfoides, SEMA4D é abundantemente expressada em células T em repouso, mas apenas fracamente expressada em células B em repouso e células apresentadoras de antígeno (APCs), tais como células dendríticas (DCs). Sua expressão, entretanto, é supra-regulada nestas células após a ativação por vários estímulos imunológicos. A liberação de SEMA4D solúvel a partir de células imunes também é

aumentada pela ativação celular.

[004]SEMA4D tem sido implicada no desenvolvimento de doenças neurodegenerativas, doenças autoimunes, doenças desmielinizantes e certos cânceres. Embora o papel da sinalização de SEMA4D através de seus receptores, por exemplo, Plexina-B1, em angiogênese seja bem reconhecido, o efeito da sinalização de SEMA4D em Barreira Hematoencefálica (BBB) permanece pouco claro. Isto é importante porque as alterações na permeabilidade da BBB têm uma profunda influência sobre o tecido e função cerebral. Permanece, portanto, uma necessidade para tratamentos de transtornos neuro-inflamatórios que surgem como um resultado de ruptura na BBB, e, em particular, terapias que inibe, suprime, previne, reverte ou reduz a ruptura da BBB.

BREVE SUMÁRIO DA INVENÇÃO

[005]Os métodos para utilizar moléculas de ligação à semaforina-4D para a modulação de permeabilidade da barreira hematoencefálica são aqui divulgados. A evidência é apresentada demonstrando que a SEAM4D pode comprometer a integridade da BBB, desse modo, aumentando sua permeabilidade. De acordo com os aspectos da invenção aqui ilustrada, é fornecido um método para diminuir a permeabilidade da barreira hematoencefálica em um sujeito tendo um transtorno neuro-inflamatório incluindo administrar ao sujeito uma quantidade eficaz de uma molécula de ligação isolada, que se liga especificamente à semaforina-4D (SEMA4D), diminuindo assim, a permeabilidade da barreira hematoencefálica no sujeito.

[006]De acordo com aspectos aqui ilustrados, é fornecido um método de manter ou aumentar a expressão de Claudina-5 em um sujeito tendo um transtorno neuro-inflamatório compreendendo administrar ao sujeito uma quantidade eficaz de uma molécula de ligação isolada, que se liga especificamente à semaforina-4D (SEMA4D), em que a molécula de ligação mantém ou aumenta a expressão de Claudina-5 no sujeito.

[007]De acordo com aspectos aqui ilustrados, é fornecido um método de diminuir a permeabilidade da barreira hematoencefálica em um sujeito tendo um transtorno neuro-inflamatório, compreendendo administrar ao sujeito uma quantidade eficaz de uma molécula de ligação isolada, que inibe especificamente à interação de semaforina 4D (SEMA4D) com um receptor de SEMA4D, diminuindo assim, a permeabilidade da barreira hematoencefálica no sujeito.

[008]De acordo com aspectos aqui ilustrados, é fornecido um método de tratar um sujeito tendo um transtorno neuro-inflamatório, compreendendo administrar ao sujeito uma quantidade eficaz de uma molécula de ligação isolada, que inibe especificamente à interação de semaforina 4D (SEMA4D) com um receptor de SEMA4D, em que a molécula de ligação diminui a permeabilidade da barreira hematoencefálica, tratando assim o sujeito.

[009]De acordo com aspectos aqui ilustrados, é fornecido um método de diminuir a permeabilidade da barreira hematoencefálica em um sujeito tendo um transtorno neuro-inflamatório, compreendendo administrar ao sujeito uma quantidade eficaz de uma molécula de ligação isolada, que se liga especificamente à SEMA4D, em que a molécula de ligação inibe competitivamente um anticorpo monoclonal de referência selecionado a partir do grupo que consiste de VX15/2503 ou 67 de se ligar especificamente à SEMA4D.

[0010]De acordo com aspectos aqui ilustrados, é fornecido um método de tratar um sujeito tendo um transtorno neuro-inflamatório, compreendendo administrar ao sujeito uma quantidade eficaz de uma molécula de ligação isolada, que se liga especificamente à semaforina-4D (SEMA4D) e uma molécula de ligação isolada, que se liga especificamente à Plexina-B1, em que a moléculas de ligação para a SEMA4D e Plexina-B1 diminuem a permeabilidade da barreira hematoencefálica, tratando assim o sujeito.

[0011]De acordo com aspectos aqui ilustrados, é fornecido um método de

tratar um sujeito tendo um transtorno neuro-inflamatório, compreendendo administrar ao sujeito uma quantidade eficaz de um inibidor de interação de semaforina 4D (SEMA4D) com um receptor de SEMA4D, em que o inibidor diminui a permeabilidade da barreira hematoencefálica, tratando assim o sujeito.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS/FIGURAS

[0012]FIGURA 1: Diagrama esquemático do protocolo experimental da BBB dinâmica *in vitro* (“DIV-BBB”) descrito nos Exemplos.

[0013]FIGURA 2: Modelo de DIV-BBB *in vitro* que mostra as medições da integridade de BBB como refletido em resistência elétrica transendotelial (TEER) na presença de SEMA4D recombinante (0,05, 0,5, 5 ou 50 µg/mL) e Anticorpo VX15/2503 (“VX15”).

[0014]FIGURA 3: Modelo de DIV-BBB *in vitro* que mostra as medições da integridade de BBB como refletido em resistência elétrica transendotelial (TEER) durante a formação da BBB, a ruptura da BBB na presença de SEMA4D recombinante (0,5, 5 ou 50 µg/mL), e o restabelecimento da BBB na presença de Anticorpo VX15/2503 (“VX15”), mas não isotipo controle (“Iso”).

[0015]FIGURA 4: Modelo de DIV-BBB *in vitro* que mostra as medições da integridade de BBB como refletido em resistência elétrica transendotelial (TEER) durante a formação da BBB, a ruptura da BBB na presença de 0,25, 2,5, ou 25 µg/mL de antígeno controle de C35 (“CTRL”) ou 50 µg/mL de SEMA4D recombinante, e o restabelecimento da BBB na presença de Anticorpo VX15/2503 (“VX15”).

[0016]FIGURA 5: Modelo de DIV-BBB *in vitro* que mostra as medições da integridade de BBB como refletido em resistência elétrica transendotelial (TEER) durante a formação da BBB, a ruptura da BBB na presença de SEMA4D recombinante (50 µg/mL), e o restabelecimento da BBB na presença de Anticorpo VX15/2503 (“VX15”), anticorpo anti-Plexina-B1 (“Anti-PLXNB1”), mas não isotipo controle (“Iso”).

[0017]FIGURA 6: Modelo de DIV-BBB *in vitro* que mostra as medições de

integridade de BBB como refletido em resistência elétrica transendotelial (TEER) durante a formação da BBB, a ruptura da BBB na presença de PBMC ativadas ($10^6/ml$) e cessação de fluxo, e o restabelecimento da BBB na presença de Anticorpo VX15/2503 ou IgG de Controle de Isotipo.

[0018]FIGURA 7A-C: Resultados a partir do modelo de EAE *in vivo* que mostram a integridade da BBB ou perda da mesma como refletido por imunocoramento da penetração de fibrinogênio (“Fib.+”) no tecido cerebral (painel esquerdo 7A e quantificação em 7B) e expressão de Claudina-5 (“CLN5+”) como detectado pela coloração vermelha (painel direito 7A e quantificação em 7C) após o tratamento com Anticorpo VX15/2503 (“Anti-SEMA4D”) ou controle de isotipo (“IgG de Controle”).

[0019]FIGURA 8: Resultados de *Immunoblot* que mostram o efeito de concentrações crescentes de SEMA4D recombinante (1 ng/ml, 10 ng/ml e 100 ng/ml) na expressão da proteína Claudina-5 (“CLN-5”) de junção apertada endotelial chave em comparação a controle positivo de VEGF-A em culturas endoteliais do sistema nervoso central de camundongo primário (CNS).

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

I. Definições

[0020]Deve ser observado que o termo “uma” entidade refere-se a uma ou mais dessa entidade; por exemplo, “um anticorpo anti-SEMA4D” é entendido representar um ou mais anticorpos anti-SEMA4D. Como tais, os termos “um” (ou “uma”), “um ou mais” e “pelo menos um” podem ser aqui utilizados permutavelmente.

[0021]Deve ser observado que os termos “barreira hematoencefálica” e “BBB” são utilizados permutavelmente.

[0022]Como aqui utilizado, o termo “ruptura” ou “rompimento” no que diz respeito à BBB, tal como “ruptura da barreira hematoencefálica” ou “rompimento da barreira hematoencefálica” refere-se a um aumento na permeabilidade da barreira hematoencefálica, ou, no caso da “DIV-BBB,” um modelo dinâmico humanizado *in vitro* da

BBB, uma diminuição na resistência elétrica transendotelial (TEER). McCallister *et al.*, *Brain Res.* 904: 20 - 30 (2001); Santaguida *et al.*, *Brain Res.* 1109:1-13 (2006); e Cuccullo *et al.*, *Epilepsia* 48: 505 - 16 (2007) têm mostrado que existe um relacionamento direto (inverso) entre TEER e permeabilidade na DIV-BBB. Além disso, um aumento na permeabilidade da barreira hematoencefálica ou uma diminuição na resistência elétrica pode ser o resultado de uma diminuição no número, densidade e/ou concentração de células endoteliais presentes na BBB; ou uma mudança na morfologia ou interações entre células endoteliais ou astrócitos ou entre células endoteliais e astrócitos que formam a BBB.

[0023]Como aqui utilizado, o termo “restauração” no que diz respeito à BBB, tal como “restauração da barreira hematoencefálica” refere-se a uma diminuição na permeabilidade da barreira hematoencefálica, ou, no caso da DIV-BBB, um modelo dinâmico humanizado *in vitro* de BBB, um aumento na resistência elétrica transendotelial.

[0024]Como aqui utilizado, o termo “transtorno neuro-inflamatório” refere-se a um transtorno inflamatório do sistema nervoso central (CNS), um transtorno neurodegenerativo, um transtorno autoimune do sistema nervoso central, um transtorno de mielina ou uma doença que afeta os oligodendrócitos, ou um transtorno de mielina pós-traumático do sistema nervoso central. Deve ser observado que, os transtornos neuro-inflamatórios também são frequentemente transtornos neurodegenerativos. Entretanto, é possível para um transtorno neurodegenerativo existir na ausência de neuroinflamação óbvia. Isto é o caso, por exemplo, em esclerose múltipla progressiva secundária de estágio tardio.

[0025]O termo “quantidade terapeuticamente eficaz” refere-se a uma quantidade de um anticorpo, polipeptídeo, polinucleotídeo, molécula orgânica pequena, ou outro fármaco eficaz para “tratar” uma doença ou transtorno em um sujeito ou mamífero. No caso de um transtorno neuro-inflamatório, a quantidade terapeuticamente

eficaz do fármaco pode diminuir a permeabilidade da BBB; reduzir, retardar ou parar um aumento na permeabilidade de BBB; inibir, por exemplo, suprimir, retardar, prevenir, parar ou reverter uma permeabilidade aumentada da BBB; aumentar o número, densidade e/ou concentração de células endoteliais presentes na BBB; mudança na morfologia ou função de células endoteliais; ou uma mudança nas interações entre células endoteliais ou astrócitos ou entre células endoteliais e astrócitos que formam a BBB; aliviar em certa medida um ou mais dos sintomas associados com uma permeabilidade aumentada de BBB, por exemplo, transtornos neuro-inflamatórios; reduzir a morbidade e mortalidade; melhorar a qualidade de vida; ou uma combinação de tais efeitos.

[0026]Os termos tais como “tratar” ou “tratamento” ou “para tratar” ou “aliviar” ou “para aliviar” referem-se a tanto 1) medidas terapêuticas que curam, abrandam, atenuam sintomas de, reverte, e/ou interrompe a progressão de uma condição ou transtorno patológico diagnosticado quanto 2) medidas profiláticas ou preventivas que previnam e/ou retardam o desenvolvimento de uma condição ou transtorno patológico alvo. Assim, os que necessitam de tratamento incluem aquelas já com o transtorno; aqueles propensos a ter o transtorno; e aqueles nos quais o transtorno é para ser prevenido. Os resultados clínicos benéficos ou desejados incluem, mas não são limitados a, alívio de sintomas, diminuição da extensão da doença, estado estabilizado (*isto é*, não piora) da doença, atraso ou retardamento da progressão da doença, melhoria ou palição do estado da doença, e remissão (quer parcial ou total), se detectável ou não. O “tratamento” também pode significar prolongar à sobrevivência, em comparação à sobrevivência esperada se não receber o tratamento. Os que em necessidade de tratamento incluem aqueles já com a condição ou transtorno assim como aqueles propensos a ter a condição ou transtorno ou aqueles, em que a condição ou transtorno é a ser prevenido.

[0027]Por “sujeito” ou “indivíduo” ou “animal” ou “paciente” ou “mamífero”, é

significado qualquer sujeito, particularmente um sujeito mamífero, para os quais o diagnóstico, prognóstico ou terapia é desejado. Sujeitos mamíferos incluem seres humanos, animais domésticos, animais de fazenda, e animais zoológico, esportes ou de companhia, tais como cães, gatos, porquinhos-da-índia, coelhos, ratos, camundongos, cavalos, gado, vacas, ursos, e assim por diante.

[0028]Como aqui utilizado, as frases tais como “um sujeito que se beneficiaria de administração de um anticorpo anti-SEMA4D” e “um animal em necessidade de tratamento” inclui sujeitos, tais como sujeitos mamíferos, que se beneficiariam de administração de um anticorpo anti-SEMA4D ou outra molécula de ligação à SEMA4D utilizada, por exemplo, para a detecção de um polipeptídeo de SEMA4D (por exemplo, para um procedimento de diagnóstico) e/ou do tratamento, isto é, palição ou prevenção de uma doença, com um anticorpo anti-SEMA4D ou outra molécula de ligação à SEMA4D.

[0029]Uma “molécula de ligação” ou “molécula de ligação ao antígeno” da presente invenção refere-se em seu sentido mais amplo para uma molécula que se liga especificamente um determinante antigênico. Em uma forma de realização, a molécula de ligação se liga especificamente à SEMA4D, por exemplo, a um polipeptídeo de SEMA4D transmembranar de cerca de 150 kDa ou um polipeptídeo de SEMA4D solúvel de cerca de 120 kDa (comumente referido como sSEMA4D). Em uma outra forma de realização, uma molécula de ligação da invenção é um anticorpo ou um fragmento de ligação com o antígeno do mesmo. Em uma outra forma de realização, uma molécula de ligação da invenção compreende pelo menos uma CDR de cadeia pesada ou leve de uma molécula de anticorpo. Em uma outra forma de realização, uma molécula de ligação da invenção compreende pelo menos duas CDRs a partir de uma ou mais moléculas de anticorpo. Em uma outra forma de realização, uma molécula de ligação da invenção compreende pelo menos três CDRs a partir de uma ou mais moléculas de anticorpo. Em uma outra forma de realização, uma molécula de

ligação da invenção compreende pelo menos quatro CDRs a partir de uma ou mais moléculas de anticorpo. Em uma outra forma de realização, uma molécula de ligação da invenção compreende pelo menos cinco CDRs a partir de uma ou mais moléculas de anticorpo. Em uma outra forma de realização, uma molécula de ligação da invenção compreende pelo menos seis CDRs a partir de uma ou mais moléculas de anticorpo.

[0030]O presente pedido é dirigido a um método de diminuir a permeabilidade da barreira hematoencefálica em um sujeito tendo um transtorno neuro-inflamatório (por exemplo, Esclerose Múltipla, Esclerose Lateral Amiotrófica, epilepsia, Doença de Alzheimer, Doença de Parkinson, meningite, edema cerebral, trauma cerebral e acidente vascular cerebral), compreendendo administrar ao sujeito uma molécula de ligação anti-SEMA4D, uma molécula de ligação anti-PlexinB1 ou sua combinação.

[0031]Como aqui utilizado, “molécula de ligação anti-SEMA4D” ou “molécula de ligação anti-PlexinB1” refere-se a um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno, variante ou seu derivado. A menos que se referem especificamente a anticorpos de tamanho completo, tais como anticorpos que ocorrem naturalmente, o termo “anticorpo anti-SEMA4D” ou “anticorpo anti-PlexinB1” abrange anticorpos de tamanho completo, assim como, fragmentos de ligação ao antígeno, variantes, análogos ou derivados de tais anticorpos, por exemplo, anticorpo que ocorre naturalmente ou moléculas de imunoglobulina ou moléculas de anticorpo engendradas ou fragmentos que se ligam ao antígeno em uma maneira similar às moléculas de anticorpo.

[0032]Como aqui utilizado, “inibidor de interação de SEMA4D com um receptor de SEMA4D” refere-se a uma “molécula de ligação anti-SEMA4D”, uma “molécula de ligação anti-PlexinB1”, assim como, um inibidor de molécula pequena de SEMA4D ou um receptor de SEMA4D.

[0033]Como aqui utilizado, anticorpos “humanos” ou “completamente humanos” incluem anticorpos tendo a sequência de aminoácidos de uma imunoglobulina

humana e incluem anticorpos isolados a partir de bibliotecas de imunoglobulina humana ou de animais transgênicos para uma ou mais imunoglobulinas humanas e que não expressam imunoglobulinas endógenas, como descrito infra e, por exemplo, em Pat. U.S. Nº 5.939.598 por Kucherlapati *et al.* Anticorpos “humanos” ou “completamente humanos” também incluem anticorpos compreendendo pelo menos o domínio variável de uma cadeia pesada, ou pelo menos os domínios variáveis de uma cadeia pesada e uma cadeia leve, onde o(s) domínio(s) variável(s) têm a sequência de aminoácido de domínio(s) variável(s) de imunoglobulina humana.

[0034]Anticorpos “humanos” ou “completamente humanos” também incluem anticorpos “humanos” ou “completamente humanos”, como descrito acima, que compreendem, consiste essencialmente de, ou consiste de, variantes (incluindo derivados) de moléculas de anticorpo (por exemplo, as regiões VH e/ou regiões VL) aqui descritas, as quais os anticorpos ou seus fragmentos imunoespecificamente se ligam a um polipeptídeo de SEMA4D ou fragmento ou sua variante. As técnicas padrão conhecidas àqueles de habilidade na técnica podem ser utilizadas para introduzir mutações na sequência de nucleotídeos que codifica um anticorpo anti-SEMA4D humano, incluindo, mas não limitado a, mutagênese dirigida ao sítio e mutagênese mediada por PCR que resulta em substituições de aminoácidos. Preferivelmente, as variantes (incluindo derivados) que codifica menos do que 50 substituições de aminoácidos, menos do que 40 substituições de aminoácidos, menos do que 30 substituições de aminoácidos, menos do que 25 substituições de aminoácidos, menos do que 20 substituições de aminoácidos, menos do que 15 substituições de aminoácidos, menos do que 10 substituições de aminoácidos, menos do que 5 substituições de aminoácidos, menos do que 4 substituições de aminoácidos, menos do que 3 substituições de aminoácidos, ou menos do que 2 substituições de aminoácidos em relação à região VH de referência, VHCDR1, VHCDR2, VHCDR3, região VL, VLCDR1, VLCDR2 ou VLCDR3.

[0035]Em certas formas de realização, as substituições de aminoácidos são substituições de aminoácidos conservativas, debatidas mais adiante. Alternativamente, as mutações podem ser introduzidas aleatoriamente ao longo de toda ou parte da sequência codificadora, tais como por mutagênese de saturação, e os mutantes resultantes podem ser triados para a atividade biológica para identificar mutantes que retêm a atividade (por exemplo, a capacidade de se ligar a um polipeptídeo de SEMA4D, por exemplo, SEMA4D humana, de murino, ou tanto humana quanto de murino). Tais variantes (ou seus derivados) de anticorpos “humanos” ou “completamente humanos” também podem ser referidas como anticorpos humanos ou completamente humanos que são “otimizados” ou “otimizados para a ligação ao antígeno” e incluem anticorpos que têm afinidade melhorada ao antígeno.

[0036]Os termos “anticorpo” e “imunoglobulina” são utilizados permutavelmente aqui. Um anticorpo ou imunoglobulina compreende pelo menos o domínio variável de uma cadeia pesada, e normalmente compreende pelo menos os domínios variáveis de uma cadeia pesada e uma cadeia leve. As estruturas de imunoglobulina básicas em sistemas de vertebrados são relativamente bem entendidas. Veja, por exemplo, Harlow *et al.* (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual* (2ª ed.; Cold Spring Harbor Laboratory Press).

[0037]Como aqui utilizado, o termo “imunoglobulina” compreende várias classes amplas de polipeptídeos que podem ser distinguidos bioquimicamente. Os habilitados na técnica avaliarão que as cadeias pesadas são classificadas como gama, mu, alfa, delta, ou épsilon, (γ , μ , α , δ , ϵ) com algumas subclasses dentre eles (por exemplo, $\gamma 1$ a $\gamma 4$). É a natureza desta cadeia que determina a “classe” do anticorpo como IgG, IgM, IgA IgG ou IgE, respectivamente. As subclasses de imunoglobulina (isotipos), por exemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, etc. são bem caracterizadas e são conhecidas conferir especialização funcional. As versões modificadas de cada uma destas classes e isotipos são facilmente discernível ao técnico habilitado em vista da presente

divulgação e, conseqüentemente, estão dentro do escopo da presente invenção. Todas as classes de imunoglobulina estão claramente dentro do escopo da presente invenção, o debate seguinte irá, geralmente, ser dirigido à classe de IgG de moléculas de imunoglobulina. no que diz respeito à IgG, uma molécula de imunoglobulina padrão compreende dois polipeptídeos de cadeia leve idênticos de peso molecular aproximadamente 23.000 Daltons, e dois polipeptídeos de cadeia pesada idênticos de peso molecular 53.000 a 70.000. As quatro cadeias são tipicamente unidas por ligações dissulfeto em uma configuração “Y”, em que as cadeias leves suportam as cadeias pesadas iniciando na abertura do “Y” e continuando através da região variável.

[0038]As cadeias leves são classificadas como kappa ou lambda (κ , λ). Cada classe de cadeia pesada pode ser ligada com uma cadeia leve kappa ou lambda. Em geral, as cadeias leves e pesadas são covalentemente ligadas umas às outras, e as porções da “cauda” das duas cadeias pesadas são ligadas umas às outras por ligações dissulfeto covalentes ou ligações não covalentes quando as imunoglobulinas são geradas por hibridomas, células B ou células hospedeiras geneticamente engendradas. Na cadeia pesada, as sequências de aminoácidos conduzidas a partir de um N-terminal nas extremidades bifurcadas da configuração Y ao C-terminal no fundo de cada cadeia.

[0039]As cadeias tanto leves quanto pesadas são divididas em regiões de homologia estrutural e funcional. Os termos “constante” e “variável” são funcionalmente utilizados. A este respeito, será avaliado que os domínios variáveis das porções de cadeia tanto leve (VL ou VK) quanto pesada (VH) determinam reconhecimento e especificidade do antígeno. Reciprocamente, os domínios constantes da cadeia leve (CL) e da cadeia pesada (CH1, CH2 ou CH3) conferem importantes propriedades biológicas, tais como secreção, mobilidade transplacentária, ligação de receptor Fc, ligação de complemento, e semelhantes. Por convenção a numeração dos domínios de região constante aumentam à medida que eles se tornam mais distais a partir do

sítio de ligação ao antígeno ou amino-terminal do anticorpo. A porção N-terminal é uma região variável e na porção C-terminal é uma região constante; os domínios CH3 e CL, realmente, compreendem o carbóxi-terminal da cadeia pesada e leve, respectivamente.

[0040]Como indicado acima, a região variável permite o anticorpo reconhecer seletivamente e, especificamente, ligar epítomos em antígenos. Isto é, o domínio VL e domínio VH, ou subconjunto das regiões de determinação de complementaridade (CDRs) dentro destes domínios variáveis, de um anticorpo combine para formar a região variável que define um sítio de ligação ao antígeno tridimensional. Esta estrutura de anticorpo quaternária forma o sítio de ligação ao antígeno presente na extremidade de cada ramificação de Y. Mais especificamente, o sítio de ligação ao antígeno é definido por três CDRs em cada uma das cadeias VH e VL. Em alguns casos, por exemplo, certas moléculas de imunoglobulina derivadas de espécie de camelídeos ou engendradas com base em imunoglobulinas de camelídeos, uma molécula de imunoglobulina completa pode consistir de cadeias pesadas apenas, sem nenhuma cadeia leve. Veja, por exemplo, Hamers-Casterman *et al.*, *Nature* 363: 446 - 448 (1993).

[0041]Em anticorpos que ocorrem naturalmente, as seis “regiões de determinação de complementaridade” ou “CDRs” presentes em cada domínio de ligação ao antígeno são curtas, as sequências não contíguas de aminoácidos que são especificamente posicionados para formar o domínio de ligação ao antígeno como o anticorpo assume sua configuração tridimensional em um ambiente aquoso. O restante dos aminoácidos nos domínios de ligação ao antígeno, referido como regiões de “estrutura”, mostra menos variabilidade inter-molecular. As regiões de estrutura, em grande parte, adotam uma conformação de folha- β e as CDRs formam *loops* que se conectam, e em alguns casos formam parte da estrutura de folha- β . Assim, as regiões de estrutura agem para formar um andaime que fornece para posicionar as CDRs na orientação correta por inter-cadeia, interações não covalentes. O domínio de ligação ao antígeno

formado pelas CDRs posicionadas define uma superfície complementar ao epítopo no antígeno imunorreativo. Esta superfície complementar promove a ligação não covalente do anticorpo a seu epítopo cognato. Os aminoácidos compreendendo as CDRs e as regiões de estrutura, respectivamente, podem ser facilmente identificados para qualquer determinado domínio variável de cadeia pesada ou leve por uma pessoa de habilidade comum na técnica, visto que eles foram precisamente definidos (veja, abaixo).

[0042]No caso onde existem duas ou mais definições de um termo que é utilizado e/ou aceito dentro da técnica, a definição do termo como aqui utilizado é intencionada a incluir todos os tais significados a menos que explicitamente estabelecido ao contrário. Um exemplo específico é o uso do termo “região de determinação de complementaridade” (“CDR”) para descrever os sítios de combinação de antígeno não contíguos encontrados dentro da região variável de ambos os polipeptídeos de cadeia pesada e leve. Esta região particular foi descrita por Kabat *et al.* (1983) U.S. Dept. of Health and Human Services, “Sequences of Proteins of Immunological Interest” e por Chothia e Lesk, *J. Mol. Biol.* 196: 901 - 917 (1987), que são aqui incorporados como referência, onde as definições incluem sobreposição ou subconjuntos de resíduos de aminoácidos quando comparadas contra uma das outras. Não obstante, a aplicação de ambas as definições para se referir a uma CDR de um anticorpo ou suas variantes é intencionada a estar dentro do escopo do termo como aqui definido e utilizado. Os resíduos de aminoácidos apropriados que abrangem as CDRs como definidos por cada uma das referências citadas acima são apresentados abaixo na Tabela 1 como uma comparação. Os números exatos de resíduos que abrangem uma CDR particular irão variar dependendo da sequência e tamanho da CDR. Os habilitados na técnica podem rotineiramente determinar quais os resíduos compreendem uma CDR particular, dada a sequência de aminoácidos de região variável do anticorpo.

Tabela 1. Definições¹ de CDR

	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

¹Numeração de todas as definições de CDR na Tabela 1 está de acordo com as convenções de numeração apresentadas por Kabat *et al.* (veja, abaixo).

[0043]Kabat *et al.* também definiu um sistema de numeração para sequências de domínio variável que é aplicável a qualquer anticorpo. Uma pessoa de habilidade comum na técnica pode atribuir inequivocamente este sistema de “numeração de Kabat” a qualquer sequência de domínio variável, sem confiança em quaisquer dados experimentais além da própria sequência. Como aqui utilizado, a “numeração de Kabat” refere-se ao sistema de numeração apresentado por Kabat *et al.* (1983) U.S. Dept. of Health and Human Services, “Sequence of Proteins of Immunological Interest.” A menos que de outro modo especificado, as referências à numeração de posições de resíduo de aminoácido específicas em um anticorpo anti-SEMA4D ou fragmento de ligação ao antígeno, variante, ou seu derivado da presente invenção são de acordo com o sistema de numeração de Kabat.

[0044]Os anticorpos ou fragmentos de ligação ao antígeno, variantes, ou seus derivados da invenção incluem, mas não são limitados a, policlonais, monoclonais, multi-específicos e biespecíficos, em que pelo menos uma ramificação é específica para anticorpos anti-SEMA4D, humanos, humanizados, primatizados ou quiméricos, anticorpos de cadeia única, fragmentos de ligação ao epítopo, por exemplo, Fab, Fab' e F(ab')₂, Fd, Fvs, Fvs de cadeia única (scFv), Fvs ligado a dissulfeto (sdFv), fragmentos compreendendo um domínio VL ou VH, fragmentos produzidos por uma biblioteca de expressão de Fab, e anticorpos anti-idiotípicos (anti-Id) (incluindo, por exemplo, anticorpos anti-Id a anticorpos anti-SEMA4D aqui divulgados). As moléculas ScFv são conhecidas na técnica e são descritas, por exemplo, na Pat. U.S. Nº 5.892.019. As moléculas de imunoglobulina ou anticorpo da invenção podem ser de qualquer tipo

(por exemplo, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA, e IgY), classe (por exemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, e IgA2, etc.), ou subclasse de molécula de imunoglobulina.

[0045] Como aqui utilizado, o termo “porção de cadeia pesada” inclui sequência de aminoácidos derivada a partir de uma cadeia pesada de imunoglobulina. Em certas formas de realização, um polipeptídeo compreendendo uma porção de cadeia pesada compreende pelo menos um de: um domínio VH, um domínio CH1, um domínio de dobradiça (por exemplo, região de dobradiça superior, média, e/ou inferior), um domínio CH2, um domínio CH3, ou uma variante ou seu fragmento. Por exemplo, um polipeptídeo de ligação para o uso na invenção pode compreender uma cadeia de polipeptídeos compreendendo um domínio CH1; uma cadeia de polipeptídeos compreendendo um domínio CH1, pelo menos uma porção de um domínio de dobradiça, e um domínio CH2; uma cadeia de polipeptídeos compreendendo um domínio CH1 e um domínio CH3; uma cadeia de polipeptídeos compreendendo um domínio CH1, pelo menos uma porção de um domínio de dobradiça, e um domínio CH3, ou uma cadeia de polipeptídeos compreendendo um domínio CH1, pelo menos uma porção de um domínio de dobradiça, um domínio CH2, e um domínio CH3. Em uma outra forma de realização, um polipeptídeo da invenção compreende uma cadeia de polipeptídeos compreendendo um domínio CH3. Além disso, um polipeptídeo de ligação para o uso na invenção pode carecer de pelo menos uma porção de um domínio CH2 (por exemplo, toda ou parte de um domínio CH2). Como apresentado acima, será entendido por uma pessoa de habilidade comum na técnica que estes domínios (por exemplo, as porções de cadeia pesada) podem ser modificados, tais que eles variam em sequência de aminoácido a partir de uma molécula de imunoglobulina que ocorre naturalmente.

[0046] Em certos anticorpos anti-SEMA4D, ou fragmentos de ligação ao antígeno, variantes, ou seus derivados aqui divulgados, as porções de cadeia pesada de uma cadeia de polipeptídeos de um multímero são idênticas àquelas em uma segunda

cadeia de polipeptídeos do multímero. Alternativamente, os monômeros contendo porção de cadeia pesada da invenção não são idênticos. Por exemplo, cada monômero pode compreender um sítio de ligação alvo diferente, formando, por exemplo, um anticorpo biespecífico.

[0047]As porções de cadeia pesada de uma molécula de ligação para o uso nos métodos aqui divulgados podem ser derivadas de moléculas de imunoglobulina diferentes. Por exemplo, uma porção de cadeia pesada de um polipeptídeo pode compreender um domínio CH1 derivado a partir de uma molécula de IgG1 e uma região de dobradiça derivada a partir de uma molécula de IgG3. Em um outro exemplo, uma porção de cadeia pesada pode compreender uma região de dobradiça derivada, em parte, a partir de uma molécula de IgG1 e, em parte, a partir de uma molécula de IgG3. Em um outro exemplo, uma porção de cadeia pesada pode compreender uma dobradiça quimérica derivada, em parte, a partir de um molécula de IgG1 e, em parte, a partir de uma molécula de IgG4.

[0048]Como aqui utilizado, o termo “porção de cadeia leve” inclui sequência de aminoácidos derivada a partir de uma cadeia leve de imunoglobulina, por exemplo, uma cadeia leve de kappa ou lambda. Preferivelmente, a porção de cadeia leve compreende pelo menos um de um domínio VL ou CL.

[0049]Anticorpos anti-SEMA4D, ou fragmentos de ligação ao antígeno, variantes, ou seus derivados aqui divulgados podem ser descritos ou especificados em termos do(s) epítipo(s) ou porção(s) de um antígeno, por exemplo, um polipeptídeo alvo aqui divulgado (por exemplo, SEMA4D) que eles reconhecem ou especificamente se ligam. A porção de um polipeptídeo alvo que especificamente interage com o domínio de ligação ao antígeno de um anticorpo é um “epítipo,” ou um “determinante antigênico”. Um polipeptídeo alvo pode compreender um epítipo único, mas tipicamente compreende pelo menos dois epítipos, e pode incluir qualquer número de epítipos, dependendo do tamanho, conformação, e tipo de antígeno. Além disso, deve

ser observado que um “epítopo” em um polipeptídeo alvo pode ser ou pode incluir elementos de não polipeptídeos, por exemplo, um epítopo pode incluir uma cadeia lateral de carboidrato.

[0050]O tamanho mínimo de um epítopo de peptídeo ou polipeptídeo para um anticorpo é considerado ser de cerca de quatro a cinco aminoácidos. Epítopos de peptídeo ou polipeptídeo preferivelmente contêm pelo menos sete, mais preferivelmente pelo menos nove e o mais preferivelmente entre pelo menos cerca de 15 a cerca de 30 aminoácidos. Visto que uma CDR pode reconhecer um peptídeo ou polipeptídeo antigênico em sua forma terciária, os aminoácidos compreendendo um epítopo não necessitam ser contíguos, e em alguns casos, não podem mesmo estar na mesma cadeia de peptídeos. Um epítopo de peptídeo ou polipeptídeo reconhecido por anticorpos anti-SEMA4D da presente invenção podem conter uma sequência de pelo menos 4, pelo menos 5, pelo menos 6, pelo menos 7, mais preferivelmente pelo menos 8, pelo menos 9, pelo menos 10, pelo menos 15, pelo menos 20, pelo menos 25, ou entre cerca de 15 a cerca de 30 aminoácidos contíguos ou não contíguos de SEMA4D.

[0051]Por “se liga especificamente,” entende-se geralmente que um anticorpo se liga a um epítopo que, através do seu domínio de ligação ao antígeno, e que a ligação envolve uma complementaridade entre o domínio de ligação ao antígeno e o epítopo. De acordo com esta definição, um anticorpo é o dito para “se ligar especificamente” a um epítopo quando ele se liga àquele epítopo, através do seu domínio de ligação ao antígeno mais facilmente do que ele se ligaria a um epítopo não relacionado aleatório. O termo “especificidade” é aqui utilizado para qualificar a afinidade relativa pela qual um anticorpo certo se liga a um certo epítopo. Por exemplo, o anticorpo “A” pode ser considerado como tendo uma maior especificidade para um determinado epítopo do que anticorpo “B,” ou anticorpo “A” pode ser o dito para se ligar a epítopo “C” com uma maior especificidade do que tem para o epítopo “D” relacionado.

[0052]Por “se liga preferencialmente”, entende-se que o anticorpo se liga especificamente a um epítopo mais facilmente do que se ligaria a um epítopo relacionado, similar, homólogo ou análogo. Assim, um anticorpo que “se liga preferencialmente” a um determinado epítopo se ligaria mais provavelmente àquele epítopo do que a um epítopo relacionado, ainda que um tal anticorpo pode reagir de forma cruzada com o epítopo relacionado.

[0053]Por via de exemplo não limitante, um anticorpo pode ser considerado para se ligar a um primeiro epítopo, preferencialmente, se liga ao dito primeiro epítopo com uma constante de dissociação (K_D) que é menos do que a K_D do anticorpo para o segundo epítopo. Em um outro exemplo não limitante, um anticorpo pode ser considerado para se ligar a um primeiro antígeno, preferencialmente se liga ao primeiro epítopo com uma afinidade que é pelo menos uma ordem de magnitude menos do que a K_D do anticorpo para o segundo epítopo. Em um outro exemplo não limitante, um anticorpo pode ser considerado para se ligar a um primeiro epítopo, preferencialmente se liga ao primeiro epítopo com uma afinidade que é pelo menos duas ordens de magnitude menos do que a K_D de anticorpo para o segundo epítopo.

[0054]Em um outro exemplo não limitante, um anticorpo pode ser considerado para se ligar um primeiro epítopo, preferencialmente se liga ao primeiro epítopo com uma constante de dissociação ($k(\text{off})$) que é menos do que a $k(\text{off})$ do anticorpo para o segundo epítopo. Em um outro exemplo não limitante, um anticorpo pode ser considerado para se ligar um primeiro epítopo, preferencialmente se liga ao primeiro epítopo com uma afinidade que é pelo menos uma ordem de magnitude menos do que a $k(\text{off})$ do anticorpo para o segundo epítopo. Em um outro exemplo não limitante, um anticorpo pode ser considerado para se ligar a um primeiro epítopo, preferencialmente se liga ao primeiro epítopo com uma afinidade que é pelo menos duas ordens de magnitude menos do que a $k(\text{off})$ do anticorpo para o segundo epítopo. Um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno, variante, ou derivado aqui divulgado pode ser o

dito para se ligar a um polipeptídeo alvo aqui divulgado (por exemplo, SEMA4D, por exemplo, SEMA4D humana, de murino, ou tanto humana quanto de murino) ou um fragmento ou sua variante com uma constante de dissociação ($k(\text{off})$) inferior ou igual a $5 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$, 10^{-2} s^{-1} , $5 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ ou 10^{-3} s^{-1} . Mais preferivelmente, um anticorpo da invenção pode ser o dito para se ligar a um polipeptídeo alvo aqui divulgado (por exemplo, SEMA4D, por exemplo, SEMA4D humana, de murino, ou tanto humana quanto de murino) ou um fragmento ou sua variante com uma constante de dissociação ($k(\text{off})$) inferior ou igual a $5 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$, 10^{-4} s^{-1} , $5 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$, ou 10^{-5} s^{-1} , $5 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$, 10^{-6} s^{-1} , $5 \times 10^{-7} \text{ s}^{-1}$ ou 10^{-7} s^{-1} .

[0055]Um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno, variante, ou derivado aqui divulgado pode ser o dito para se ligar a um polipeptídeo alvo aqui divulgado (por exemplo, SEMA4D, por exemplo, SEMA4D humana, de murino, ou tanto humana quanto de murino) ou um fragmento ou sua variante com uma constante de associação ($k(\text{on})$) superior ou igual a $10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, $5 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, $10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ou $5 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Mais preferivelmente, um anticorpo da invenção pode ser o dito para se ligar a um polipeptídeo alvo aqui divulgado (por exemplo, SEMA4D, por exemplo, SEMA4D humana, de murino, ou tanto humana quanto de murino) ou um fragmento ou sua variante com uma constante de associação ($k(\text{on})$) superior ou igual a $10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, $5 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, ou $5 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ou $10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$.

[0056]Um anticorpo é o dito inibir competitivamente a ligação de um anticorpo de referência a um determinado epítopo se, preferencialmente se liga àquele epítopo na medida que bloqueia, em algum grau, a ligação do anticorpo de referência ao epítopo. A inibição competitiva pode ser determinada por qualquer método conhecido na técnica, por exemplo, ensaios ELISA de competição. Um anticorpo pode ser o dito inibir competitivamente a ligação do anticorpo de referência a um determinado epítopo por pelo menos 90 %, pelo menos 80 %, pelo menos 70 %, pelo menos 60 %, ou pelo menos 50 %.

[0057]Tal como aqui utilizado, o termo “afinidade” refere-se a uma medida da força da ligação de um epítopo individual com a CDR de uma molécula de imunoglobulina. Veja, por exemplo, Harlow *et al.* (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2ª ed.) páginas 27 - 28. Como aqui utilizado, o termo “avidez” refere-se à estabilidade global do complexo entre uma população de imunoglobulinas e um antígeno, isto é, a força da combinação funcional de uma mistura de imunoglobulina com o antígeno. Veja, por exemplo, Harlow nas páginas 29 - 34. A avidez está relacionada tanto com a afinidade de moléculas de imunoglobulina individuais na população com epítopos específicos, quanto também com as valências das imunoglobulinas e do antígeno. Por exemplo, a interação entre um anticorpo monoclonal bivalente e um antígeno com uma estrutura de epítopo altamente de repetição, tal como um polímero, seria um de alta avidez.

[0058]Os anticorpos anti-SEMA4D ou fragmentos de ligação ao antígeno, variantes, ou seus derivados da invenção também podem ser descritos ou especificados em termos de sua reatividade cruzada. Como aqui utilizado, o termo “reatividade cruzada” refere-se à capacidade de um anticorpo, específica para um antígeno, reagir com um segundo antígeno; uma medida de afinidade entre duas substâncias antigênicas diferentes. Assim, um anticorpo reativo cruzado se liga a um epítopo exceto a um que induz sua formação. O epítopo reativo cruzado, geralmente, contém qualquer uma das mesmas características estruturais complementares como o epítopo indutor, e em alguns casos, pode realmente se ajustar melhor do que o original.

[0059]Por exemplo, certos anticorpos têm algum grau de reatividade cruzada, em que, relacionando-se, eles se ligam, mas não idênticos, por exemplo, epítopos com identidade de pelo menos 95 %, pelo menos 90 %, pelo menos 85 %, pelo menos 80 %, pelo menos 75 %, pelo menos 70 %, pelo menos 65 %, pelo menos 60 %, pelo menos 55 %, e pelo menos 50 % (como calculada usando métodos conhecidos na técnica e aqui descritos) a um epítopo de referência. Um anticorpo pode ser

considerado como tendo pouca ou nenhuma reatividade cruzada se ele não se liga a epítomos com identidade inferior a 95 %, inferior a 90 %, inferior a 85 %, inferior a 80 %, inferior a 75 %, inferior a 70 %, inferior a 65 %, inferior a 60 %, inferior a 55 %, e inferior a 50 % (como calculada usando métodos conhecidos na técnica e aqui descritos) a um epítomo de referência. Um anticorpo pode ser considerado “altamente específico” para um certo epítomo, se ele não se liga a qualquer outro análogo, ortólogo, ou homólogo daquele epítomo.

[0060]As moléculas de ligação anti-SEMA4D, por exemplo, anticorpos ou fragmentos de ligação ao antígeno, variantes ou seus derivados, da invenção também podem ser descritas ou especificadas em termos de sua afinidade de ligação a um polipeptídeo da invenção, por exemplo, SEMA4D, por exemplo, SEMA4D humana, de murino, ou tanto humana quanto de murino. Afinidades de ligação preferidas incluem aquelas com uma constante de dissociação ou Kd menos do que 5×10^{-2} M, 10^{-2} M, 5×10^{-3} M, 10^{-3} M, 5×10^{-4} M, 10^{-4} M, 5×10^{-5} M, 10^{-5} M, 5×10^{-6} M, 10^{-6} M, 5×10^{-7} M, 10^{-7} M, 5×10^{-8} M, 10^{-8} M, 5×10^{-9} M, 10^{-9} M, 5×10^{-10} M, 10^{-10} M, 5×10^{-11} M, 10^{-11} M, 5×10^{-12} M, 10^{-12} M, 5×10^{-13} M, 10^{-13} M, 5×10^{-14} M, 10^{-14} M, 5×10^{-15} M, ou 10^{-15} M. Em certas formas de realização, a molécula de ligação anti-SEMA4D, por exemplo, um anticorpo ou fragmento de ligação com o antígeno do mesmo, da invenção se liga à SEMA4D humana com uma Kd de cerca de 5×10^{-9} a cerca de 6×10^{-9} . Em uma outra forma de realização, a molécula de ligação anti-SEMA4D, por exemplo, um anticorpo ou fragmento de ligação com o antígeno do mesmo, da invenção se liga a SEMA4D de murino com uma Kd de cerca de 1×10^{-9} a cerca de 2×10^{-9} .

[0061]Tal como aqui utilizado, o termo “anticorpo quimérico” será mantido a significar qualquer anticorpo, em que a região ou sítio imunorreativo é obtido ou derivado a partir de uma primeira espécie e a região constante (que pode ser intacta, parcial ou modificada de acordo com a presente invenção) é obtida a partir de uma segunda espécie. Em formas de realização preferidas, a região ou sítio ligação alvo

será a partir de uma fonte não humana (por exemplo, camundongo ou primata) e a região constante é humana.

[0062] Como aqui utilizado, o termo “anticorpo engendrado” refere-se a um anticorpo, em que o domínio variável na cadeia pesada ou leve ou ambas é alterado por pelo menos uma substituição parcial de uma ou mais CDRs a partir de um anticorpo de especificidade conhecida e, se necessário, por substituição parcial da região da estrutura e mudança da sequência. Embora as CDRs podem ser derivadas a partir de um anticorpo da mesma classe ou mesma subclasse como o anticorpo a partir do qual as regiões de estrutura são derivadas, é considerado que as CDRs serão derivadas a partir de um anticorpo de diferente classe e, preferivelmente, de um anticorpo a partir de uma diferente espécie. Um anticorpo engendrado, em que uma ou mais CDRs “doadoras” a partir de um anticorpo não humano de especificidade conhecida é inserido em uma região de estrutura cadeia pesada ou leve humana é referido aqui como um “anticorpo humanizado”. Pode não ser necessário substituir todas as CDRs com as CDRs completas a partir do domínio variável doador para transferir a capacidade de ligação ao antígeno de um domínio variável a um outro. Um vez disso, apenas pode ser necessário transferir aqueles resíduos que são necessários manter a atividade do sítio de ligação alvo.

[0063] Reconhece-se também que as regiões de estrutura dentro do domínio variável em uma cadeia pesada ou leve, ou ambas, de um anticorpo humanizado pode compreender somente resíduos de origem humana, caso este em que estas regiões de estrutura do anticorpo humanizado são referidas como “regiões de estrutura completamente humanas” (por exemplo, MAb VX15/2503, divulgado no Publicação de Pedido de Patente dos EUA Nº US 2010/0285036 A1 como MAb 2503, incorporada aqui como referência em sua totalidade). Alternativamente, um ou mais resíduos da(s) região(s) de estrutura do domínio variável doador podem ser engendrados dentro da posição correspondente da(s) região(s) de estrutura humana(s) de um domínio

variável em uma cadeia pesada ou leve, ou ambas, de um anticorpo humanizado se necessário manter a ligação apropriada ou realçar a ligação ao antígeno de SEMA4D. Uma região de estrutura humana que foi engendrada em sua maneira assim compreenderia uma mistura de resíduos de estrutura humana e de doador, e é referida aqui como um “região de estrutura parcialmente humana”.

[0064]Por exemplo, a humanização de um anticorpo anti-SEMA4D pode ser essencialmente realizada segundo o método de Winter e co-workers (Jones *et al.*, *Nature* 321: 522 - 525 (1986); Riechmann *et al.*, *Nature* 332: 323 - 327 (1988); Verhoeven *et al.*, *Science* 239: 1534 - 1536 (1988)), substituindo as CDRs de roedor ou roedor mutante ou sequências de CDR pelas sequências correspondentes de um anticorpo anti-SEMA4D humano. Veja, também Pat. U.S. N^{os} 5.225.539; 5.585.089; 5.693.761; 5.693.762; 5.859.205; aqui incorporada como referência. O anticorpo anti-SEMA4D humanizado resultante compreenderia pelo menos uma CDR de roedor ou roedor mutante dentro das regiões de estrutura completamente humanas do domínio variável da cadeia pesada e/ou leve do anticorpo humanizado. Em alguns casos, os resíduos dentro das regiões de estrutura de um ou mais domínios variáveis do anticorpo anti-SEMA4D humanizado são substituídos por resíduos não humanos (por exemplo, roedor) correspondentes (veja, por exemplo, Pat. U.S. N^{os} 5.585.089; 5.693.761; 5.693.762; e 6.180.370), caso este, em que o anticorpo anti-SEMA4D humanizado resultante compreenderia regiões de estrutura parcialmente humanas dentro do domínio variável da cadeia pesada e/ou leve.

[0065]Além disso, os anticorpos humanizados podem compreender resíduos que não são encontrados no anticorpo receptor ou no anticorpo doador. Estas modificações são feitas para refinar mais o desempenho do anticorpo (por exemplo, para obter a afinidade desejada). Em geral, o anticorpo humanizado compreenderá, substancialmente, todos de pelo menos um, e tipicamente dois, domínios variáveis, em que todas ou substancialmente todas as CDRs correspondem àquelas de uma

imunoglobulina não humana e todas ou substancialmente todas as regiões de estrutura são aquelas de uma sequência de imunoglobulina humana. O anticorpo humanizado, opcionalmente, também compreenderá pelo menos uma porção de uma região constante de imunoglobulina (Fc), tipicamente, a de uma imunoglobulina humana. Para mais detalhes, veja, Jones *et al.*, *Nature* 331: 522 - 525 (1986); Riechmann *et al.*, *Nature* 332: 323 - 329 (1988); e Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2: 593 - 596 (1992); aqui incorporados como referência. Consequentemente, tais anticorpos “humanizados” podem incluir anticorpos, em que substancialmente menos do que um domínio variável humano intacto foi substituído pela sequência correspondente a partir de uma espécie não humana. Na prática, os anticorpos humanizados são tipicamente anticorpos humanos, em que alguns resíduos de CDR e possivelmente alguns resíduos de estrutura são substituídos por resíduos de sítios análogos em anticorpos de roedor. Veja, por exemplo, Pat. U.S. Nºs 5.225.539; 5.585.089; 5.693.761; 5.693.762; 5.859.205. Veja, também Pat. U.S. Nº 6.180.370, e Publicação Internacional Nº WO 01/27160, onde os anticorpos humanizados e técnicas para produzir anticorpos humanizados tendo afinidade melhorada para um antígeno pré determinado são divulgados.

II. Barreira Hematoencefálica (“BBB”)

[0066]A barreira hematoencefálica (BBB) é uma interface ativa entre sangue em circulação e o sistema nervoso central (CNS). A BBB restringe a livre circulação de substâncias diferentes entre as duas áreas e desempenha um papel crucial na manutenção da homeostase do CNS. A BBB tem tanto uma função de barreira e uma função transportadora. Como uma barreira, a BBB restringe a circulação de células e substâncias potencialmente tóxicas ou nocivas a partir do sangue ao cérebro. Como uma transportadora, por outro lado, a BBB é responsável pelo transporte de nutrientes ao cérebro e remover metabólitos.

[0067]A BBB é composta principalmente de três componentes: células

endoteliais, astrócitos e pericitos. As células endoteliais formam uma camada contínua que cobre a superfície interna dos capilares e vasos sanguíneos no cérebro. (Ransohoff *et al.*, “Three or More Routes for Leukocyte Migration Into the Central Nervous System”, *Nature Rev. Immun.* 3: 569 - 581 (2003). As células endoteliais estão localizadas adjacentes à membrana basal, que consiste principalmente de colágeno IV, fibronectina, laminina e proteoglicanos, e são interligados por junções apertadas que formam uma estrutura semelhante a correia na região apical das células. As células endoteliais restringem a difusão de objetos microscópicos (por exemplo, bactéria) e moléculas grandes ou hidrofílicas na parênquima cerebral e fluido cerebrospinal (CSF), embora permitindo a difusão de moléculas hidrofóbicas pequenas (O₂, hormônios, CO₂). As células da barreira transportam ativamente os produtos metabólicos, tais como glicose através da barreira com proteínas específicas.

[0068]As células endoteliais que formam os capilares do cérebro são diferentes daqueles encontrados em outros tecidos do corpo. As células endoteliais dos capilares do cérebro são reunidos por junções intercelulares apertadas que formam uma parede contínua contra a difusão passiva de moléculas a partir do sangue ao cérebro e outras partes do CNS (incluindo fluido cerebrospinal, CSF). Estas células também são diferentes em que elas têm algumas vesículas pinocíticas que em outros tecidos permitem um pouco de transporte seletivo através da parede capilar. Também deficiente, são lacunas ou canais contínuos que funcionam entre as células que permitiriam a passagem irrestrita.

[0069]Além de células endoteliais, a BBB também é composta de pericitos e astrócitos. Os pericitos estão localizados dentro da membrana basal, interagem com células endoteliais e desempenham um papel importante na regulação de proliferação endotelial, angiogênese e processos inflamatórios. Os astrócitos são células gliais na forma de estrela características no cérebro e medula espinhal e são as células mais abundantes do cérebro humano. Eles realizam muitas funções, incluindo suporte

bioquímico de células endoteliais que formam a barreira hematoencefálica, fornecimento de nutrientes ao tecido do sistema nervoso, manutenção de equilíbrio de íons extracelulares, e um papel no processo reparação e cicatrização do cérebro e medula espinhal após lesões traumáticas.

[0070]As funções da barreira hematoencefálica para assegurar que o ambiente do cérebro é constantemente controlado. Os níveis de várias substâncias no sangue, tais como hormônios, aminoácidos, e íons, são submetidos a pequenas flutuações frequentes que podem ser provocadas por atividades, tais como comer e exercitar (Goldstein *et al.*, "The Blood-Brain Barrier", Scientific American 255: 74 - 83 (1986); Pardridge, "Receptor-Mediated Peptide Transport Through the Blood-Brain Barrier", Endocrin. Rev. 7: 314 - 330 (1986)). Se o cérebro não foi protegido pela barreira hematoencefálica a partir destas variações na composição do soro, o resultado pode ser atividade neural descontrolada.

[0071]O isolamento do cérebro a partir da corrente sanguínea não é completa. Se isto fosse o caso, o cérebro seria incapaz de funcionar adequadamente devido à falta de nutrientes e por causa da necessidade de trocar produtos químicos com o resto do corpo. A presença de sistemas de transporte específico dentro das células endoteliais capilares assegura que o cérebro recebe, em uma maneira controlada, todos dos compostos necessários para o crescimento e funcionamento normal. Em muitos casos, estes sistemas de transporte consiste em proteínas associadas à membrana, que seletivamente se ligam a e transportam certas moléculas através das membranas de barreira. Estas proteínas transportadoras são conhecidas como transportadores de soluto.

[0072]Embora a BBB serve para proteger o cérebro e o sistema nervoso central de danos a partir de moléculas e células externas, as moléculas e células externas podem frequentemente atravessar a BBB e, em números limitados, podem até ser benéficos, tais como para vigilância imunológica do CNS. Entretanto, quando as

células altamente ativas, tais como, por exemplo, células B, células T, leucócitos e macrófagos, atravessam a BBB em excesso e atingem o cérebro, elas podem causar dano ao cérebro. Os pacientes sofrendo de edema, traumas cerebrais, acidente vascular cerebral e esclerose múltipla, por exemplo, apresentando uma ruptura da BBB.

[0073]O efeito da BBB em vários transtornos neuro-inflamatórios foi estudado. (Zlokovic BV, “The Blood-Brain in Health and Chronic Neurodegenerative Disorders”, *Neuron* 57: 178 - 201 (2008); Zhong Z *et al.*, “ALS-causing SOD1 mutants generate vascular changes prior to motor neuron degeneration” *Nature Neuroscience* 11(4): 420 - 422 (2008); Hawkins BT *et al.*, “The Blood-Brain Barrier/neurovascular Unit in Health and Disease”, *Pharmacological Rev* 57 (2): 173 - 185 (2005); Oby E *et al.*, “The Blood-Brain Barrier and Epilepsy”, *Epilepsia* 47(11): 1761 - 1774 (2006)). Além disso, há evidências crescentes que a inflamação e a barreira hematoencefálica (BBB) (Banks e Erickson, 2010; Lochhead *et al.*, 2010) estão envolvidas na patogênese de doenças neurológicas, tais como meningite (van der *et al.*, 2004), edema cerebral (Stamatovic *et al.*, 2006), doença de Alzheimer (Kalaria, 1992), doença de Parkinson (Westin, J.E., *et al.*, “Endothelial Proliferation and Increased Blood-Brain Barrier Permeability in the Basal Ganglia in a Rat Model of 3,4-Dihydroxyphenyl-L-Alanine-Induced Dyskinesia”, *The Journal of Neuroscience* 26(37): 9448 - 9461 (2006)) e esclerose múltipla (Mina-gar e Alexander, 2003).

[0074]No caso de esclerose múltipla, por exemplo, foi mostrado usando Imagem por Ressonância Magnética (“MRI”), que quando uma pessoa está passando por um “ataque” de MS, a BBB foi quebrada em uma parte do cérebro ou medula espinhal, permitindo os linfócitos T atravessar e atacar a mielina que protege e insola os neurônios do sistema nervoso central tanto no cérebro quanto na medula espinhal. (Zlokovic 2008; Waubant E., “Biomarkers indicative of blood–brain barrier rompimento in multiple sclerosis”. *Disease Markers* 22 (4): 235-44 (2006)).

[0075]A meningite, por outro lado, ocorre quando existe uma inflamação das

membranas que circundam o cérebro e medula espinhal (estas membranes são conhecidas como meninges). Quando as meninges são inflamadas, a barreira hematoencefálica pode ser rompida, permitindo tanto as células inflamatórias quanto várias substâncias (incluindo toxinas ou antibióticos) entrar no cérebro. (Beam, TR Jr., *et al.* (Dezembro de 1977). “Blood, brain, and cerebrospinal fluid concentrations of several antibiotics in rabbits with intact and inflamed meninges”. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 12 (6): 710-6).

[0076]Similarmente, no caso de doença de Parkinson (PD), tem sido sugerido que a absorção ou metabolismo de toxinas PD putativas, e sua eliminação defeituosa em toda a BBB, devido à atividade baixa da P-glicoproteína transportadora (P-gp), uma bomba de efluxo dependente de ATP que medeia a remoção rápida de metabólitos lipofílicos tóxicos ingeridos, pode desempenhar um papel na patogênese de PD (Kortekaas, R., Leenders, K.L., van Oostrom, J.C., Vaalburg, W., Bart, J., Willemsen, A.T., e Hendrikse, N.H. *Blood-brain barrier dysfunction in parkinsonian midbrain in vivo*. *Ann. Neurol.* 57, 176 - 179, 2005). A neuroinflamação também parece ser uma descoberta unipresente em pacientes com PD e modelos experimentais de PD. A ativação de fagócitos, síntese aumentada e liberação de citocinas pró-inflamatórias, ativação de complemento, ativação de microglia, e liberação de espécie de oxigênio reativa (ROS) foram descritas (Whitton, P.S. *Inflammation as a causative factor in the aetiology of Parkinson's disease*. *Br. J. Pharmacol.* 150, 963-976, 2007).

[0077]Em epilepsia, os estudos têm implicado na falha da função da barreira hematoencefálica em desencadear convulsões crônicas ou agudas devido a certas interações entre uma proteína, albumina e astrócitos do sangue comum. Estes resultados sugerem que as convulsões agudas são um resultado de rompimento da BBB por mecanismos artificiais ou inflamatórios. (Oby, E; *et al.* (2006). “The Blood–Brain Barrier and Epilepsy” (PDF). *Epilepsia* 47 (11): 1761 - 1774).

[0078]Em pacientes com Doença de Alzheimer (AD), a evidência aponta para

o rompimento da barreira hematoencefálica em permitir que o plasma sanguíneo contendo beta-amilóide (A β) para entrar no cérebro através de RAGE, um transportador de influxo principal para A β em toda a BBB. Os estudos têm mostrado que a interação de A β /RAGE resulta em transcitose de A β circulante em toda a BBB na parênquima cerebral e sua ligação a neurônios, ativação endotelial mediada por NF-kB resultando em secreção de citocinas pró-inflamatórias, a expressão de moléculas de adesão, e a geração de endotelina-1, que suprime o CBF (Fluxo Sanguíneo Cerebral). Além disso, foi mostrado que a interação de A β /RAGE contribui para a morte neuronal produzindo dano oxidativo a neurônios que expressam RAGE e ativando a microglia. (Zlokovic, B.V. The Blood-Brain Barrier in Health and Chronic Neurodegenerative Disorders. *Neuron* 57, 178 - 201, 2008). O efluxo deficiente de A β fora da parênquima cerebral e na microvasculatura por intermédio da BBB também foi encontrado no ajuste de AD patogênese e foi atribuído, em parte, à função da proteína 1 relacionada ao receptor de lipoproteína (LRP1) de baixa densidade comprometida. LRP1 é uma proteína de membrana da BBB abluminal que se liga e transporta combinadores estruturais diferentes de A β (Deane *et al.*, "LRP/amyloid beta-peptide interaction mediates differential brain efflux of Abeta isoforms". *Neuron* 43, 333 - 344, 2004). A exposição de A β muda os padrões de expressão da superfície celular de proteína de junção apertada, incluindo claudina-5 e ZO-2, em células endoteliais microvasculares cerebrais ao citoplasma (Marco *et al.*, "Amyloid β -peptide 1-42 alters tight junction protein distribution and expression in brain microvessel endothelial cells". *Neurosci. Lett.* 401, 219 - 224, 2006), e severamente compromete a resistência elétrica transendotelial (TEER) de monocamadas destas células (Gonzalez-Velasquez *et al.*, "Soluble aggregates of the amyloid-beta protein selectively stimulate permeability in human brain microvascular endothelial monolayers". *J. Neurochem.* 107, 466 - 477, 2008).

[0079]Em esclerose lateral amiotrófica (ALS), os estudos têm sugerido que ruptura da BBB pode resultar em fuga de proteínas séricas que interagem com os

neurônios motores para produzir ROS (Espécie de Oxigênio Reativo) e iniciar um resposta autoimune, causando desmielinização, rompimento da transmissão neuronal, e morte celular. (Zlokovic 2008).

[0080]Um estudo recente sugere que o enfraquecimento da BBB pode resultar de uma perturbação em células endoteliais mediadas através de seu receptor VEGF-A. (Argaw AT *et al.*, “VEGF-mediated disruption of endothelial CLN-5 promotes blood-brain barrier breakdown”, PNAS 106(6): 1977 - 1982 (2009)). De acordo com este estudo, VEGF-A, que é derivado de astrócitos, alveja e rompe a expressão de tanto claudina-5 (CLN-5) e ocludina (OCLN) de proteína de junção apertada transmembrana endotelial. Como expressão de tanto CLN-5 quanto OCLN diminui, a ruptura da BBB aumenta.

[0081]Tal como mostrado nos presentes exemplos, um outro mecanismo possível para o enfraquecimento da BBB é como um resultado de perturbação de células endoteliais através da receptor de alta afinidade de Plexina-B1 (1 nM) para SEMA4D. A Plexina-B1 pode ser expressa por células endoteliais. Na presença de SEMA4-D, as células endoteliais podem passar por uma transformação que altera a morfologia ou função das células endoteliais, assim como causar um enfraquecimento da BBB, por exemplo, através da modificação de junções apertadas. Este enfraquecimento da BBB pode, por sua vez, aumentar a permeabilidade da BBB às células e moléculas e permitir tais células e moléculas entrar e alterar a atividade do cérebro e sistema nervoso central. A adição de anti-SEMA4D ou anti-Plexina-B1, conseqüentemente, pode impedir as células endoteliais de passar por uma transformação e reduzir o enfraquecimento da BBB.

III. Descrição de Polipeptídeo Alvo

[0082]Como aqui utilizado, os termos “semaforina-4D,” “SEMA4D” e “polipeptídeo de SEMA4D” são utilizados permutavelmente, como são “SEMA4D” e “Sema4D.” Em certas formas de realização, SEMA4D é expressa na superfície de ou

secretada por uma célula. Em uma outra forma de realização, SEMA4D é ligada à membrana. Em outras formas de realização, SEMA4D é solúvel, por exemplo, sSEMA4D. Em outras formas de realização, SEMA4D pode incluir uma SEMA4D de tamanho completo ou um fragmento da mesma, ou um polipeptídeo de variante de SEMA4D, em que o fragmento de SEMA4D ou polipeptídeo de variante de SEMA4D retém algumas ou todas as propriedades funcionais da SEMA4D de tamanho completo.

[0083]A proteína SEMA4D humana de tamanho completo é uma proteína transmembranar homodimérica que consiste em duas cadeias de polipeptídeo de 150 kDa. SEMA4D pertence à família de semaforina de receptores de superfície celular e também é referida como CD100. SEMA4D/Sema4D tanto humana quanto de camundongo são proteoliticamente clivada da sua forma transmembranar para gerar formas solúveis de 120-kDa, indicando a existência de duas isoformas de Sema4D (Kumanogoh *et al.*, *J. Cell Science* 116(7): 3464 (2003)). Semaforinas incluem proteínas solúveis e ligadas à membrana que foram originalmente definidas como fatores de orientação axonal durante o desenvolvimento que desempenham um papel importante no estabelecimento de conexões precisas entre os neurônios e seu alvo apropriado. Estruturalmente considerada, uma semaforina de classe IV, SEMA4D de tamanho completo inclui uma sequência de sinal amino-terminal seguido por um domínio 'Sema' característico, que contém 17 resíduos de cisteína conservados, um domínio de tipo Ig, um estiramento rico em lisina, uma região transmembranar hidrofóbica, e uma cauda citoplásmica.

[0084]Cada cadeia de polipeptídeos de SEMA4D inclui uma sequência de sinal de cerca de 13 aminoácidos seguido por um domínio de semaforina de cerca de 512 aminoácidos, um domínio de tipo imunoglobulina (tipo de Ig) de cerca de 65 aminoácidos, um estiramento rico em lisina de 104 aminoácidos, uma região transmembranar hidrofóbica de cerca de 19 aminoácidos, e uma cauda citoplásmica de 110

aminoácidos. Um sítio de consenso para a fosforilação de tirosina na cauda citoplásmica suporta a associação prognosticada de SEMA4D com uma tirosina cinase (Schlossman, *et al.*, Eds. (1995) *Leucocyte Typing V* (Oxford University Press, Oxford)).

[0085]SEMA4D é conhecida ter pelo menos dois receptores. Um dos receptores, Plexina-B1, é expresso em tecidos não linfoides e foi mostrado ser um receptor de alta afinidade (1 nM) para SEMA4D (Tamagnone *et al.*, *Cell* 99: 71 - 80 (1999)). A estimulação de SEMA4D de sinalização de Plexina-B1 foi mostrada induzir o colapso do cone de crescimento de neurônios, e induzir o colapso da extensão de processo e apoptose de oligodendrócitos (Giraudon *et al.*, *J. Immunol.* 172: 1246 - 1255 (2004); Giraudon *et al.*, *NeuroMolecular Med.* 7: 207 - 216 (2005)). Depois da ligação à SEMA4D, a sinalização de Plexina-B1 medeia a inativação de R-Ras, levando a uma diminuição na ligação mediada pela integrina à matriz extracelular, assim como a ativação de RhoA, levando a reorganização do citosequeleto e migração celular. Veja, Kruger *et al.*, *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 6: 789 - 800 (2005); Pasterkamp, *TRENDS em Cell Biology* 15: 61 - 64 (2005)).

[0086]Em tecidos linfoides, CD72 é utilizada como um receptor de SEMA4D (Kumanogoh *et al.*, *Immunity* 13: 621 - 631 (2000) de baixa afinidade (300 nM)). As células B e APCs expressam CD72, e anticorpos anti-CD72 têm muitos dos mesmos efeitos como sSEMA4D, tais como aumento das respostas de células B induzidas por CD40 e derramamento de células B de CD23. CD72 é considerada agir como um regulador negativo de respostas de células B recrutando a tirosina fosfatase SHP-1, que pode associar-se com muitos receptores inibitórios. A interação de SEMA4D com CD72 resulta na dissociação de SHP-1, e a perda deste sinal de ativação negativo. SEMA4D mostrou-se promover a estimulação de células T e agregação de células B e sobrevivência *in vitro*. A adição de células que expressam SEMA4D ou sSEMA4D aumenta a proliferação de células B induzida por CD40 e produção de imunoglobulina

in vitro, e acelera as respostas de anticorpo *in vivo* (Ishida *et al.*, *Inter. Immunol.* 15: 1027 - 1034 (2003); Kumanogoh e H. Kikutani, *Trends in Immunol.* 22: 670 - 676 (2001)). sSEMA4D aumenta a maturação induzida por CD40 de DCs, incluindo supra-regulação de moléculas co-estimuladoras e secreção aumentada de IL-12. Além disso, sSEMA4D pode inibir a migração de células imunitárias, que podem ser revertidas pela adição de anticorpos anti-SEMA4D bloqueadores (Elhabazi *et al.*, *J. Immunol.* 166: 4341 - 4347 (2001); Delaire *et al.*, *J. Immunol.* 166: 4348 - 4354 (2001)).

[0087]Sema4D é expressa em altos níveis em órgãos linfoides, incluindo o baço, timo e linfonodos, e em órgãos não-linfoides, tais como o cérebro, coração e rim. Em órgãos linfoides, a Sema4D é abundantemente expressada em células T restantes, mas apenas fracamente expressada em células B restantes e células apresentadoras de antígeno (APCs), tais como células dendríticas (DCs). A ativação celular aumenta a expressão da superfície de SEMA4D, assim como a geração de SEMA4D solúvel (sSEMA4D).

[0088]O padrão de expressão de SEMA4D sugere que desempenha um importante papel fisiológico, assim como papel patológico no sistema imunitário. SEMA4D mostrou-se promover a ativação, agregação e sobrevivência de células B; realçar a proliferação induzida por CD40 e produção de anticorpo; realçar a resposta de anticorpo a antígenos dependentes de células T; aumentar a proliferação de células T; realçar a maturação de células dendríticas e capacidade de estimular as células T; e está diretamente implicado em desmielinização e degeneração axonal (Shi *et al.*, *Immunity* 13: 633 - 642 (2000); Kumanogoh *et al.*, *J Immunol* 169: 1175 - 1181 (2002); e Watanabe *et al.*, *J Immunol* 167: 4321 - 4328 (2001)).

[0089]SEMA4D de camundongos nocaute (SEMA4D^{-/-}) forneceu evidência adicional de que a SEMA4D desempenha um papel importante em respostas imunes tanto humorais quanto celulares. Não há anormalidades principais conhecidas de tecidos não linfoides em SEMA4D^{-/-} de camundongos. As células dendríticas (DCs) da

SEMA4D^{-/-} de camundongos têm pouca capacidade aloestimulatória e mostram defeitos na expressão de moléculas co-estimuladoras, que podem ser resgatadas pela adição de sSEMA4D. Os camundongos deficientes em SEMA4D (SEMA4D^{-/-}) não conseguem desenvolver a encefalomielite autoimune experimental induzida por peptídeo de glicoproteína de oligodendrócito de mielina, porque as células T específicas de glicoproteína de oligodendrócito mielina são deficientemente geradas na ausência de SEMA4D (Kumanogoh *et al.*, *J Immunol* 169: 1175 - 1181 (2002)). Uma quantidade significativa de SEMA4D solúvel também é detectada no soro de camundongos MRL/lpr propensos a autoimunidade (modelo de doenças autoimunes sistêmicas, tais como SLE), mas não em camundongos normais. Além disso, os níveis de sSEMA4D correlacionam-se com níveis de auto-anticorpos e aumentam com a idade (Wang *et al.*, *Blood* 97: 3498 - 3504 (2001)). SEMA4D solúvel também mostrou-se acumular no fluido cerebrospinal e soro de pacientes com doença desmielinizante, e sSEMA4D induz apoptose de precursores neurais pluripotentes humanos (células Dev), e tanto inibe o extensão de processo quanto induz a apoptose de oligodendrócitos de rato *in vitro* (Giraudon *et al.*, *J Immunol* 172(2): 1246 - 1255 (2004)). Esta apoptose foi bloqueada por um Mab anti-SEMA4D.

IV. Anticorpos anti-SEMA4D

[0090]Os anticorpos que se ligam a SEMA4D foram descritos na técnica. Veja, por exemplo, Publ. US N^{os} 2008/0219971 A1, US 2010/0285036 A1, e US 2006/0233793 A1, Pedidos de Patente Internacionais WO 93/14125, WO 2008/100995, e WO 2010/129917, e Herold *et al.*, *Int. Immunol.* 7(1): 1 - 8 (1995), cada um dos quais é aqui incorporado em sua totalidade como referência.

[0091]O presente pedido, geralmente, refere-se a um método de diminuir a permeabilidade da barreira hematoencefálica em um sujeito, por exemplo, um paciente humano, tendo um transtorno neuro-inflamatório, por exemplo, um transtorno inflamatório ou transtorno neurodegenerativo do CNS, compreendendo a administração

de um anticorpo que se liga especificamente à SEMA4D, ou um fragmento de ligação ao antígeno, variante, ou seu derivado. Em certas formas de realização, o anticorpo bloqueia a interação de SEMA4D com um ou mais de seus receptores, por exemplo, Plexina-B1. Os anticorpos anti-SEMA4D tendo estas propriedades podem ser utilizados nos métodos aqui fornecidos. Os anticorpos que podem ser utilizados incluem, mas não são limitados a MAb VX15/2503, 67, e 76 e fragmentos de ligação ao antígeno, variantes, ou seus derivados, os quais são completamente descritos em US 2010/0285036 A1. anticorpos adicionais que podem ser utilizados nos métodos aqui fornecidos incluem os anticorpos BD16 e BB18 descritos em US 2006/0233793 A1, assim como os fragmentos de ligação ao antígeno, variantes, ou seus derivados; ou qualquer um de 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, e MAb 2285, assim como quaisquer fragmentos, variantes ou seus derivados, como descrito em US 2008/0219971 A1. Em certas formas de realização, um anticorpo anti-SEMA4D para o uso nos métodos aqui fornecidos se liga à SEMA4D humana, de murino, ou tanto humana quanto de murino. Também são úteis os anticorpos que se ligam ao mesmo epítipo como qualquer um dos anticorpos anteriormente mencionados e/ou anticorpos que inibem competitivamente qualquer um dos anticorpos anteriormente mencionados de se ligar a SEMA4D.

[0092]Em certas formas de realização, um anticorpo anti-SEMA4D ou fragmento de ligação ao antígeno, variante, ou seu derivado útil nos métodos aqui fornecidos tem uma sequência de aminoácido que tem pelo menos cerca de 80 %, cerca de 85 %, cerca de 88 %, cerca de 89 %, cerca de 90 %, cerca de 91 %, cerca de 92 %, cerca de 93 %, cerca de 94 %, ou cerca de 95 % de identidade de sequência à sequência de aminoácido para uma molécula de anticorpo anti-SEMA4D de referência, por exemplo, aquela descrita acima. Em um outra forma de realização, a molécula

de ligação participa pelo menos cerca de 96 %, cerca de 97 %, cerca de 98 %, cerca de 99 %, ou 100 % de identidade de sequência a um anticorpo de referência.

[0093]Em uma outra forma de realização, um anticorpo anti-SEMA4D ou fragmento de ligação ao antígeno, variante, ou seu derivado útil nos métodos aqui fornecidos compreende, consiste essencialmente de, ou consiste de um domínio variável de cadeia pesada de imunoglobulina (domínio VH), onde pelo menos uma das CDRs do domínio VH tem uma sequência de aminoácido que é pelo menos cerca de 80 %, cerca de 85 %, cerca de 90 %, cerca de 95 %, cerca de 96 %, cerca de 97 %, cerca de 98 %, cerca de 99 %, ou idêntica a CDR1, CDR2 ou CDR3 de SEQ ID NO: 9 ou 10.

[0094]Em uma outra forma de realização, um anticorpo anti-SEMA4D ou fragmento de ligação ao antígeno, variante, ou seu derivado útil nos métodos aqui fornecidos compreende, consiste essencialmente de, ou consiste de um domínio variável de cadeia pesada de imunoglobulina (domínio VH), onde pelo menos uma das CDRs do domínio VH tem uma sequência de aminoácido que é pelo menos cerca de 80 %, cerca de 85 %, cerca de 90 %, cerca de 95 %, cerca de 96 %, cerca de 97 %, cerca de 98 %, cerca de 99 %, ou idêntica à SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, ou SEQ ID NO: 8.

[0095]Em uma outra forma de realização, um anticorpo anti-SEMA4D ou fragmento de ligação ao antígeno, variante, ou seu derivado útil nos métodos aqui fornecidos compreende, consiste essencialmente de, ou consiste de um domínio variável de cadeia pesada de imunoglobulina (domínio VH), onde pelo menos uma das CDRs do domínio VH tem uma sequência de aminoácido idêntica, exceto para 1, 2, 3, 4, ou 5 substituições de aminoácidos conservativas, a SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, ou SEQ ID NO: 8.

[0096]Em uma outra forma de realização, um anticorpo anti-SEMA4D ou fragmento de ligação ao antígeno, variante, ou seu derivado útil nos métodos aqui

fornecidos compreende, consiste essencialmente de, ou consiste de um domínio VH que tem uma sequência de aminoácido que é pelo menos cerca de 80 %, cerca de 85 %, cerca de 90 %, cerca de 91 %, cerca de 92 %, cerca de 93 %, cerca de 94 %, cerca de 95 %, cerca de 96 %, cerca de 97 %, cerca de 98 %, cerca de 99 %, ou 100 % idêntica à SEQ ID NO: 9 ou SEQ ID NO: 10, em que o anticorpo anti-SEMA4D compreendendo o domínio VH codificado especificamente, preferencialmente, ou competitivamente se liga a SEMA4D.

[0097]Em uma outra forma de realização, um anticorpo anti-SEMA4D ou fragmento de ligação ao antígeno, variante, ou seu derivado útil nos métodos aqui fornecidos compreende, consiste essencialmente de, ou consiste de uma cadeia leve de imunoglobulina domínio variável (domínio VL), onde pelo menos uma das CDRs do domínio VL tem uma sequência de aminoácido que é pelo menos cerca de 80 %, cerca de 85 %, cerca de 90 %, cerca de 95 %, cerca de 96 %, cerca de 97 %, cerca de 98 %, cerca de 99 %, ou idêntica a CDR1, CDR2 ou CDR3 de SEQ ID NO: 17 ou 18.

[0098]Em uma outra forma de realização, um anticorpo anti-SEMA4D ou fragmento de ligação ao antígeno, variante, ou seu derivado útil nos métodos aqui fornecidos compreende, consiste essencialmente de, ou consiste de uma cadeia leve de imunoglobulina domínio variável (domínio VL), onde pelo menos uma das CDRs do domínio VL tem uma sequência de aminoácido que é pelo menos cerca de 80 %, cerca de 85 %, cerca de 90 %, cerca de 95 %, cerca de 96 %, cerca de 97 %, cerca de 98 %, cerca de 99 %, ou idêntica à SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, ou SEQ ID NO: 16.

[0099]Em uma outra forma de realização, um anticorpo anti-SEMA4D ou fragmento de ligação ao antígeno, variante, ou seu derivado útil nos métodos aqui fornecidos compreende, consiste essencialmente de, ou consiste de uma cadeia leve de imunoglobulina domínio variável (domínio VL), onde pelo menos uma das CDRs do domínio VL tem uma sequência de aminoácido idêntica, exceto para 1, 2, 3, 4, ou 5 substituições de aminoácidos conservativas, a SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, ou

SEQ ID NO: 16.

[00100]Em uma outra forma de realização, um anticorpo anti-SEMA4D ou fragmento de ligação ao antígeno, variante, ou seu derivado útil nos métodos aqui fornecidos compreende, consiste essencialmente de, ou consiste de um domínio VL que tem uma sequência de aminoácido que é pelo menos cerca de 80 %, cerca de 85 %, cerca de 90 %, cerca de 91 %, cerca de 92 %, cerca de 93 %, cerca de 94 %, cerca de 95 %, cerca de 96 %, cerca de 97 %, cerca de 98 %, cerca de 99 %, ou 100 % idêntica à SEQ ID NO: 17 ou SEQ ID NO: 18, em que o anticorpo anti-SEMA4D compreendendo o domínio VL codificado especificamente, preferencialmente, ou competitivamente se liga a SEMA4D.

[00101]Em uma outra forma de realização, um anticorpo anti-SEMA4D ou fragmento de ligação ao antígeno, variante, ou seu derivado útil nos métodos aqui fornecidos compreende, consiste essencialmente de, ou consiste de um domínio variável de cadeia pesada de imunoglobulina (domínio VH) e uma cadeia leve de imunoglobulina domínio variável (domínio VL), onde pelo menos uma das CDRs do domínio VH tem uma sequência de aminoácido que é pelo menos cerca de 80 %, cerca de 85 %, cerca de 90 %, cerca de 95 %, cerca de 96 %, cerca de 97 %, cerca de 98 %, cerca de 99 %, ou idêntica a CDR1, CDR2 ou CDR3 de SEQ ID NO: 9 ou 10 e pelo menos uma das CDRs do domínio VL tem uma sequência de aminoácido que é pelo menos cerca de 80 %, cerca de 85 %, cerca de 90 %, cerca de 95 %, cerca de 96 %, cerca de 97 %, cerca de 98 %, cerca de 99 %, ou idêntica a CDR1, CDR2 ou CDR3 de SEQ ID NO: 17 ou 18.

[00102]Em uma outra forma de realização, um anticorpo anti-SEMA4D ou fragmento de ligação ao antígeno, variante, ou seu derivado útil nos métodos aqui fornecidos compreende, consiste essencialmente de, ou consiste de um domínio variável de cadeia pesada de imunoglobulina (domínio VH) e uma cadeia leve de imunoglobulina domínio variável (domínio VL), onde pelo menos uma das CDRs do domínio VH

tem uma sequência de aminoácido idêntica, exceto para 1, 2, 3, 4, ou 5 substituições de aminoácidos conservativas, a SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, ou SEQ ID NO: 8 e onde pelo menos uma das CDRs do domínio VL tem uma sequência de aminoácido idêntica, exceto para 1, 2, 3, 4, ou 5 substituições de aminoácidos conservativas, a SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, ou SEQ ID NO: 16.

[00103]Em uma outra forma de realização, um anticorpo anti-SEMA4D ou fragmento de ligação ao antígeno, variante, ou seu derivado útil nos métodos aqui fornecidos compreende, consiste essencialmente de, ou consiste de um domínio VH que tem uma sequência de aminoácido que é pelo menos cerca de 80 %, cerca de 85 %, cerca de 90 %, cerca de 91 %, cerca de 92 %, cerca de 93 %, cerca de 94 %, cerca de 95 %, cerca de 96 %, cerca de 97 %, cerca de 98 %, cerca de 99 %, ou 100 % idêntica à SEQ ID NO: 9 ou SEQ ID NO: 10, e um domínio VL que tem uma sequência de aminoácido que é pelo menos cerca de 80 %, cerca de 85 %, cerca de 90 %, cerca de 91 %, cerca de 92 %, cerca de 93 %, cerca de 94 %, cerca de 95 %, cerca de 96 %, cerca de 97 %, cerca de 98 %, cerca de 99 %, ou 100 % idêntica à SEQ ID NO: 17 ou SEQ ID NO: 18, em que o anticorpo anti-SEMA4D compreendendo os domínios VH e VL codificados especificamente, preferencialmente, ou competitivamente se liga a SEMA4D.

[00104]Em uma outra forma de realização, um anticorpo anti-SEMA4D ou fragmento de ligação ao antígeno, variante, ou derivado deste útil nos métodos fornecidos aqui compreende, consiste essencialmente em, ou consiste nas três CDRs do domínio VL e três CDRs do domínio VH de MAb VX15/2503, 67, ou 76, que são completamente descritas em US 2010/0285036 A1. Em algumas formas de realização, o anticorpo anti-SEMA4D útil nos métodos fornecidos aqui compreende MAb VX15/2503 ou 67.

[00105]Também incluídos para o uso nos métodos fornecidos aqui são polipeptídeos que codificam anticorpos anti-SEMA4D, ou fragmentos de ligação ao

antígeno, variantes, ou derivados deste como aqui descrito, polinucleotídeos que codificam tais polipeptídeos, vetores compreendendo tais polinucleotídeos, e células hospedeiras compreendendo tais vetores ou polinucleotídeos, todos para produzir anticorpos anti-SEMA4D, ou fragmentos de ligação ao antígeno, variantes, ou derivados destes para o uso nos métodos aqui descritos.

[00106]Variantes biologicamente ativas adequadas dos anticorpos anti-SEMA4D da invenção podem ser utilizadas nos métodos da presente invenção. Tais variantes manterão as propriedades de ligação desejadas do anticorpo anti-SEMA4D precursor. Métodos para fabricar variantes de anticorpo estão geralmente disponíveis na técnica.

[00107]Métodos para mutagênese e alterações de sequências de nucleotídeo são bem conhecidos na técnica. Veja, por exemplo, Walker e Gaastra, eds. (1983) *Techniques in Molecular Biology* (MacMillan Publishing Company, Nova Iorque); 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.); Pat. U.S. Nº 4.873.192; e as referências citadas nesta; aqui incorporados como referência. A orientação como para substituições de aminoácidos apropriadas que não afetem a atividade biológica do polipeptídeo de interesse pode ser encontrada no modelo de Dayhoff *et al.* (1978) em *Atlas of Protein Sequence and Structure* (Natl. Biomed. Res. Found., Washington, D.C.), páginas 345 a 352, aqui incorporado como referência em sua totalidade. O modelo de Dayhoff *et al.* usa a matriz de similaridade a aminoácido *Point Accepted Mutation* (PAM) (matriz PAM 250) para determinar adequado substituições de aminoácidos conservativas. Substituições conservativas, tais como trocando um aminoácido com outro tendo propriedades similares, podem ser preferidas. Exemplos de substituições de aminoácidos conservativas como mostrado pela matriz PAM 250 do modelo de Dayhoff *et al.* incluem, mas não são limitados a, Gly↔Ala, Val↔Ile↔Leu, Asp↔Glu, Lys↔Arg, Asn↔Gln, e

Phe↔Trp↔Tyr.

[00108]Na construção de variantes da molécula de ligação anti-SEMA4D, por exemplo, um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, polipeptídeos de interesse, modificações são feitas tal que variantes continuam a possuir as propriedades desejadas, por exemplo, sendo capazes de especificamente ligar-se a uma SEMA4D, por exemplo, SEMA4D humana, de murino, ou tanto humana quanto de murino, por exemplo, expressada na superfície de ou secretada por uma célula e tendo atividade de bloqueio de SEMA4D, como aqui descrito. Obviamente, quaisquer mutações feitas no DNA que codifica o polipeptídeo variante não devem colocar a sequência fora da estrutura de leitura e preferivelmente não criarão regiões complementares que podem produzir estrutura de mRNA secundárias. Veja a Publicação do Pedido de Patente EP Nº 75.444.

[00109]Métodos para medir a molécula de ligação anti-SEMA4D, por exemplo, um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno, variante, ou derivado deste, especificidade de ligação incluem, mas não são limitados a, ensaios de ligação competitivos padrão, ensaios para monitorar a secreção de imunoglobulina por células T ou células B, ensaios de proliferação de célula T, ensaios de apoptose, ensaios ELISA, e semelhantes. Veja, por exemplo, tais ensaios divulgados em WO 93/14125; Shi *et al.*, *Immunity* 13: 633 - 642 (2000); Kumanogoh *et al.*, *J Immunol* 169: 1175 - 1181 (2002); Watanabe *et al.*, *J Immunol* 167: 4321 - 4328 (2001); Wang *et al.*, *Blood* 97:3498-3504 (2001); e Giraudon *et al.*, *J Immunol* 172(2): 1246 - 1255 (2004), todos os quais são aqui incorporados como referência.

[00110]Quando debatido aqui se qualquer polipeptídeo particular, incluindo as regiões constantes, CDRs, domínios VH, ou domínios VL aqui divulgados, é pelo menos cerca de 65 %, cerca de 70 %, cerca de 75 %, cerca de 80 %, cerca de 85 %, cerca de 90 %, cerca de 91 %, cerca de 92 %, cerca de 93 %, cerca de 94 %, cerca de 95 %, cerca de 96 %, cerca de 97 %, cerca de 98 %, cerca de 99 %, ou ainda cerca

de 100 % idêntico a um outro polipeptídeo, a % de identidade pode ser determinada usando métodos e programas de computador/software conhecidos na técnica tais como, mas não limitados a, o programa BESTFIT (Wisconsin Sequence Analysis Package, Versão 8 for Unix, Genetics Computer Group, University Research Park, 575 Science Drive, Madison, Wis. 53711). BESTFIT usa o algoritmo de homologia local de Smith e Waterman (1981) Adv. Appl. Math. 2: 482 - 489, para encontrar o melhor segmento de homologia entre duas sequências. Quando do uso de BESTFIT ou qualquer outro programa de alinhamento de sequência para determinar se uma sequência particular é, por exemplo, 95 % idêntica a uma sequência de referência de acordo com a presente invenção, os parâmetros são estabelecidos, certamente, tal que a porcentagem de identidade é calculada sobre o tamanho natural da sequência de polipeptídeo de referência e que intervalos em homologia de até 5 % do número total de aminoácidos na sequência de referência são permitidos.

[00111]Para os propósitos da presente invenção, a porcentagem de identidade de sequência pode ser determinada usando o algoritmo de pesquisa de homologia Smith-Waterman usando uma pesquisa de intervalo afim com uma penalidade de abertura para lacunas de 12 e uma penalidade de extensão para lacunas de 2, matriz BLOSUM de 62. O algoritmo de pesquisa de homologia de Smith-Waterman é mostrado em Smith and Waterman (1981) Adv. Appl. Math. 2:482-489. Uma variante pode, por exemplo, diferir de um anticorpo anti-SEMA4D de referência (por exemplo, MAb VX15/2503, 67 ou 76) por apenas 1 a 15 resíduos de aminoácidos, apenas 1 a 10 resíduos de aminoácidos, tal como 6 a 10, apenas 5, apenas 4, 3, 2, ou ainda 1 resíduo de aminoácido.

[00112]A região constante de um anticorpo anti-SEMA4D pode ser mutada para alterar a função efetora em vários modos. Para exemplo, veja Pat. U.S. Nº 6.737.056B1 e Publicação do Pedido de Patente U.S. Nº 2004/0132101A1, que divulgam mutações de Fc que otimizam a ligação do anticorpo aos receptores de Fc.

[00113]Em certos anticorpos anti-SEMA4D ou fragmentos, variantes ou derivados destes úteis nos métodos fornecidos aqui, a porção Fc pode ser mutada para diminuir a função efetora usando técnicas conhecidas no ramo. Por exemplo, a supressão ou inativação (através de mutações de ponto ou outros meios) de um domínio de região constante pode reduzir a ligação do receptor de Fc do anticorpo modificado circulante aumentando desse modo a localização do tumor. Em outros casos, modificações da região constante compatíveis com a presente invenção moderam a ligação do complemento e assim reduzem a meia-vida do soro. Ainda outras modificações da região constante podem ser utilizadas para modificar ligações de dissulfeto ou porções de oligossacarídeo que levam em consideração a localização realçada devido à especificidade de antígeno ou flexibilidade do anticorpo aumentadas. O perfil fisiológico resultante, biodisponibilidade e outros efeitos bioquímico das modificações, tais como localização do tumor, biodistribuição e meia-vida do soro, podem facilmente ser medidos e quantificados usando técnicas imunológicas bem conhecidas sem experimentação indevida. Anticorpos anti-SEMA4D para o uso nos métodos fornecidos aqui incluem derivados que são modificados, por exemplo, pela ligação covalente de qualquer tipo de molécula ao anticorpo tal que a ligação covalente não impede o anticorpo de se ligar especificamente ao seu epítopo cognato. Por exemplo, mas não por via de limitação, os derivados de anticorpo incluem anticorpos que foram modificados, por exemplo, por glicosilação, acetilação, peguilação, fosforilação, amidação, derivação por grupos de proteção/bloqueio conhecidos, clivagem proteolítica, ligação a um ligante celular ou outra proteína, etc. Qualquer uma das numerosas modificações químicas pode ser realizada por técnicas conhecidas, incluindo, mas não limitadas a clivagem química específica, acetilação, formilação, etc. Adicionalmente, o derivado pode conter um ou mais aminoácidos não clássicos.

[00114]Uma “substituição de aminoácido conservativa” é uma em que o resíduo de aminoácido é substituído com um resíduo de aminoácido tendo uma cadeia

lateral com uma carga similar. Famílias de resíduos de aminoácidos tendo cadeias laterais com cargas similares foram definidas na técnica. Estas famílias incluem aminoácidos com cadeias laterais básicas (por exemplo, lisina, arginina, histidina), cadeias laterais ácidas (por exemplo, ácido aspártico, ácido glutâmico), cadeias laterais polares não carregadas (por exemplo, glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína), cadeias laterais não polares (por exemplo, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptofano), cadeias laterais beta-ramificadas (por exemplo, treonina, valina, isoleucina) e cadeias laterais aromáticas (por exemplo, tirosina, fenilalanina, triptofano, histidina). Alternativamente, mutações podem ser introduzidas aleatoriamente ao longo de toda ou parte da sequência codificadora, tal como por mutagênese de saturação, e os mutantes resultantes podem ser triados quanto à atividade biológica para identificar mutantes que mantêm a atividade (por exemplo, a capacidade de ligar um polipeptídeo de anti-SEMA4D, de bloquear a interação de SEMA4D com seu receptor, ou de diminuir a permeabilidade de BBB em um sujeito, por exemplo, um paciente com um transtorno neuroinflamatório).

[00115]Por exemplo, é possível introduzir mutações apenas em regiões de estrutura ou apenas em regiões CDR de uma molécula de anticorpo. Mutações introduzidas podem ser mutações com troca de sentido silenciosas ou neutras, isto é, não têm nenhum, ou têm pouco, efeito sobre a capacidade de um anticorpo de ligar-se ao antígeno. Estes tipos de mutações podem ser úteis para otimizar o uso do códon, ou melhorar a produção de anticorpo de um hibridoma. Alternativamente, mutações com troca de sentido não neutras podem alterar a capacidade de um anticorpo de ligar-se ao antígeno. Uma pessoa de habilidade na técnica seria capaz de projetar e testar moléculas mutantes com propriedades desejadas tais como nenhuma alteração na atividade de ligação ao antígeno ou alteração na atividade de ligação (por exemplo, melhoras na atividade de ligação ao antígeno ou mudança na especificidade do anticorpo). A seguir da mutagênese, a proteína codificada pode ser rotineiramente

expressadas e a atividade funcional e/ou biológica da proteína codificada, (por exemplo, capacidade de ligar imunoespecificamente pelo menos um epítipo de um polipeptídeo de SEMA4D) pode ser determinada usando técnicas aqui descritas ou por técnicas rotineiramente modificadoras conhecidas no ramo.

[00116]Em certas formas de realização, os anticorpos anti-SEMA4D para o uso nos métodos fornecidos aqui compreendem pelo menos uma região determinante de complementaridade (CDR) otimizada. Por “CDR otimizada” é intencionado que a CDR fosse modificada e otimizada para melhorar a afinidade de ligação e/ou atividade anti-SEMA4D que é comunicada a um anticorpo anti-SEMA4D compreendendo a CDR otimizada. “Atividade anti-SEMA4D” ou “atividade de bloqueio de SEMA4D” pode incluir a atividade que modula uma ou mais das atividades seguintes associadas com SEMA4D: ativação, agregação e sobrevivência de célula B; proliferação e produção de anticorpo induzidas por CD40; resposta do anticorpo a antígenos dependentes de célula T; proliferação de célula T ou outra célula imune; maturação de célula dendrítica; desmielinização e degeneração axonal; apoptose de precursores neurais pluripotentes e/ou oligodendrócitos; indução de migração de célula endotelial; inibição de migração de monócito espontânea; ligação a Plexina-B1 da superfície celular ou outro receptor, ou qualquer outra atividade associada com SEMA4D solúvel ou SEMA4D que é expressada na superfície de células SEMA4D+. A atividade anti-SEMA4D também pode ser atribuída a uma diminuição na incidência ou severidade de doenças associadas com a expressão ou superexpressão de SEMA4D, incluindo, mas não necessariamente limitadas a, doenças neuroinflamatórias incluindo doenças inflamatórias do sistema nervoso central (CNS) e sistema nervoso periférico (PNS).

[00117]Exemplos de anticorpos otimizados com base em MAbs anti-SEMA4D de murino BD16 e BB18, foram descritos na Publ. US Nº 2008/0219971 A1, Pedido de Patente Internacional WO 93/14125 e Herold *et al.*, *Int. Immunol.* 7(1): 1 - 8 (1995), cada um dos quais são aqui incorporados como referência em sua totalidade. As

modificações podem envolver a substituição de resíduos de aminoácidos dentro da CDR tal que um anticorpo anti-SEMA4D mantém especificidade para o antígeno de SEMA4D e tem afinidade de ligação melhorada e/ou atividade anti-SEMA4D melhorada.

V. Métodos de Tratamento Usando Anticorpos Anti-SEMA4D e Anti-Plexina B1 Terapêuticos

[00118]Métodos da invenção são dirigidos ao uso de um inibidor de interação de SEMA4D com um receptor de SEMA4D, por exemplo, moléculas de ligação anti-SEMA4D, moléculas de ligação anti-Plexina B1, ou combinação destas, por exemplo, anticorpos, incluindo fragmentos de ligação ao antígeno, variantes, e derivados destes, para diminuir a permeabilidade da barreira hematoencefálica em um sujeito tendo um transtorno neuroinflamatório. Em certas formas de realização, o transtorno neuroinflamatório é, por exemplo, Esclerose múltipla, Esclerose lateral amiotrófica, epilepsia, Doença de Alzheimer, Doença de Parkinson, meningite, edema cerebral, trauma cerebral, ou acidente vascular cerebral. Em certas formas de realização, as células endoteliais expressam um receptor de SEMA4D; e em certas formas de realização, o receptor é Plexina-B1. Embora o debate seguinte refira-se à administração de um anticorpo anti-SEMA4D, um anticorpo anti-Plexina B1, e combinação destes, os métodos aqui descritos também são aplicáveis aos fragmentos de ligação ao antígeno, variantes, e derivados destes anticorpos anti-SEMA4D ou anti-Plexina B1 que mantêm as propriedades desejadas dos anticorpos anti-SEMA4D ou anti-Plexina B1 da invenção, por exemplo, capazes de ligar especificamente SEMA4D, por exemplo, SEMA4D humana, de camundongo, ou humana e de camundongo, tendo atividade neutralizante de SEMA4D, e/ou bloqueando a interação de SEMA-4D com seu receptor, por exemplo, Plexina-B1.

[00119]Em uma forma de realização, tratamento inclui a aplicação ou administração de uma molécula de ligação anti-SEMA4D, uma molécula de ligação anti-

Plexina B1, ou combinação destas, por exemplo, um anticorpo ou fragmento de ligação com o antígeno da mesma como aqui descrito a um paciente, onde o paciente tem, ou tem o risco de desenvolver um transtorno neuroinflamatório. Em uma outra forma de realização, tratamento também é intencionado a incluir a aplicação ou administração de uma composição farmacêutica compreendendo a molécula de ligação anti-SEMA4D, a molécula de ligação anti-Plexina B1, ou combinação destas, por exemplo, um anticorpo ou fragmento de ligação com o antígeno da mesma a um paciente, onde o paciente tem, ou tem o risco de desenvolver um transtorno neuroinflamatório. Deve ser avaliado que devido à interação de SEMA4D com um receptor em células endoteliais, espera-se que a aplicação ou administração de uma molécula de ligação anti-SEMA4D, uma molécula de ligação anti-Plexina B1, ou combinação destas ocorram no lado sanguíneo da barreira hematoencefálica. Administrando-se uma molécula de ligação anti-SEMA4D, uma molécula de ligação anti-Plexina B1, ou combinações destas por uma via que à expõe ao lado sanguíneo, por exemplo, incluindo, mas não limitada a, administração intravenosa, a molécula de ligação anti-SEMA4D, as moléculas de ligação anti-Plexina B1, ou combinações destas será permitidas inibir a interação de SEMA4D com o receptor de SEMA4D que é expressado pelas células endoteliais.

[00120]As moléculas de ligação anti-SEMA4D, moléculas de ligação anti-Plexina B1, ou combinação destas, por exemplo, anticorpos ou fragmentos de ligação destes como aqui descrito são úteis para o tratamento de vários transtornos neuroinflamatórios. Em algumas formas de realização, o tratamento de um transtorno neuroinflamatório é intencionado a incluir uma redução, ou diminuição, na permeabilidade da BBB. Em outras formas de realização, o tratamento de um transtorno neuroinflamatório é intencionado a incluir um aumento na resistividade da BBB. Em outras formas de realização, o tratamento de um transtorno neuroinflamatório é intencionado a incluir um aumento no número, densidade e/ou concentração de células endoteliais

presentes na BBB. Em outras formas de realização, o tratamento de um transtorno neuroinflamatório é intencionado a incluir uma mudança na morfologia ou função ou células endoteliais, ou nas interações entre células endoteliais ou astrócitos ou entre células endoteliais e astrócitos que formam a BBB.

[00121]Em uma forma de realização, a invenção refere-se ao uso de moléculas de ligação anti-SEMA4D, moléculas de ligação anti-Plexina B1, ou combinação destas, por exemplo, anticorpos ou fragmentos de ligação ao antígeno, variantes, ou derivados destes, como um medicamento, em particular para o uso no tratamento ou profilaxia de transtornos neuroinflamatórios para inibir, reduzir, prevenir, ou minimizar uma ruptura na BBB, ou um aumento na permeabilidade da BBB.

[00122]De acordo com os métodos da presente invenção, pelo menos uma molécula de ligação anti-SEMA4D ou molécula de ligação anti-Plexina B1, por exemplo, um anticorpo ou fragmento de ligação com o antígeno, variante, ou derivado destes, como definido em qualquer lugar aqui pode ser utilizada para promover uma resposta terapêutica positiva com respeito ao transtorno neuroinflamatório. Uma “resposta terapêutica positiva” com respeito ao transtorno neuroinflamatório é intencionada a incluir uma melhora na doença em associação com a atividade anti-inflamatória, atividade anti-apoptótica, ou semelhantes, destes anticorpos, e/ou uma melhora nos sintomas associados com a doença. Isto é, um efeito antiproliferativo, a prevenção de proliferação adicional da célula que expressa SEMA4D, uma redução na resposta inflamatória, incluindo, mas não limitada à secreção reduzida de citocinas inflamatórias, moléculas de adesão, proteases, imunoglobulinas (em exemplos onde a célula portadora de SEMA4D é uma célula B), combinações destas, e semelhantes, produção aumentada de proteínas anti-inflamatórias, uma redução no número de células autorreativas, um aumento na tolerância imune, inibição de sobrevivência de célula autorreativa, redução na apoptose, redução na migração de célula endotelial, aumento na migração de monócito espontânea, redução em e/ou uma diminuição em um ou

mais sintomas mediados pelo estímulo de sSEMA4D ou células que expressam SEMA4D podem ser observados. Tais respostas terapêuticas positivas não são limitadas à via de administração e podem compreender a administração ao doador, ao tecido do doador (tal como por exemplo perfusão de órgão), ao hospedeiro, qualquer combinação destes, e semelhantes. Em particular, os métodos fornecidos aqui são dirigidos para inibir, prevenir, reduzir, aliviar, ou diminuir o desenvolvimento de um transtorno neuroinflamatório em um paciente. Assim, por exemplo, uma melhora na doença pode ser caracterizada como uma ausência de sintomas clinicamente observáveis, uma diminuição na permeabilidade de BBB, um aumento no número, densidade ou concentração de células endoteliais presentes na BBB, uma mudança na morfologia ou função das células endoteliais, ou uma mudança nas interações entre as células endoteliais e pericitos ou astrócitos ou entre células endoteliais, pericitos e astrócitos que formam a BBB.

[00123]Alterações na permeabilidade da BBB podem ser medidas usando modelos *in vitro*. Em certas formas de realização, um modelo de DIV-BBB *in vitro* dinâmico pode ser utilizado. Cucullo *et al.* apresentaram um modelo de DIV-BBB composto de células endoteliais microvasculares cerebrais humanas adultas normais e astrócitos adultos humanos para estudar como alterações hemodinâmicas e inflamação sistêmica afetam a integridade da microvasculatura do cérebro. Especificamente, este modelo usa um cartucho, ou tubo oco, para representar a barreira hematoencefálica com o interior do cartucho representando o lado sanguíneo da barreira hematoencefálica e o exterior do cartucho representando o lado cerebral da barreira hematoencefálica. O interior do cartucho é revestido com células endoteliais microvasculares cerebrais humanas adultas e o exterior é revestido com astrócitos adultos humanos. Como um agente modificador de barreira hematoencefálica, tal como SEMA4D, é introduzida no lúmen do cartucho, a corrente elétrica entre o interior e exterior do tubo é monitorada usando a Medição de Resistência Elétrica Transendotelial, descrita

abaixo. Uma forma de realização deste modelo tem a inovação de ter microfuros transcapilares para permitir o tráfego da célula transendotelial entre o compartimento vascular e o parenquimatoso. Uma descrição detalhada do modelo de DIV-BBB *in vitro* e a derivação e cultura das células endoteliais microvasculares humanas e astrócitos adultos utilizados pode ser encontrada em, por exemplo, Cucullo *et al.*, *Brain Research*. 951 243 - 254 (2002); e Cucullo *et al.*, *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*. 2: 767 - 77 (2011). Deve ser avaliado que pessoas habilitadas na técnica reconhecerão que outros modelos de BBB foram descritos e utilmente utilizados para estudos do papel de BBB na doença na técnica anterior e que a presente divulgação não deve ser limitada a qualquer um modelo particular.

[00124]A permeabilidade da BBB pode ser monitorada usando Medição de Resistência Elétrica Transendotelial (TEER). TEER é utilizada para monitorar a integridade da BBB em tempo real, o que foi mostrado correlacionar com a permeabilidade da BBB. O sistema de TEER usa multiplexação eletrônica para medir cartuchos múltiplos em sucessão rápida e avalia a integridade e viabilidade de bicamadas de cultura de tecido rapidamente e com segurança (Cucullo *et al.*, 2002; Cucullo *et al.*, 2010; Santaguida *et al.*, 2006). Em operação, o sistema aplica uma voltagem de excitação (0,06 V) através dos eletrodos de excitação inseridos em cada cartucho nos compartimentos luminais e extraluminais. Um microcontrolador computa a resistividade e capacitância (por cm^2) da barreira a partir de parâmetros físicos. Os valores da capacitância são calculados por comparação da voltagem e formas de onda da corrente. O atraso de pico-a-pico das duas formas de onda é proporcional ao valor da capacitância, que é expresso como tensão do arco. A TEER pode ser medida da configuração inicial por todo o curso de cada experimento.

[00125]As moléculas de ligação anti-SEMA4D, moléculas de ligação anti-Plexina B1, ou combinação destas, por exemplo, anticorpos ou fragmento de ligação com os antígenos, variantes, ou derivados destes podem ser utilizadas em combinação

com pelo menos um ou mais outros tratamentos para transtornos neuroinflamatórios; onde a terapia adicional é administrada antes, durante, ou subsequente à molécula de ligação anti-SEMA4D, moléculas de ligação anti-Plexina B1, ou combinação destas, por exemplo, anticorpo ou fragmento de ligação com o antígeno, variante, ou derivado destes, terapia. Assim, onde as terapias combinadas compreendem a administração de uma molécula de ligação anti-SEMA4D, moléculas de ligação anti-Plexina B1, ou combinação destas, por exemplo, um anticorpo ou fragmento de ligação com o antígeno, variante, ou derivado destes, em combinação com a administração de um outro agente terapêutico, os métodos da invenção abrangem a coadministração, usando formulações separadas ou uma única formulação farmacêutica, com administração simultâneo ou consecutiva em qualquer ordem.

VI. Composições Farmacêuticas e Métodos de Administração

[00126]Métodos de preparar e administrar moléculas de ligação anti-SEMA4D, moléculas de ligação anti-Plexina B1, ou combinação destas, por exemplo, anticorpos, ou fragmentos de ligação ao antígeno, variantes, ou derivados destes a um sujeito em necessidade destes são bem conhecidos a ou são facilmente determinados por aqueles habilitados na técnica. A via de administração da molécula de ligação anti-SEMA4D, da molécula de ligação anti-Plexina B1, ou combinação destas, por exemplo, anticorpo, ou fragmento de ligação ao antígeno, variante, ou derivado destes, pode ser, por exemplo, oral, parenteral, por inalação ou tópica. O termo parenteral como aqui utilizado inclui, por exemplo, administração intravenosa, intraarterial, intraperitoneal, intramuscular, subcutânea, retal, ou vaginal. Embora todas estas formas de administração sejam claramente consideradas como estando dentro do escopo da invenção, um exemplo de uma forma para administração seria uma solução para injeção, em particular para injeção intravenosa ou intraarterial ou gotejamento. Uma composição farmacêutica adequada para injeção pode compreender um tampão (por exemplo, tampão de acetato, fosfato ou citrato), um tensoativo (por exemplo,

polisorbato), opcionalmente um agente estabilizador (por exemplo, albumina humana), etc. Entretanto, em outros métodos compatíveis com os ensinamentos aqui, moléculas de ligação anti-SEMA4D, moléculas de ligação anti-Plexina B1, ou combinação destas, por exemplo, anticorpos, ou fragmentos de ligação ao antígeno, variantes, ou derivados destes podem ser liberadas diretamente ao sítio da população celular adversa aumentando desse modo a exposição do tecido doente ao agente terapêutico.

[00127]Como debatido aqui, moléculas de ligação anti-SEMA4D, moléculas de ligação anti-Plexina B1, ou combinação destas, por exemplo, anticorpos, ou fragmentos de ligação ao antígeno, variantes, ou derivados destes podem ser administradas em uma quantidade farmacologicamente eficaz para o tratamento *in vivo* de transtornos neuroinflamatórios. Sob esse aspecto, será avaliado que as moléculas de ligação divulgadas podem ser formuladas de modo a facilitar a administração e promover a estabilidade do agente ativo. Em certas formas de realização, composições farmacêuticas de acordo com a presente invenção compreendem um carregador estéril, não tóxico, farmacologicamente aceitável tal como solução salina fisiológica, tampões não tóxicos, conservantes e semelhantes. Para os propósitos do presente pedido, uma quantidade farmacologicamente eficaz de uma molécula de ligação anti-SEMA4D, uma molécula de ligação anti-Plexina B1, ou combinação destas, por exemplo, um anticorpo, ou fragmento de ligação ao antígeno, variante, ou derivado destes, deve ser mantida para significar uma quantidade suficiente para obter ligação eficaz a um alvo e para obter um benefício, por exemplo, para diminuir a permeabilidade da BBB em um paciente com um transtorno neuroinflamatório.

[00128]As composições farmacêuticas utilizadas nesta invenção compreendem carregadores farmacologicamente aceitáveis, incluindo, por exemplo, trocadores de íon, alumina, estearato de alumínio, lecitina, proteínas séricas, tais como albumina sérica humana, substâncias tampão tais como fosfatos, glicina, ácido sórbico, sorbato

de potássio, misturas de glicerídeo parciais de ácidos graxos vegetais saturados, água, sais ou eletrólitos, tais como sulfato de protamina, hidrogenofosfato de dissódio, hidrogenofosfato de potássio, cloreto de sódio, sais de zinco, sílica coloidal, trissilicato de magnésio, polivinilpirrolidona, substâncias com base em celulose, polietilenoglicol, carboximetilcelulose sódica, poliacrilatos, ceras, polímeros de bloco de polietileno-polioxipropileno, polietilenoglicol, e lanolina.

[00129]Preparações para administração parenteral incluem soluções aquosas ou não aquosas estéreis, suspensões, e emulsões. Exemplos de solventes não aquosos são propileno glicol, polietilenoglicol, óleos vegetais tais como óleo de oliva, e ésteres orgânicos injetáveis tais como oleato de etila. Carregadores aquosos incluem, por exemplo, água, soluções alcoólicas/aquosas, emulsões ou suspensões, incluindo solução salina e meio tamponado. Na invenção objeto, carregadores farmacêuticamente aceitáveis incluem, mas não são limitados a, tampão de fosfato a 0,01 a 0,1 M e preferivelmente 0,05 M ou solução salina a 0,8 %. Outros veículos parenterais comuns incluem soluções de fosfato de sódio, dextrose de Ringer, dextrose e cloreto de sódio, Ringer lactato, ou óleos fixos. Veículos intravenosos incluem reabastecedores de fluido e nutriente, reabastecedores de eletrólito, tais como aqueles com base em dextrose de Ringer, e semelhantes. Conservantes e outros aditivos também podem estar presentes tais como, por exemplo, antimicrobianos, antioxidantes, agentes quelantes, e gases inertes e semelhantes.

[00130]Mais particularmente, composições farmacêuticas adequadas para uso injetável incluem soluções aquosas estéreis (onde solúvel em água) ou dispersões e pós estéreis para a preparação extemporânea de soluções injetáveis estéreis ou dispersões. Em tais casos, a composição deve ser estéril e deve ser fluida à medida em que a capacidade de injeção com seringa fácil existe. Ela deve ser estável sob as condições de fabricação e armazenamento e preferivelmente será preservada contra a ação contaminante de microorganismos, tais como bactérias e fungos. O carregador

pode ser um solvente ou meio de dispersão contendo, por exemplo, água, etanol, poliol (por exemplo, glicerol, propileno glicol, e polietilenoglicol líquido, e semelhantes), e misturas adequadas destes. A fluidez apropriada pode ser mantida, por exemplo, pelo uso de um revestimento tal como lecitina, pela manutenção do tamanho de partícula necessário no caso de dispersão e pelo uso de tensoativos. Formulações adequadas para o uso nos métodos terapêuticos aqui divulgados são descritas em Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Publishing Co.) 16^a ed. (1980).

[00131]A prevenção da ação de microorganismos pode ser obtida por vários agentes antibacterianos e antifúngicos, por exemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido ascórbico, timerosal e semelhantes. Em muitos casos, será preferível incluir agentes isotônicos, por exemplo, açúcares, poliálcoois, tais como manitol, sorbitol, ou cloreto de sódio na composição. A absorção prolongada das composições injetáveis pode ser causada incluindo-se na composição um agente que retarda a absorção, por exemplo, monoestearato de alumínio e gelatina.

[00132]Em qualquer caso, soluções injetáveis estéreis podem ser preparadas incorporando-se um composto ativo (por exemplo, um anticorpo anti-SEMA4D, ou fragmento de ligação ao antígeno, variante, ou derivado destes, por si só ou em combinação com outros agentes ativos) na quantidade necessária em um solvente apropriado com um ou uma combinação de ingredientes enumerados aqui, conforme necessário, seguido por esterilização filtrada. Geralmente, dispersões são preparadas incorporando-se o composto ativo em um veículo estéril, que contém um meio de dispersão básico e os outros ingredientes necessários daqueles enumerados acima. No caso de pós estéreis para a preparação de soluções injetáveis estéreis, os métodos preferidos de preparação são secagem a vácuo e liofilização, que produz um pó de um ingrediente ativo mais qualquer ingrediente desejado adicional a partir de uma solução previamente estéril-filtrada deste. As preparações para injeções são processadas, cheias em recipientes tais como ampolas, sacos, garrafas, seringas ou frascos, e vedadas

sob condições assépticas de acordo com métodos conhecidos na técnica. Além disso, as preparações podem ser embaladas e vendidas na forma de um kit. Tais artigos de fabricação podem ter rótulos ou inserções de pacote indicando que as composições associadas são úteis para tratar um sujeito sofrendo de, ou predisposto a uma doença ou transtorno.

[00133]Formulações parenterais podem ser uma dose de bolo única, uma infusão ou uma dose de bolo de carga seguida com uma dose de manutenção. Estas composições podem ser administradas em intervalos fixos ou variáveis específicos, por exemplo, uma vez por dia, ou em uma base “conforme necessário”.

[00134]Certas composições farmacêuticas utilizadas nesta invenção podem ser oralmente administradas em uma forma de dosagem aceitável incluindo, por exemplo, cápsulas, tabletes, suspensões ou soluções aquosas. Certas composições farmacêuticas também podem ser administradas por aerossol nasal ou inalação. Tais composições podem ser preparadas como soluções em solução salina, utilizando álcool benzílico ou outros conservantes adequados, promotores de absorção para realçar a biodisponibilidade, e/ou outros agentes solubilizantes ou dispersantes convencionais.

[00135]A quantidade de uma molécula de ligação anti-SEMA4D, uma molécula de ligação anti-Plexina B1, ou combinação destas, por exemplo, anticorpo, ou fragmento, variante, ou derivado destes, a ser combinada com os materiais carregadores para produzir uma forma de dosagem única variará dependendo do hospedeiro tratado e do modo particular de administração. A composição pode ser administrada como uma dose única, doses múltiplas ou durante um período de tempo estabelecido em uma infusão. Regimes de dosagem também podem ser ajustados para fornecer a resposta desejada ideal (por exemplo, uma resposta terapêutica ou profilática).

[00136]De acordo com o escopo da presente divulgação, anticorpos anti-SEMA4D, ou fragmentos de ligação ao antígeno, variantes, ou derivados destes

podem ser administrados a um ser humano ou outro animal de acordo com os métodos de tratamento anteriormente mencionados em uma quantidade suficiente para produzir um efeito terapêutico. Os anticorpos anti-SEMA4D, ou fragmentos de ligação ao antígeno, variantes ou derivados destes podem ser administrados a tal ser humano ou outro animal em uma forma de dosagem convencional preparada combinando-se o anticorpo da invenção com um carregador ou diluente farmacologicamente aceitáveis convencionais de acordo com técnicas conhecidas. Será reconhecido por uma pessoa de habilidade na técnica que a forma e caráter do carregador ou diluente farmacologicamente aceitáveis são ditadas pela quantidade de ingrediente ativo com que devem ser combinados, pela via de administração e outras variáveis bem conhecidas. Aqueles habilitados na técnica avaliarão ainda que um coquetel compreendendo uma ou mais espécies de moléculas de ligação anti-SEMA4D, moléculas de ligação anti-Plexina B1, ou combinações destas, por exemplo, anticorpos, ou fragmentos de ligação ao antígeno, variantes, ou derivados destes, da invenção podem ser utilizados.

[00137]Por “dose ou quantidade terapeuticamente eficazes” ou “quantidade eficaz” é intencionado uma quantidade de molécula de ligação anti-SEMA4D, molécula de ligação anti-Plexina B1, ou combinação destas, por exemplo, anticorpo ou fragmento de ligação com o antígeno, variante, ou derivado destes, que quando administrada causa uma resposta terapêutica positiva com respeito ao tratamento de um paciente com uma doença a ser tratada, por exemplo, uma diminuição na permeabilidade da BBB, um aumento na resistividade da BBB, um aumento no número, densidade ou concentração de células endoteliais presentes na BBB, uma mudança na morfologia ou função nas células endoteliais, ou uma mudança nas interações entre células endoteliais ou astrócitos ou entre células endoteliais e astrócitos que formam a BBB.

[00138]Doses terapeuticamente eficazes das composições da presente invenção, para a diminuição na permeabilidade de BBB variam dependendo de muitos

fatores diferentes, incluindo meios de administração, sítio alvo, estado fisiológico do paciente, se o paciente é humano ou um animal, outras medicações administradas, e se o tratamento é profilático ou terapêutico. Em certas formas de realização o paciente é um ser humano, mas mamíferos não humanos incluindo mamíferos transgênicos também podem ser tratados. Dosagens de tratamento podem ser tituladas usando métodos de rotina conhecidos àqueles de habilidade na técnica para otimizar a segurança e eficácia.

[00139]A quantidade de pelo menos uma molécula de ligação anti-SEMA4D, molécula de ligação anti-Plexina B1, ou combinação destas, por exemplo, anticorpo ou fragmento de ligação, variante, ou derivado destes, a ser administrada é facilmente determinada por uma pessoa de habilidade comum na técnica sem experimentação indevida dada a divulgação da presente invenção. Fatores que influenciam o modo de administração e a quantidade respectiva de pelo menos uma molécula de ligação anti-SEMA4D, molécula de ligação anti-Plexina B1, ou combinação destas, por exemplo, anticorpo, fragmento de ligação ao antígeno, variante ou derivado destes incluem, mas não são limitados a, a severidade da doença, a história da doença, e a idade, altura, peso, saúde, e condição física da terapia de experimentação individual. Similarmemente, a quantidade de molécula de ligação anti-SEMA4D, molécula de ligação anti-Plexina B1, ou combinação destas, por exemplo, anticorpo, ou fragmento, variante, ou derivado destes, a ser administrada será dependente do modo de administração e se o sujeito suportará uma dose única ou doses múltiplas deste agente.

[00140]A invenção também leva em consideração o uso de uma molécula de ligação anti-SEMA4D, uma molécula de ligação anti-Plexina B1, ou combinação destas, por exemplo, anticorpo da invenção, ou fragmento de ligação ao antígeno, variante, ou derivado destes, na fabricação de um medicamento para tratar um sujeito para tratar um transtorno neuroinflamatório, em que o medicamento é utilizado em um sujeito que foi pré-tratado com pelo menos uma outra terapia. Por “pré-tratado” ou

“pré-tratamento” é intencionado que o sujeito recebeu uma ou mais outras terapias (por exemplo, foi tratado com pelo menos uma outra terapia neuroinflamatória) antes de receber o medicamento compreendendo a molécula de ligação anti-SEMA4D, uma molécula de ligação anti-Plexina B1, ou combinação destas, por exemplo, anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno, variante, ou derivado destes. “Pré-tratado” ou “pré-tratamento” inclui sujeitos que foram tratados com pelo menos uma outra terapia dentro de 2 anos, dentro de 18 meses, dentro de 1 ano, dentro de 6 meses, dentro de 2 meses, dentro de 6 semanas, dentro de 1 mês, dentro de 4 semanas, dentro de 3 semanas, dentro de 2 semanas, dentro de 1 semana, dentro de 6 dias, dentro de 5 dias, dentro de 4 dias, dentro de 3 dias, dentro de 2 dias, ou ainda dentro de 1 dia antes do início do tratamento com o medicamento compreendendo a molécula de ligação anti-SEMA4D, por exemplo, o anticorpo monoclonal VX15/2503 aqui divulgado, ou fragmento de ligação ao antígeno, variante, ou derivado destes. Não é necessário que o sujeito fosse um respondedor ao pré-tratamento com a terapia ou terapias anteriores. Assim, o sujeito que recebe o medicamento compreendendo a molécula de ligação anti-SEMA4D, uma molécula de ligação anti-Plexina B1, ou combinação destas, por exemplo, um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno, variante, ou derivado destes pode ter respondido, ou pode ter falhado a responder, ao pré-tratamento com a terapia anterior, ou a uma ou mais das terapias anteriores onde o pré-tratamento compreendeu terapias múltiplas.

[00141]A prática da presente invenção utilizará, a menos que de outro modo indicado, técnicas convencionais de biologia celular, cultura celular, biologia molecular, biologia transgênica, microbiologia, DNA recombinante, e imunologia, que estão dentro da habilidade da técnica. Tais técnicas são explicadas completamente na literatura. Veja, por exemplo, Sambrook *et al.*, ed. (1989) *Molecular Cloning A Laboratory Manual* (2ª ed.; Cold Spring Harbor Laboratory Press); Sambrook *et al.*, ed. (1992) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, (Cold Springs Harbor Laboratory, NY); D. N.

Glover ed., (1985) DNA Cloning, Volumes I e II; Gait, ed. (1984) Oligonucleotide Synthesis; Mullis *et al.* Pat. U.S. Nº 4.683.195; Hames e Higgins, eds. (1984) Nucleic Acid Hybridization; Hames e 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 e Calos eds. (1987) Gene Transfer Vectors For Mammalian Cells, (Cold Spring Harbor Laboratory); Wu *et al.*, eds., Methods In Enzymology, Vols. 154 e 155; Mayer e Walker, eds. (1987) Immunochemical Methods In Cell And Molecular Biology (Academic Press, London); Weir e Blackwell, eds., (1986) Handbook Of Experimental Immunology, Volumes I-IV; Manipulating the Mice Embryo, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., (1986); e em Ausubel *et al.* (1989) Current Protocols in Molecular Biology (John Wiley and Sons, Baltimore, Md.).

[00142]Princípios gerais de engenharia de anticorpo são apresentados em Borrebaeck, ed. (1995) Antibody Engineering (2ª ed.; Oxford Univ. Press). Princípios gerais de engenharia de proteína são apresentados em Rickwood *et al.*, eds. (1995) Protein Engineering, A Practical Method (IRL Press at Oxford Univ. Press, Oxford, Eng.). Princípios gerais de anticorpos e ligação de anticorpo-hapteno são apresentados em: Nisonoff (1984) Molecular Immunology (2ª ed.; Sinauer Associates, Sunderland, Mass.); e Steward (1984) Antibodies, Their Structure and Function (Chapman and Hall, Nova Iorque, N.Y.). Adicionalmente, métodos padrão em imunologia conhecidos na técnica e não especificamente descritos são geralmente seguidos como em Current Protocols in Immunology, John Wiley & Sons, Nova Iorque; Stites *et al.*, eds. (1994) Basic and Clinical Immunology (8ª ed; Appleton & Lange, Norwalk, Conn.) e Mishell e Shiigi (eds) (1980) Selected Methods in Cellular Immunology (W.H. Freeman e Co., NY).

[00143]Trabalhos de referência padrão apresentando princípios gerais de

imunologia incluem Current Protocols in Immunology, John Wiley & Sons, Nova Iorque; 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" em 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 (6ª ed.; London: Mosby); Abbas *et al.* (2005) Cellular and Molecular Immunology (5ª ed.; Elsevier Health Sciences Division); Kontermann e Dubel (2001) Antibody Engineering (Springer Verlag); Sambrook e Russell (2001) Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Press); Lewin (2003) Genes VIII (Prentice Hall 2003); Harlow e Lane (1988) Antibodies: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Press); Dieffenbach e Dveksler (2003) PCR Primer (Cold Spring Harbor Press).

[00144] Todas as referências citadas acima, assim como todas as referências citadas aqui, são incorporadas aqui como referência em suas totalidades.

[00145] Os exemplos seguintes são oferecidos por via de ilustração e não por via de limitação.

EXEMPLOS

[00146] Os exemplos seguintes demonstram a eficácia do anticorpo anti-SEMA4D (VX15/2503) em reduzir ou impedir a ruptura da BBB, isto é, uma diminuição na permeabilidade da BBB, em um modelo de DIV-BBB *in vitro* assim como em um modelo de EAE *in vivo*. Um experimento do modelo de doença de Alzheimer *in vivo* também é divulgado aqui. Uma descrição detalhada sobre o modelo de DIV-BBB *in vitro* pode ser encontrada em, por exemplo, Cucullo *et al.*, Brain Research. 951 243 - 254 (2002); e Cucullo *et al.*, *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*. 1 - 11 (2010). Os modelos de EAE e doença de Alzheimer *in vivo* são divulgados, por exemplo, em Miller *et al.*, *Curr Protoc Immunol*. CHAPTER: Unit-15.1, 2007; Colton *et al.*, J

Alzheimers Dis 15: 571 - 587, 2008 e Wilcock *et al.*, *J. Neuroscience*, 29: 7957 - 7965, 2009, respectivamente.

Exemplo 1: Teste da capacidade de uma molécula de ligação anti-SEMA4D, por exemplo, um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno, variante, ou derivado destes, por exemplo, VX15/2503, de restaurar a integridade da BBB a seguir da ruptura induzida por SEMA4D da BBB em um modelo de DIV-BBB *in vitro*

[00147]*Projeto Experimental. Um modelo de BBB dinâmica *in vitro* ("DIV-BBB") foi realizado para estudar o efeito de SEMA4D humana recombinante (hu-SEMA4D-his) e VX15/2503 (descrito em detalhe em US 2010/0285036 A1, incorporado aqui como referência em sua totalidade) na integridade da BBB. Dois cartuchos de DIV-BBB foram testados no modelo. O projeto experimental básico é mostrado na FIG. 1. Concentrações crescentes de SEMA4D recombinante (rSEMA4D) foram adicionadas no lúmen em intervalos de 12 horas, considerando o equilíbrio (aproximadamente 12 horas/concentração). rSEMA4D foi inicialmente adicionada no lúmen em uma concentração de 0,05 µg/ml no tempo 0. A concentração de rSEMA4D aumentou em 10 vezes em cada intervalo, por exemplo, 0,5 µg/ml em 12 horas, 5,0 µg/ml em 24 horas, e 50,0 µg/ml em 36 horas. Medições de TEER foram tomadas entre cada intervalo como uma reflexão das alterações na permeabilidade da BBB em concentrações variadas de rSEMA4D. A seguir da adição da dose final de rSEMA4D em 50,0 µg/ml em 36 horas, VX15/2503 foi adicionado no lúmen em uma concentração de 250 µg/ml em 48 horas. Em 72 horas, 24 horas a seguir da adição de VX15/2503, a permeabilidade da BBB foi novamente medida.

[00148]Medição de Resistência Elétrica Transendotelial (TEER) foi utilizada para monitorar a integridade da BBB em tempo real. Como mencionado acima, o sistema de TEER usa multiplexação eletrônica para medir cartuchos múltiplos em sucessão rápida e avalia a integridade e viabilidade de bicamadas de cultura de tecido rapidamente e com segurança (Cucullo *et al.*, 2002; Santaguida *et al.*, 2006). Neste

modelo dinâmico *in vitro*, os cartuchos, ou tubo ociosos, foram configurados para representar a barreira hematoencefálica com o interior do cartucho representando o lado sanguíneo da barreira hematoencefálica e o exterior do cartucho representando o lado cerebral da barreira hematoencefálica. O interior do cartucho foi revestido com células endoteliais microvasculares cerebrais humanas adultas e o exterior foi revestido com astrócitos adultos humanos. Como um agente modificador de barreira hematoencefálica, tal como SEMA4D, foi introduzido no lúmen do cartucho, a corrente elétrica entre o interior e exterior do tubo foi monitorada usando TEER. Em operação, o sistema de TEER aplica uma voltagem de excitação (0,06 V) através dos eletrodos de excitação inseridos em cada cartucho nos compartimentos luminiais e extraluminiais. Um microcontrolador computa a resistividade e capacitância (por cm^2) da barreira a partir de parâmetros físicos. Os valores de capacitância são calculados por comparação da voltagem e formas de onda da corrente. O atraso de pico-a-pico das duas formas de onda é proporcional ao valor da capacitância, que é expresso como tensão do arco. A TEER foi medida a partir da configuração inicial por todo o curso de cada experimento.

[00149]Aumento induzido por rSEMA4D na Permeabilidade da BBB. A seguir da formação da BBB, o efeito de rSEMA4D sobre a integridade da BBB foi medido adicionando-se concentrações crescentes de SEMA4D recombinante (rSEMA4D) no lúmen dos dois cartuchos. rSEMA4D foi inicialmente adicionada no lúmen em uma concentração de 0,05 $\mu\text{g/ml}$ no tempo 0. A concentração de rSEMA4D foi aumentada 10 vezes em cada intervalo de 12 horas, por exemplo, 0,5 $\mu\text{g/ml}$ em 12 horas, 5 $\mu\text{g/ml}$ em 24 horas e 50,0 $\mu\text{g/ml}$ em 36 horas. Medições de TEER foram tomadas entre e durante cada intervalo como uma reflexão de alterações na permeabilidade da BBB em concentrações variadas de rSEMA4D. Geralmente, a permeabilidade da BBB permaneceu relativamente estável em 0,05 $\mu\text{g/ml}$ de rSEMA4D. Começando em 0,5 $\mu\text{g/ml}$, concentrações crescentes de rSEMA4D (isto é, 0,5 $\mu\text{g/ml}$, 5 $\mu\text{g/ml}$ e 50 $\mu\text{g/ml}$)

resultaram em medição de TEER diminuída refletindo a permeabilidade aumentada da camada da célula endotelial. Estes resultados são mostrados na FIG. 2.

[00150]Diminuição induzida por Anticorpo na Permeabilidade de BBB Tratada com rSEMA4D. Para medir o efeito de um anticorpo anti-SEMA4D na BBB a seguir da exposição à dosagem ascendente de rSEMA4D, VX15/2503 foi adicionado em uma concentração de 250 µg/ml em 48 horas. Medições de TEER foram tomadas em 72 horas. O tratamento com VX15/2503 resultou em uma diminuição global na permeabilidade (ou aumento na resistividade) da BBB nos dois cartuchos. Esta diminuição na permeabilidade reflete a restauração da BBB. Os resultados são mostrados na FIG. 2.

Exemplo 2: Teste da capacidade de uma molécula de ligação anti-SEMA4D, por exemplo, um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno, variante, ou derivado destes, por exemplo, VX15/2503, de restaurar a integridade da BBB a seguir da ruptura induzida por SEMA4D da BBB em um modelo de DIV-BBB *in vitro*

[00151]Projeto Experimental. Um segundo experimento utilizando o modelo de DIV-BBB *in vitro* foi realizado para estudar o efeito de SEMA4D e VX15/2503 sobre a integridade da BBB. O projeto experimental básico foi similar àquele mostrado no exemplo 1, e FIG. 1, acima. Por duas semanas, os cartuchos de DIV-BBB passaram por formação de BBB em compartimentos celulares endoteliais e astrocíticos. A formação da BBB como refletido em TEER é mostrada nas FIGS. 3 e 4.

[00152]Aumento induzido por rSEMA4D na Permeabilidade da BBB. A seguir da formação da BBB, o efeito de rSEMA4D sobre a integridade da BBB foi medido adicionando-se concentrações crescentes de SEMA4D recombinante (rSEMA4D) no lúmen do primeiro cartucho de um conjunto de três cartuchos em intervalos de 12 horas, considerando o equilíbrio (aproximadamente 12 horas/concentração). rSEMA4D foi inicialmente adicionada no lúmen em uma concentração de 0,5 µg/ml no tempo 0. A concentração de rSEMA4D aumentou em 10 vezes em cada intervalo, por

exemplo, 5 µg/ml em 12 horas e 50,0 µg/ml em 24 horas. Medições de TEER foram tomadas entre cada intervalo como uma reflexão das alterações na permeabilidade da BBB em concentrações variadas de rSEMA4D. Geralmente, concentrações crescentes de rSEMA4D resultaram na medição de TEER diminuída refletindo a permeabilidade aumentada da BBB. Estes resultados são mostrados na FIG. 3.

[00153]Para testar a integridade da BBB na presença de um antígeno que não alveja a camada da célula endotelial, um controle de proteína recombinante similarmente preparado (CTRL, proteína C35) foi adicionado em concentrações equimolares nos mesmos intervalos de 12 horas (isto é, 0,25 µg/ml no tempo 0, 2,5 µg/ml em 12 horas, e 25,0 µg/ml em 24 horas) aos dois cartuchos de controle adicionais. Ao contrário do efeito de rSEMA4D, a proteína de CTRL não induziu uma mudança significativa em TEER refletindo nenhuma mudança significativa na permeabilidade da BBB. Se, entretanto, 50,0 µg/ml de rSEMA4D foram adicionados 12 horas depois da adição da concentração mais alta de proteína de CTRL, uma diminuição rápida em TEER similar àquela observada com doses ascendentes de rSEMA4D foi induzida. Os resultados são mostrados na FIG. 4.

[00154]Diminuição induzida por Anticorpo na Permeabilidade de BBB Tratada com rSEMA4D. A seguir da adição da dose final de rSEMA4D em 50,0 µg/ml em 24 horas, o efeito de VX15/2503 sobre TEER e a permeabilidade da BBB foi medido. Na FIG. 3, o anticorpo VX15/2503 foi adicionado em uma concentração de 250 µg/ml em 36 horas a dois dos três cartuchos que receberam doses ascendentes de rSEMA4D enquanto a mesma concentração de um anticorpo de controle de isótipo foi adicionado ao único cartucho remanescente que recebeu doses ascendentes de rSEMA4D. Medições de TEER foram tomadas em vários pontos de tempo subsequentes. O tratamento com VX15/2503 resultou em um aumento em TEER de volta aos níveis de pico no início do experimento, refletindo uma diminuição global na permeabilidade da BBB (isto é, restauração da BBB). No único cartucho que recebeu anticorpo de controle de

isótipo, níveis de TEER permaneceram nos níveis relativamente reduzidos induzidos por tratamento com rSEMA4D, indicando nenhuma diminuição significativa na permeabilidade da BBB. Resultados similares são mostrados na FIG. 4. Na FIG. 4, o anticorpo VX15/2503 foi adicionado em uma concentração de 250 µg/ml em 48 horas aos dois cartuchos que receberam proteína C35 recombinante de controle inicial seguido por 50 µg/ml de rSEMA4D por 12 horas. O tratamento com VX15/2503 resultou em um aumento em TEER de volta aos níveis de pico no início do experimento, refletindo uma diminuição global na permeabilidade da BBB (isto é, restauração da BBB).

Exemplo 3: Teste da capacidade de uma molécula de ligação anti-Plexina-B1, por exemplo, um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno, variante, ou derivado destes, de restaurar a integridade da BBB a seguir da ruptura induzida por SEMA4D da BBB em um modelo de DIV-BBB *in vitro*

[00155]Um outro estudo foi conduzido para medir os efeitos do anticorpo anti-Plexina-B1 (MAB37491 Human Plexin-B1 MAb (Clone 559830), R&D Systems) sobre a integridade da BBB. Este anticorpo bloqueia a ligação de SEMA4D ao receptor de Plexina-B1. Os resultados deste estudo são mostrados na FIG. 5. Como mostrado na FIG. 5, células endoteliais e astrócitos humanos em quatro cartuchos de DIV-BBB passaram por formação de BBB similar aos experimentos descritos acima. Depois da formação da BBB, rSEMA4D foi adicionada em uma concentração de 50,0 µg/ml, induzindo um aumento na permeabilidade de BBB (isto é, destruição da BBB). A seguir da adição de rSEMA4D, o anticorpo anti-Plexina-B1 foi adicionado em uma concentração de 125 µg/ml em 6 horas a dois dos quatro cartuchos, o anticorpo VX15/2503 foi adicionado em uma concentração de 250 µg/ml a um dos quatro cartuchos, e o anticorpo de controle de isótipo foi adicionado em uma concentração de 250 µg/ml ao cartucho remanescente. Medições de TEER foram tomadas em vários pontos de tempo subsequentes. O tratamento com VX15/2503 ou anticorpo anti-Plexina-B1 resultou em um aumento em níveis de TEER com ambos os agentes. O tratamento com

VX15/2503 resultou em um aumento um pouco maior em TEER do que o tratamento com anticorpo anti-Plexina-B1 no último ponto no tempo. O efeito dos dois anticorpos é indistinguível em todos os outros pontos no tempo. O aumento em TEER reflete uma diminuição global na permeabilidade da BBB (isto é, restauração da BBB) na presença de VX15/2503 ou anticorpo anti-Plexina-B1. No único cartucho que recebeu anticorpo de controle de isótipo, níveis de TEER permaneceram nos níveis relativamente reduzidos induzidos pelo tratamento com rSEMA4D, indicando nenhuma diminuição significativa na permeabilidade da BBB. Deve ser avaliado que o tratamento também pode ser conduzido usando uma combinação de VX15/2503 e anti-Plexina-B1.

Exemplo 4: Teste da capacidade de uma molécula de ligação anti-SEMA4D, por exemplo, um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno, variante, ou derivado destes, por exemplo, VX15/2503, de restaurar a integridade da BBB a seguir da ruptura da BBB induzida por PBMC ativadas e cessação do fluxo em um modelo de DIV-BBB *in vitro*

[00156]Projeto Experimental. Um outro experimento utilizando o modelo de DIV-BBB *in vitro* foi realizado para estudar o efeito de VX15/2503 em restaurar a integridade da BBB a seguir da ruptura da BBB induzida por células mononucleares sanguíneas periféricas ativadas (PBMC) e cessação de fluxo. Por duas semanas, dois cartuchos de DIV-BBB passaram por formação de BBB em compartimentos celulares endoteliais e astrocíticos.

[00157]Aumento induzido por PBMC ativadas na permeabilidade da BBB. A seguir da formação da BBB, o efeito de PBMC ativadas sobre a integridade da BBB foi medido. PBMC foram ativadas com PMA/ionomicina por 2 horas e depois adicionadas em uma concentração de 10^6 /ml no lúmen dos dois cartuchos. Medições de TEER foram tomadas antes e depois da adição das PBMC ativadas como uma reflexão das alterações na permeabilidade da BBB. Geralmente, adicionar PBMC ativadas aos cartuchos em 10^6 /ml resultou na medição de TEER diminuída refletindo

permeabilidade aumentada da BBB. Estes resultados são mostrados na FIG. 6.

[00158]Em aproximadamente 2 a 4 horas a seguir da adição das PBMC ativadas aos cartuchos, a cessação de fluxo foi realizada por 1 hora. Medições de TEER foram tomadas antes e depois da cessação de fluxo como uma reflexão das alterações na permeabilidade da BBB. Geralmente, a cessação de fluxo resultou em uma diminuição adicional na medição de TEER refletindo a permeabilidade aumentada da BBB. Estes resultados também são mostrados na FIG. 6.

[00159]Diminuição induzida por Anticorpo na Permeabilidade da BBB Exposta a PBMC ativadas. A seguir da exposição a PBMC ativadas e cessação de fluxo, o efeito de VX15/2503 sobre TEER e a permeabilidade da BBB foi medido. O anticorpo VX15/2503 foi adicionado em uma concentração de 250 µg/ml a um dos dois cartuchos que receberam PBMC ativadas enquanto a mesma concentração de um anticorpo de controle de isótipo (Ig de Controle de Isótipo, 2269) foi adicionado ao cartucho remanescente. Medições de TEER foram tomadas em vários pontos de tempo subsequentes. Como mostrado na FIG. 6, o tratamento com VX15/2503 resultou em um aumento em TEER de volta aos níveis de pico no início do experimento, refletindo uma diminuição global na permeabilidade da BBB (isto é, restauração da BBB). No cartucho que recebeu anticorpo de controle de isótipo, níveis de TEER permaneceram nos níveis relativamente reduzidos induzidos por tratamento com PBMC ativadas e cessação de fluxo, indicando nenhuma diminuição significativa na permeabilidade da BBB.

Exemplo 5: Teste da capacidade de uma molécula de ligação anti-SEMA4D, por exemplo, um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno, variante, ou derivado destes, por exemplo, VX15/2503, de proteger a integridade da BBB em um modelo de EAE *in vivo*

[00160]Moléculas de ligação anti-SEMA4D, por exemplo, anticorpos ou fragmentos de ligação ao antígeno, variantes ou derivados destes, por exemplo,

VX15/2503, foram testadas no modelo de encefalomielite autoimune experimental (EAE) *in vivo*.

[00161]Em um modelo de EAE *in vivo*, a ruptura da BBB foi investigada examinando-se as alterações na permeabilidade cerebral como refletido na penetração do fibrinogênio do sangue no parênquima cerebral e através da examinação de proteínas da junção de oclusão endotelial, incluindo Claudina-5. Neste modelo, EAE foi induzida em camundongos por imunização com peptídeo PLP (139 a 151). Certamente, aqueles habilitados na técnica avaliarão que outras proteínas de indução de EAE podem ser utilizados igualmente (por exemplo, um antígeno de mielina, por exemplo peptídeo de glicoproteína de mielina-oligodendrócito 35 a 55) e que, para maior eficiência, estas proteínas ou peptídeos de indução podem variar de uma espécie a outra e de uma cepa de camundongos a outra, Steinman, L. *Neuron* 24:511-514 (1999). Seções de tecido do sistema nervoso central (CNS) de animais em diferentes estágios de doença foram depois submetidas à imunocoloração para proteínas (fibrinogênio e claudina-5, que servem como marcadores para o rompimento da BBB).

[00162]Projeto Experimental. Em um modelo de EAE *in vivo*, EAE foi induzida em camundongos SJL/J de 12 semanas de idade (10 camundongos por grupo) por imunização com peptídeo PLP (139 a 151) em CFA (adjuvante completo de Freund). Os camundongos depois foram tratados uma vez por semana a partir de 7 dias pós-indução com 600 µg de anticorpo anti-SEMA4D (anticorpo VX15/2503) ou IgG de controle. Sinais neurológicos foram primeiro observados em 11 d pós-indução (dpi). Em 13 dias pós-indução, durante a fase aguda da doença, 4 camundongos por grupo foram sacrificados e amostras da medula espinhal lombar foram preparadas para análise histopatológica. Para detectar o rompimento da BBB nas amostras, estas amostras foram submetidas à imunocoloração para fibrinogênio e claudina-5. O procedimento para imunocoloração é como segue: Seções foram enxaguadas duas vezes em PBS, depois incubadas em PBS com glicina a 0,1 % por 10 min, bloqueadas em

PBS com Triton X-100 a 0,3 % e soro de cabra a 10 % por 1 h, e incubadas com Abs primários em tampão de bloqueio durante a noite a 4 °C. Para claudina-5 (CLN-5), antes do bloqueio, as seções foram embebidas em EDTA, pH 8, 100 °C. Os anticorpos primários utilizados foram anti-CLN-5 (1:50), e anti-fibrinogênio (1:1.000). Depois de lavar três vezes em PBS a 0,3 %, Triton X-100 as seções depois foram incubadas em anticorpos secundários específicos da espécie relevantes conjugados a AlexaFluor 488 e/ou AlexaFluor 594 (1/100; Molecular Probes) em tampão de bloqueio por 1 h a 25 °C, lavadas novamente três vezes, e contratingidas com 4,6-diamidino-2-fenilindol (DAPI). Todas as amostras foram examinadas e fotografadas usando um sistema confocal de varredura a laser Zeiss LSM 510 META ligado a um microscópio de fluorescência invertida Axiovert 200.

[00163]A doença clínica nos camundongos foi classificada como segue: 0 = nenhum sintoma; 1 = cauda mole; 2 = fraqueza na pata traseira; 4 = fraqueza na pata dianteira e traseira; 5 = morte. Sinais neurológicos foram primeiro observados na 11 dias pós-indução. Nos camundongos tratados com o anticorpo VX15/2503, a doença clínica atingiu uma classificação de severidade média de 0,75, indicativo de fraqueza suave na cauda, enquanto a doença clínica em camundongos do grupo de controle atingiu uma classificação de severidade média de 2,25, indicativo de paralisia parcial.

[00164]Os resultados da imunocoloração em 13 dias pós-indução são mostrados nas FIGS. 7A a 7C. Fibrinogênio não penetra normalmente na barreira cerebral sangue-cérebro (BBB). Em EAE, com a BBB comprometida, a cor de fibrinogênio verde foi detectada na substância cerebral (painel esquerdo). Além disso, a expressão de claudina-5 (CLN-5, cor vermelha), um componente das junções de oclusão que compõem a BBB, foi reduzida. Camundongos no grupo de controle mostraram expressão reduzida de claudina-5 e níveis aumentados de perda extravascular de fibrinogênio, que correlacionou com um rompimento na BBB. Em camundongos tratados com anticorpo VX15/2503, por outro lado, a expressão de claudina-5 foi mantida e a perda

de fibrinogênio foi significativamente reduzida. Estes resultados demonstraram o efeito protetivo do anticorpo VX15/2503 contra o rompimento da BBB nestes camundongos tratados, e especificamente demonstraram como o anticorpo anti-SEMA4D impede a ruptura da BBB, impede a perda extravascular de fibrinogênio (painel esquerdo 7A e quantificação em 7B), e preserva claudina-5 como detectado pela cor vermelha (painel direito 7A e quantificação em 7C).

Exemplo 6: Efeito de SEMA4D sobre Proteínas da Junção de Oclusão em culturas de células endoteliais cerebrais

[00165]Projeto Experimental. A expressão da proteína da junção de oclusão endotelial chave Claudina-5 a seguir do tratamento de células endoteliais derivadas do CNS com SEMA4D recombinante solúvel foi investigada. Neste modelo, culturas endoteliais do sistema nervoso central (CNS) de camundongo primário foram isoladas e plaqueadas em uma placa revestida com matrigel de 6 reservatórios (MBCEC isoladas de 10 cérebros foram recolocadas em suspensão em 3 ml de meio de cultura de célula endotelial primário e plaqueadas em 250 ul por reservatório). Culturas foram utilizadas no dia 7 depois do isolamento. Culturas foram tratadas com 1 ng/ml, 10 ng/ml ou 100 ng/ml de SEMA4D de camundongo recombinante ou 100 ng/ml de VEGF-A de camundongo (controle positivo) por 24 horas. As culturas endoteliais dos animais depois foram submetidas a SDS-eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) e imunomanchamento para o controle de carga de proteína de junção de oclusão claudina-5 e actina. Dados foram varridos e submetidos à densitometria usando o software ImageJ (NIH).

[00166]Os resultados do imunomanchamento são mostrados na FIG. 8. Como fornecido na FIG,8, culturas de célula endotelial tratadas com 100 ng/ml de SEMA4D recombinante mostraram uma redução significativa na expressão da proteína Claudina-5. Culturas de célula endotelial tratadas com 100 ng/ml de VEGF-A foram testadas como um controle positivo para a infrarregulação de Claudina-5. Isto demonstra o

papel importante de SEMA4D em regular a expressão de uma proteína de junção de oclusão chave da BBB.

Exemplo 7: Teste da capacidade de uma molécula de ligação anti-SEMA4D ou anti-Plexina B1, por exemplo, um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno, variante, ou derivado destes para diminuir a permeabilidade da BBB em um modelo de Doença de Alzheimer (AD) *in vivo*

[00167] Moléculas de ligação anti-SEMA4D ou anti-Plexina B1, por exemplo, anticorpos ou fragmentos de ligação ao antígeno, variantes ou derivados destes, por exemplo, MAb 67 (descrito em detalhe em US 2010/0285036 A1, incorporado aqui como referência em sua totalidade), são testadas em vários sistemas modelos de transtornos neuroinflamatórios, incluindo, mas não limitados a, um modelo de camundongo transgênico com doença de Alzheimer (AD) experimental *in vivo* APP^{SwDI}/NOSC^{-/-}. Estes camundongos foram gerados cruzando-se o camundongo mutante APP-Swedish-Dutch-Iowa com camundongo knock-out de óxido nítrico sintase 2 (Colton *et al.*, *J Alzheimers Dis*, 15: 571 - 587, 2008; Van Nostrand *et al.*, *Stroke* 41: S135 - S138, 2010). Os camundongos APP^{SwDI}/NOSC^{-/-} desenvolvem amiloidose neurovascular relacionada à idade com função de BBB interrompida, placas amiloides intraparenquimais, hiperfosforilação tau de camundongo, neuroinflamação, morte celular neuronal, e déficits cognitivos. Wilcock *et al.* mostraram que o tratamento de camundongos APP^{SwDI}/NOSC^{-/-} com imunoterapia ativa dirigida com amiloide-beta leva à redução acentuada na deposição de amiloide, mas com incidência aumentada de microhemorragias (Wilcock *et al.*, *J Neurosci*. 29: 7957 - 7965, 2009).

[00168] Em um modelo de AD *in vivo*, a progressão de AD é investigada examinando-se assinaturas imunohistoquímicas de deposição de amiloide, hiperfosforilação de tau, e perda da BBB (fibrinogênio), assim como avaliando-se capacidades cognitivas em paradigmas comportamentais com base em memória espacial. Neste modelo, os camundongos transgênicos são administrados com MAb 67 ou Ig de Controle

(Mab 2B8) intravenosamente em uma concentração de 30 mg/kg da idade de 26 a 38 semanas para um total de 13 doses.

[00169]Os camundongos são inicialmente submetidos ao teste comportamental comparativo na idade de 10 a 12 semanas, por exemplo, testes de Campo Aberto, RAWn e Barnes Maze, e camundongos atingindo os critérios de atividade e aprendizagem/memória são incluídos no seguimento. Déficits comportamentais são novamente medidos na idade de 38, 39 e 40 semanas e o peso corpóreo é registrado. Camundongos que não atingem os critérios para o protocolo de estudo serão sacrificados. No ponto de equivalência com 41 semanas de idade, os animais serão submetidos à eutanásia e os cérebros serão processados para análises bioquímicas e imunohistológicas quanto a níveis e depósitos de amiloide beta solúvel e insolúvel. O soro é coletado pré-dosagem, durante a dosagem e no ponto de equivalência para PK na idade de 10, 25 e 41 semanas. Seções de tecido do sistema nervoso central (CNS) de animais em diferentes estágios de doença podem ser submetidas à imunocoloração para fibrinogênio, de modo que possam ser utilizadas como marcadores para o rompimento da BBB.

[00170]Muitas modificações e outras formas de realização das invenções apresentadas aqui virão à mente de uma pessoa habilitada na técnica à qual estas invenções pertencem tendo o benefício dos ensinamentos apresentados nas descrições precedentes e nos desenhos associados. Portanto, deve ser entendido que as invenções não devem ser limitadas às formas de realização específicas divulgadas e que modificações e outras formas de realização são intencionadas a ser incluídas dentro do escopo das reivindicações anexas e lista de formas de realização aqui divulgadas. Embora termos específicos sejam aqui utilizados, eles são utilizados em um sentido genérico e descritivo apenas e não para propósitos de limitação.

REIVINDICAÇÕES

1. Uso de uma quantidade eficaz de um anticorpo isolado ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo que se liga especificamente à semaforina-4D (SEMA4D), **CARACTERIZADO** pelo fato de que é para a fabricação de um medicamento para diminuir permeabilidade da barreira hematoencefálica em um indivíduo com permeabilidade da barreira hematoencefálica aumentada e um transtorno neuroinflamatório, em que o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo inibe a interação de SEMA4D com o receptor de SEMA4D, Plexina-B1, e em que o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo compreende uma cadeia pesada variável (VH) que compreende VHCDRs 1 a 3 compreendendo as SEQ ID NOs 6, 7 e 8, respectivamente, e uma cadeia leve variável (VL) que compreende VLCDRs 1 a 3 compreendendo as SEQ ID NOs 14, 15 e 16, respectivamente.

2. Uso, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o indivíduo é um mamífero.

3. Uso, de acordo com a reivindicação 2, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o mamífero é um humano.

4. Uso, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo inibe competitivamente um anticorpo monoclonal de referência compreendendo: 1) a sequência de aminoácidos da cadeia pesada variável (VH) de SEQ ID NO: 9 e a sequência de aminoácidos da cadeia leve variável (VL) de SEQ ID NO: 17, ou 2) a sequência de aminoácidos da VH de SEQ ID NO: 10 e a sequência de aminoácidos da VL de SEQ ID NO: 18.

5. Uso, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo se liga especificamente ao mesmo epítopo SEMA4D que um anticorpo monoclonal de referência que compreende: 1) a sequência de aminoácidos da cadeia pesada variável (VH) de SEQ ID NO: 9 e a sequência de aminoácidos da cadeia leve variável (VL) de SEQ ID NO: 17, ou

2) a sequência de aminoácidos da VH de SEQ ID NO: 10 e a sequência de aminoácidos da VL de SEQ ID NO: 18.

6. Uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo inibe competitivamente um anticorpo monoclonal de referência selecionado a partir do grupo que consiste em VX15/2503 ou 67 de se ligar especificamente à SEMA4D.

7. Uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo se liga especificamente ao mesmo epítipo de SEMA4D como um anticorpo monoclonal de referência selecionado a partir do grupo que consiste em VX15/2503 ou 67.

8. Uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 7, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o transtorno neuroinflamatório é selecionado a partir do grupo que consiste em Esclerose Múltipla, Esclerose Lateral Amiotrófica, epilepsia, Doença de Alzheimer, Doença de Parkinson, meningite, edema cerebral e trauma cerebral.

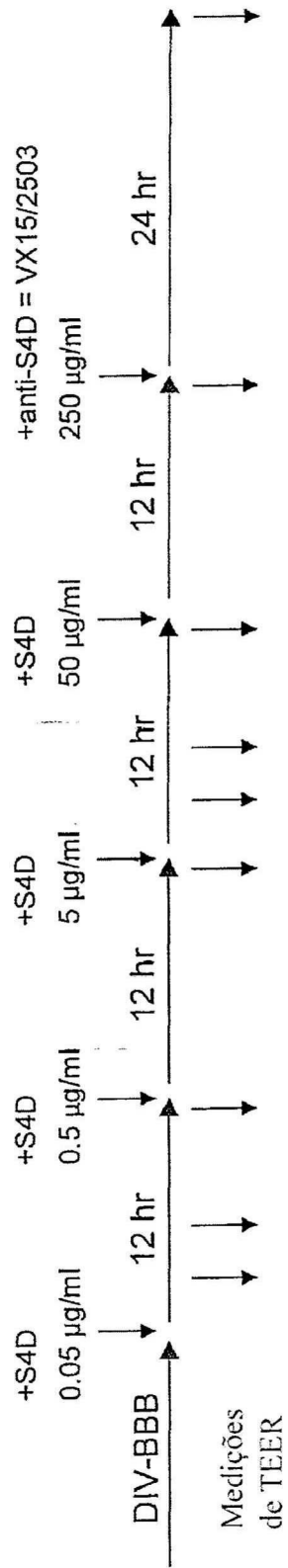


FIG. 1

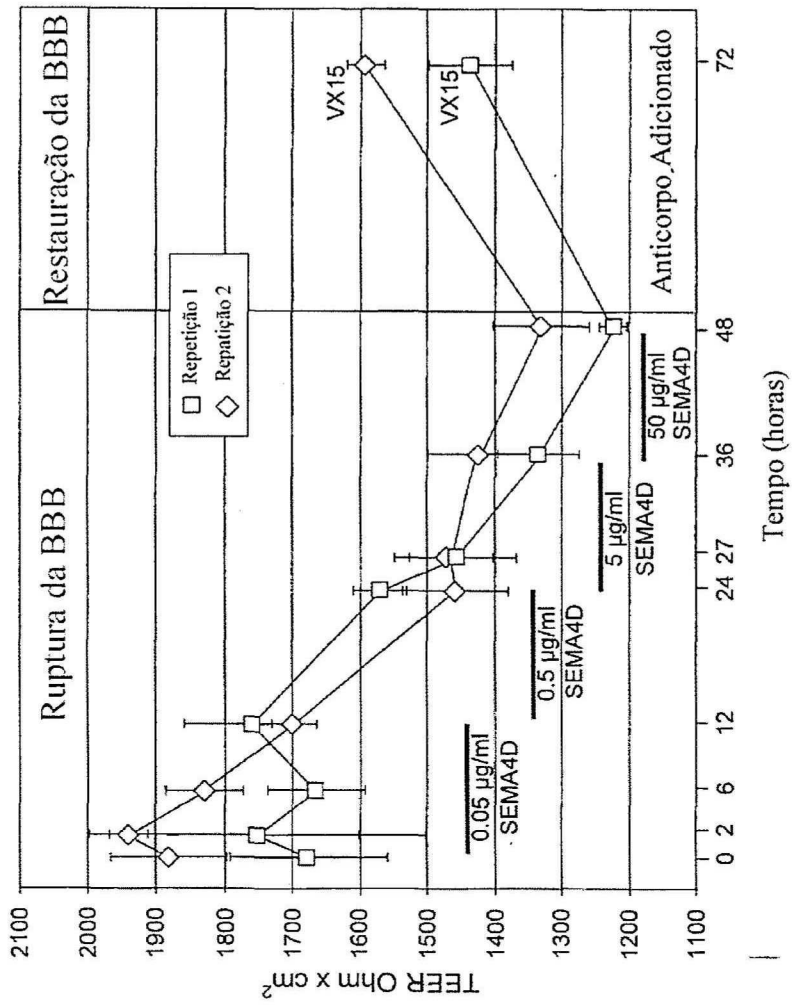


FIG. 2

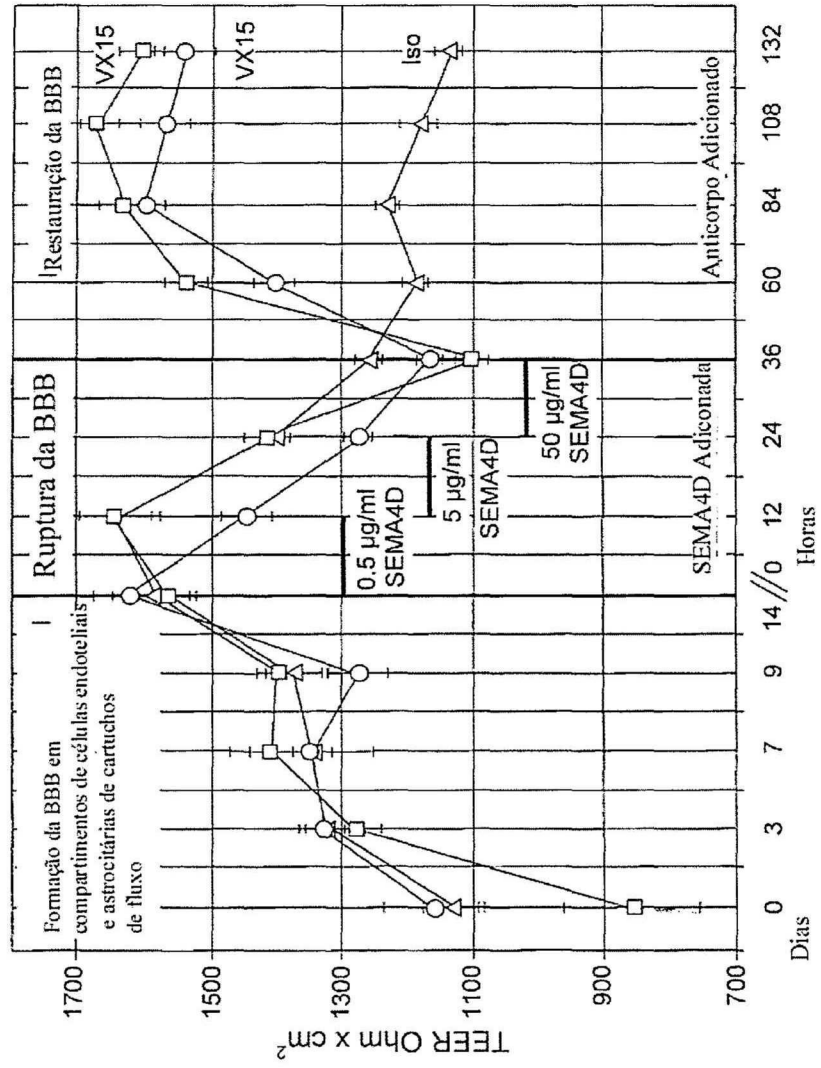


FIG. 3

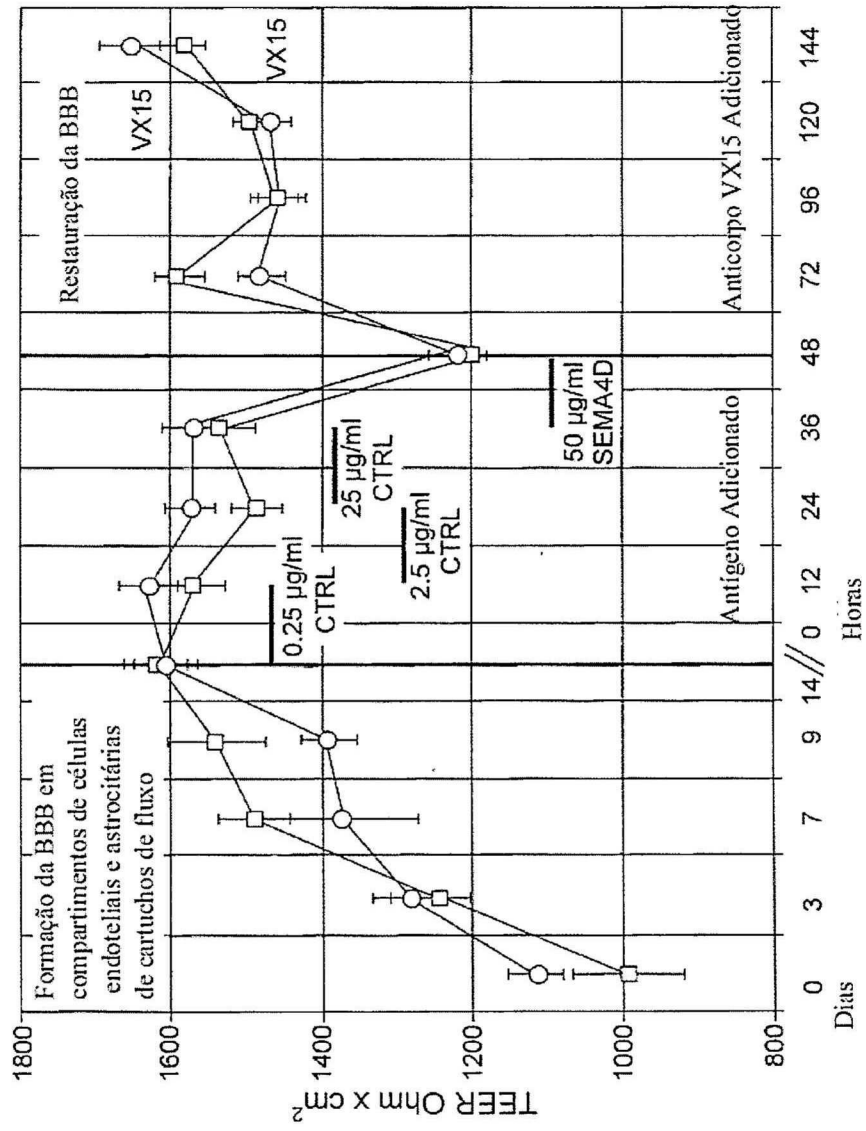


FIG. 4

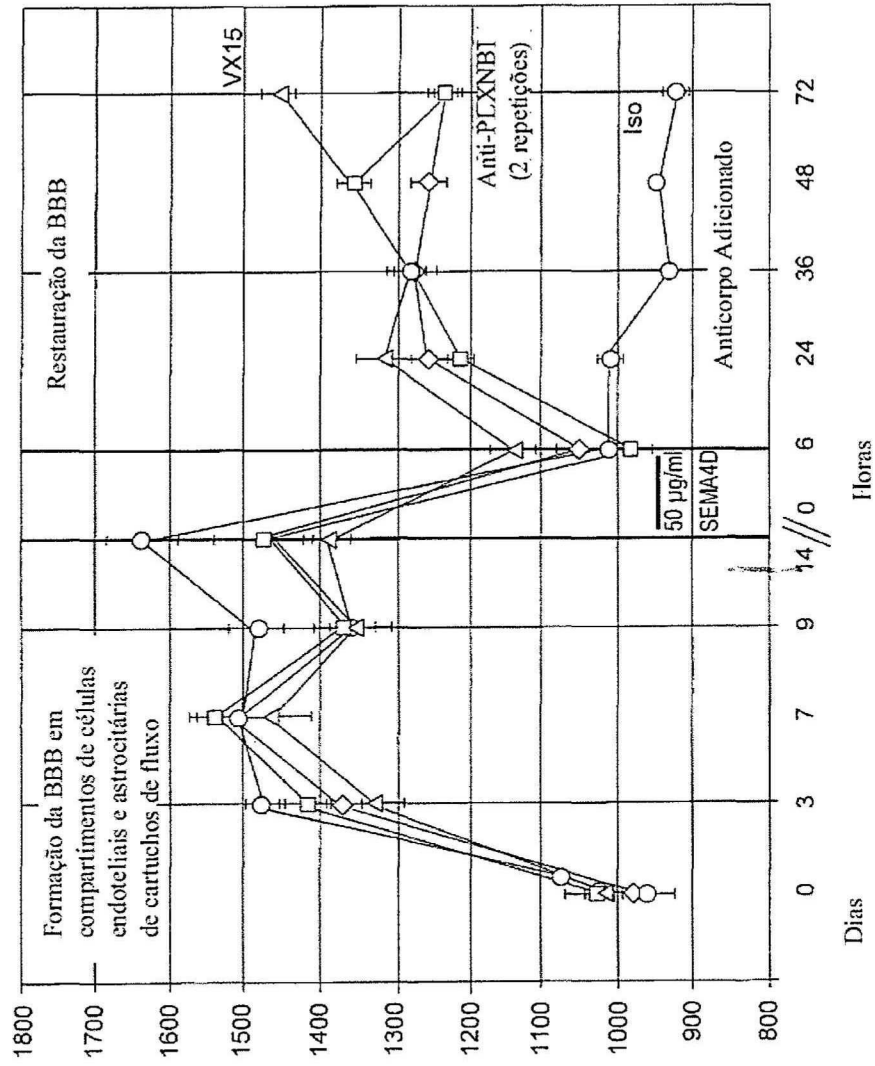


FIG. 5

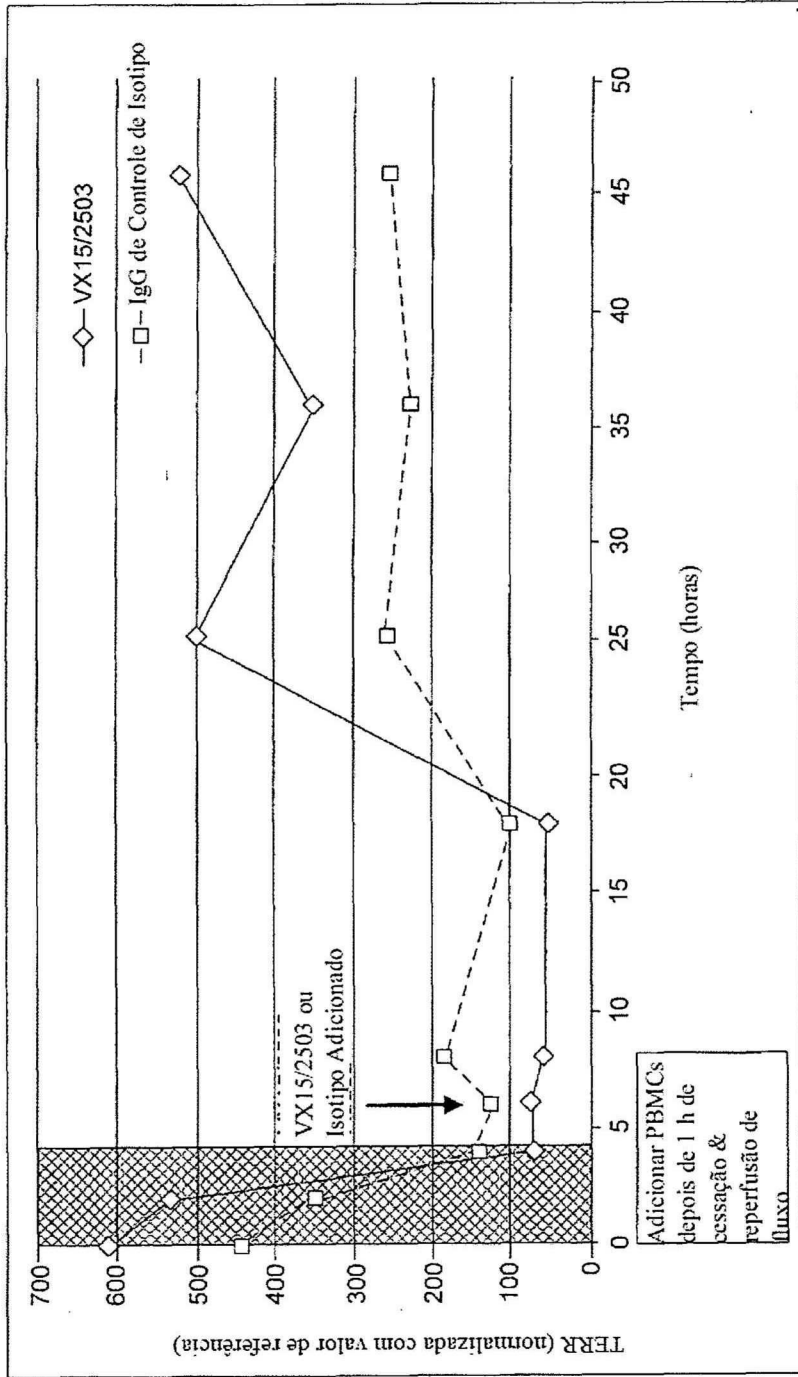
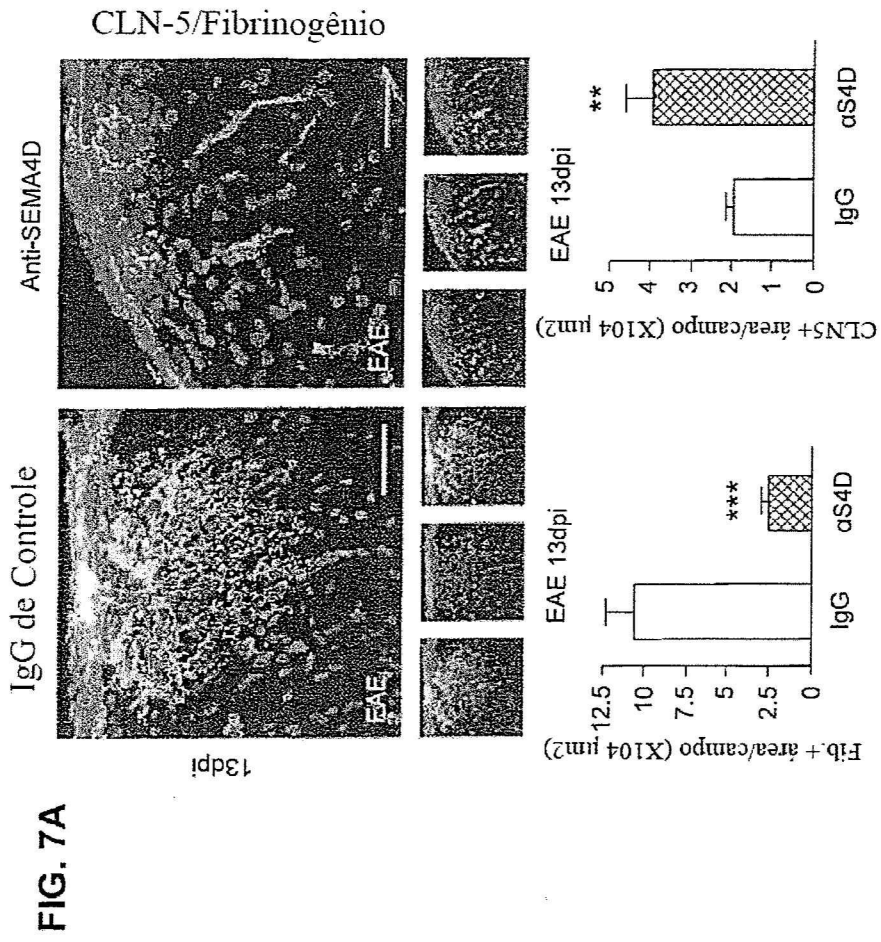


FIG. 6



Endotélio do CNS de Camundongo

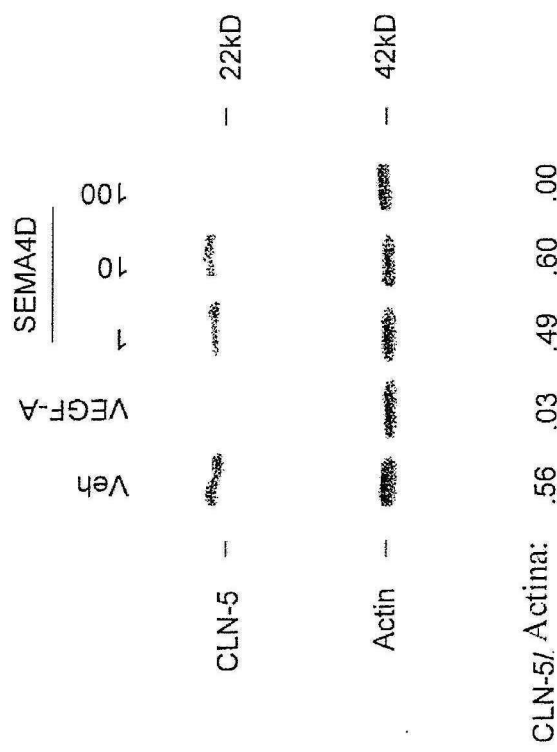


FIG. 8