(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110105452 A
(43)申请公布日 2019.08.09

(21)申请号 201910351743.6

(22)申请日 2012.10.11

(30)优先权数据
61/545,809 2011.10.11 US
61/555,726 2011.11.04 US
61/593,641 2012.02.01 US

(62)分案原申请数据
201280059376.9 2012.10.11

(71)申请人 瓦西尼斯公司
地址 美国纽约州

(72)发明人 E·S·史密斯 M·佐德勒

(74)专利代理机构 北京市金杜律师事务所 11256
代理人 陈文平 徐志明

(51)Int.Cl.
C07K 16/28(2006.01)
A61K 39/395(2006.01)
A61P 25/00(2006.01)

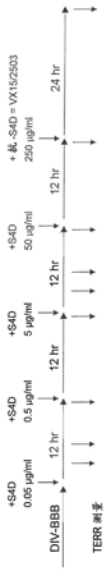
权利要求书1页 说明书31页
序列表30页 附图8页

(54)发明名称

臂板蛋白-4D结合分子用于调节血脑屏障渗透性的用途

(57)摘要

本文提供了臂板蛋白-4D结合分子用于调节血脑屏障渗透性的用途。具体而言，本文涉及与臂板蛋白-4D特异性结合的分离的抗体或其抗原结合片段在制备用于降低受试者中血脑屏障渗透性的药物中的用途，或在制备用于维持或提高受试者中闭合蛋白-5表达的药物中的用途，所述受试者具有与脑水肿相关的提高的血脑屏障渗透性。



CN 110105452 A

1.与臂板蛋白-4D(SEMA4D)特异性结合的分离的抗体或其抗原结合片段在制备用于降低受试者中血脑屏障渗透性的药物中的用途,所述受试者具有与脑水肿相关的提高的血脑屏障渗透性,其中所述抗体或其抗原结合片段包括可变重链(VH)和可变轻链(VL),所述可变重链包括分别包含SEQ ID NO:6、7和8的VHCDR1-3,且所述可变轻链包括分别包含SEQ ID NO:14、15和16的VLCDR1-3。

2.与臂板蛋白-4D(SEMA4D)特异性结合的分离的抗体或其抗原结合片段在制备用于维持或提高受试者中闭合蛋白-5表达的药物中的用途,所述受试者具有与脑水肿相关的提高的血脑屏障渗透性,其中所述抗体或其抗原结合片段包括可变重链(VH)和可变轻链(VL),所述可变重链包括分别包含SEQ ID NO:6、7和8的VHCDR1-3,且所述可变轻链包括分别包含SEQ ID NO:14、15和16的VLCDR1-3。

3.权利要求1或2的用途,其中所述抗体或其抗原结合片段抑制SEMA4D与神经丛蛋白-B1的相互作用。

4.权利要求1-3之一的用途,其中所述VH和VL分别包含SEQ ID NO:9和SEQ ID NO:17,或者SEQ ID NO:10和SEQ ID NO:18。

5.权利要求1-4之一的用途,其中所述抗体或其抗原结合片段引起血脑屏障的抗体增加、血脑屏障中存在的内皮细胞的数量、密度或浓度增加、内皮细胞或星形胶质细胞之间相互作用改变、形成血脑屏障的内皮细胞和星形胶质细胞之间的相互作用改变,或其任意组合。

6.权利要求1-5之一的用途,其中所述抗体或其抗原结合片段调节以下活动中的一种或多种:B细胞激活、聚集和存活;CD40诱导的增殖和抗体产生;对T细胞依赖性抗原的抗体应答;T细胞或其他免疫细胞增殖;树突细胞成熟;脱髓鞘和轴突变性;多能神经前体和/或少突细胞的凋亡;内皮细胞迁移的诱导;自发性单核细胞迁移的抑制;与细胞表面神经丛蛋白-B1或其他受体的结合。

臂板蛋白-4D结合分子用于调节血脑屏障渗透性的用途

[0001] 本申请是2012年10月11日提交的名称为“臂板蛋白-4D结合分子用于调节血脑屏障渗透性的用途”的中国专利申请第201280059376.9的分案申请。

[0002] 电子提交的序列表的引用

[0003] 与本申请一起提交的ASCII文本文件(文件名:“1843_068PC03_SequenceListing_ascii.txt”,大小:33,807字节;以及创建日期:2012年10月10日)中电子提交的序列表的内容按引用全部并入本文中。

[0004] 发明背景

[0005] 臂板蛋白(Semaphorin)4D(SEMA4D),也称为CD100,是属于臂板蛋白基因家族的跨膜蛋白(例如,SEQ ID NO:1(人);SEQ ID NO:2(鼠))。SEMA4D在细胞表面上表达为同型二聚体,但在细胞激活时,SEMA4D可以经由蛋白水解分裂从细胞表面释放以产生sSEMA4D,蛋白质的可溶形式,其也是生物活性的。参见Suzuki等,Nature Rev.Immunol.3:159-167(2003);Kikutani等,Nature Immunol.9:17-23(2008)。

[0006] SEMA4D在包括脾脏、胸腺和淋巴结的淋巴器官以及如脑、心脏和肾脏的非淋巴器官中高水平地表达。在淋巴器官中,SEMA4D在静息T细胞上大量表达,但在静息B细胞和抗原呈递细胞(APC)(如,树突细胞(DC))上只是弱表达。然而,通过各种免疫刺激激活后,这些细胞中的SEMA4D表达上调。通过细胞激活也提高了可溶性SEMA4D从免疫细胞的释放。

[0007] SEMA4D涉及神经退行性疾病、自体免疫疾病、脱髓鞘疾病和特定癌症的发生。尽管SEMA4D通过其受体(例如,神经丛蛋白(Plexin)-B1)的信号传导对血管生成的作用是公认的,但SEMA4D信号传导对血脑屏障(BBB)的作用仍然不清楚。这是重要的,因为BBB渗透性的改变对脑组织和功能具有深远的影响。因此,对用于由BBB破坏导致的神经炎性疾病的治疗仍然存在需求,并且特别是对抑制、阻止、防止、逆转或减缓BBB破坏的治疗剂的需求。

[0008] 发明简述

[0009] 本文中公开了使用臂板蛋白-4d结合分子调节血脑屏障渗透性的方法。呈现了证明SEAM4D可以损害BBB的完整性从而提高其渗透性的证据。根据本文中说明的本发明的方面,提供了一种用于降低患有神经炎性疾病的受试者的血脑屏障渗透性的方法,包括将有效量的与臂板蛋白-4D(SEMA4D)特异性结合的分离的结合分子施用于受试者,由此降低受试者的血脑屏障渗透性。

[0010] 根据本文中说明的方面,提供了一种维持或提高患有神经炎性疾病的受试者中闭合蛋白(Claudin)-5的表达的方法,包括将有效量的与臂板蛋白-4D(SEMA4D)特异性结合的分离的结合分子施用于受试者,其中该结合分子维持或提高受试者的闭合蛋白-5的表达。

[0011] 根据本文中说明的方面,提供了一种降低患有神经炎性疾病的受试者的血脑屏障渗透性的方法,包括将有效量的特异性抑制臂板蛋白-4D(SEMA4D)与SEMA4D受体相互作用的分离的结合分子施用于受试者,由此降低受试者的血脑屏障渗透性。

[0012] 根据本文中说明的方面,提供了一种治疗患有神经炎性疾病的受试者的方法,包括将有效量的特异性抑制臂板蛋白-4D(SEMA4D)与SEMA4D受体相互作用的分离的结合分子施用于受试者,其中该结合分子降低血脑屏障的渗透性,由此治疗受试者。

[0013] 根据本文中说明的方面，提供了一种降低患有神经炎性疾病的受试者中血脑屏障渗透性的方法，包括将有效量的与SEMA4D特异性结合的分离的结合分子施用于受试者，其中结合分子竞争性地抑制选自VX15/2503或67的参照单克隆抗体与SEMA4D的特异性结合。

[0014] 根据本文中说明的方面，提供了一种治疗患有神经炎性疾病的受试者的方法，包括将有效量的与臂板蛋白-4D(SEMA4D)特异性结合的分离的结合分子和与神经丛蛋白-B1特异性结合的分离的结合分子施用于受试者，其中SEMA4D和神经丛蛋白-B1结合分子降低血脑屏障的渗透性，由此治疗受试者。

[0015] 根据本文中说明的方面，提供了一种治疗患有神经炎性疾病的受试者的方法，包括将有效量的臂板蛋白4D(SEMA4D)与SEMA4D受体相互作用的抑制剂施用于受试者，其中所述抑制剂降低血脑屏障的渗透性，由此治疗受试者。

[0016] 附图简述

[0017] 图1:实施例中描述的动态体外BBB(“DIV-BBB”)实验方案的示意图。

[0018] 图2:体外DIV-BBB模型，显示出在重组SEMA4D(0.05、0.5、5或50μg/mL)和VX15/2503抗体(“VX15”)的存在下，以跨内皮电阻(TEER)反映的BBB完整性的测量。

[0019] 图3:体外DIV-BBB模型，显示出在BBB形成、重组SEMA4D(0.05、0.5、5或50μg/mL)存在下的BBB破坏以及VX15/2503抗体(“VX15”)存在下，但不存在同种型对照(“Iso”)的情况下的BBB恢复过程中，以跨内皮电阻(TEER)反映的BBB完整性的测量。

[0020] 图4:体外DIV-BBB模型，显示出在BBB形成，0.25、2.5或25μg/mL对照C35抗原(“CTRL”)或50μg/mL重组SEMA4D存在下的BBB破坏以及VX15/2503抗体(“VX15”)存在下的BBB恢复过程中，以跨内皮电阻(TEER)反映的BBB完整性的测量。

[0021] 图5:体外DIV-BBB模型，显示出在BBB形成、重组SEMA4D(50μg/mL)存在下的BBB破坏以及VX15/2503抗体(“VX15”)、抗-神经丛蛋白-B1抗体(“抗-PLXNB1”)存在下，但不存在同种型对照(“Iso”)的情况下BBB恢复过程中，以跨内皮电阻(TEER)反映的BBB完整性的测量。

[0022] 图6:体外DIV-BBB模型，显示出在BBB形成、在激活的PBMC(10^6/ml)存在下和流动停止情况下的BBB破坏以及在VX15/2503抗体或同种型对照IgG存在下的BBB恢复过程中，以跨内皮电阻(TEER)反映的BBB完整性的测量。

[0023] 图7A-C:来自体内EAE模型的结果，显示出用VX15/2503抗体(“抗-SEMA4D”)或同种型对照(“对照IgG”)处理后，通过纤维蛋白原(“Fib.+”)渗透至脑组织中的免疫染色反映的BBB完整性或其损失(7A左图和7B中的定量)以及通过红色染料检测的闭合蛋白-5(“CLN5+”)表达。

[0024] 图8:免疫印迹结果，显示出在原代小鼠中枢神经系统(CNS)内皮培养物中，与VEGF-A阳性对照相比，递增浓度的重组SEMA4D(1ng/ml、10ng/ml和100ng/ml)对关键内皮紧密连接蛋白闭合蛋白-5(“CLN-5”)表达的作用。

[0025] 发明详述

[0026] I.定义

[0027] 注意，术语“一”或“一个”实体是指一个或多个所述实体；例如，“一个抗-SEMA4D抗体”理解为表示一个或多个抗-SEMA4D抗体。因此，术语“一”(或“一个”)、“一个或多个”和“至少一个”在本文中可以互换使用。

[0028] 应当注意到术语“血脑屏障”和“BBB”可以互换使用。

[0029] 如本文中所用的,关于BBB的术语“破坏”或“破裂”,如“血脑屏障破坏”、“血脑屏障破裂”、“血脑屏障的破坏”或“血脑屏障的破裂”,是指血脑屏障渗透性的提高,或在“DIV-BBB”(人的动态体外BBB模型)的情况中,是指跨内皮电阻(TEER)的降低。McCallister等,Brain Res.904:20-30(2001);Santaguida等,Brain Res.1109:1-13(2006)和Cucullo等,Epilepsia 48:505-16(2007)已经表明在DIV-BBB中,在TEER和渗透性之间存在直接(逆)相关性。此外,血脑屏障渗透性的提高或电阻的降低可以是BBB上存在的内皮细胞的数量、密度和/或浓度降低的结果;或者是形成BBB的内皮细胞或星形细胞之中或内皮细胞和星形细胞之间的形态学或相互作用变化的结果。

[0030] 如本文中所用的,关于BBB的术语“恢复”,如“血脑屏障恢复”或“血脑屏障的恢复”,是指血脑屏障渗透性的降低,或者在DIV-BBB(人的动态体外BBB模型)的情况中,是指跨内皮电阻的提高。

[0031] 如本文中所用的,术语“神经炎性疾病”是指中枢神经系统(CNS)炎性疾病、神经退行性疾病、中枢神经系统的自体免疫疾病、髓磷脂疾病或影响少突细胞的疾病,或者中枢神经系统的创伤后髓磷脂疾病。应当注意,神经炎性疾病常常也是神经退行性疾病。然而,也可能有在不存在明显神经炎症的情况下的神经退行性疾病。例如,在晚期继发性进行性多发性硬化中就是这种情况。

[0032] 术语“治疗有效量”是指能有效“治疗”受试者或哺乳动物的疾病或失调的抗体、多肽、多核苷酸、小有机分子或其他药物的量。在神经炎性疾病的情况中,治疗有效量的药物可以降低BBB的渗透性;减少、延迟或停止BBB渗透性的提高;抑制,例如,阻止、延迟、防止、停止或逆转提高的BBB渗透性;提高BBB上存在的内皮细胞的数量、密度和/或浓度;改变内皮细胞的形态或功能;或改变形成BBB的内皮细胞或星形细胞中或内皮细胞和星形细胞之间的相互作用;一定程度上减轻一种或多种与提高的BBB渗透性相关的症状(例如,神经炎性疾病);降低发病率和死亡率;提高生活质量;或这些作用的组合。

[0033] 如“治疗”或“处理”或“待治疗”或“减轻”或“待减轻”是指1)治愈、减缓、减轻所诊断的病理状况或失调的症状,逆转和/或停止所诊断的病理状况或失调的进展的治疗性措施和2)防止和/或减缓目标病理状况或失调的发展的预防性或防止性措施。因此,需要的治疗对象包括已经患有疾病的那些;倾向于患有疾病的那些;和待预防该疾病的那些。有益或所需的临床结果包括,但不限于,症状的缓和、疾病程度的减轻、稳定的(即,没有恶化)疾病状态、延迟或减缓疾病进展、疾病状态的改善或减轻及好转(不管是部分的或是全部的),无论是可检测的或不可检测的。“治疗”还可以表示与未接受治疗的情况下预期的存活相比延长的存活。需要治疗的对象包括已经具有病症或失调的那些以及倾向于具有病症或失调的那些或待防止病症或失调的那些。

[0034] “受试者”或“个体”或“动物”或“患者”或“哺乳动物”表示其需要诊断、预后或治疗的任何受试者,特别是哺乳动物受试者。哺乳动物受试者包括人、家畜、农畜和动物园、运动或宠物动物,如狗、猫、豚鼠、兔、大鼠、小鼠、马、牛、奶牛、熊等。

[0035] 如本文中所用的,如“将受益于抗-SEMA4D抗体施用的受试者”和“需要治疗的动物”的短语包括受益于抗-SEMA4D抗体或用于例如检测SEMA4D多肽(例如,用于诊断程序)的其他SEMA4D结合分子的施用和/或受益于用抗-SEMA4D抗体或其他SEMA4D结合分子的治疗

(即,疾病的减轻或预防)的受试者,如哺乳动物受试者。

[0036] 本发明的“结合分子”或“抗原结合分子”以其最宽的含义来表示特异性结合抗原决定簇的分子。在一个实施方案中,结合分子特异性结合SEMA4D,例如,结合约150kDa的跨膜SEMA4D多肽或约120kDa的可溶性SEMA4D多肽(通常称为sSEMA4D)。在另一个实施方案中,本发明的结合分子是抗体或其抗原结合片段。在另一个实施方案中,本发明的结合分子包括抗体分子的至少一个重链或轻链CDR。在另一个实施方案中,本发明的结合分子包括来自一个或多个抗体分子的至少两个CDR。在另一个实施方案中,本发明的结合分子包括来自一个或多个抗体分子的至少三个CDR。在另一个实施方案中,本发明的结合分子包括来自一个或多个抗体分子的至少四个CDR。在另一个实施方案中,本发明的结合分子包括来自一个或多个抗体分子的至少五个CDR。在另一个实施方案中,本发明的结合分子包括来自一个或多个抗体分子的至少六个CDR。

[0037] 本申请涉及一种降低患有神经炎性疾病(例如,多发性硬化、肌萎缩性侧索硬化、癫痫、阿尔茨海默病、帕金森病、脑膜炎、脑水肿、脑创伤和中风)的受试者的血脑屏障渗透性的方法,包括将抗-SEMA4D结合分子、抗-神经丛蛋白B1结合分子或其组合施用于受试者。

[0038] 如本文中所用的,“抗-SEMA4D结合分子”或“抗-神经丛蛋白B1结合分子”是指抗体,或其抗原结合片段、变体或衍生物。除非特别指示完整抗体,如自然产生的抗体,否则术语“抗-SEMA4D抗体”或“抗-神经丛蛋白B1抗体”包括完整抗体以及这样的抗体的抗原结合片段、变体、类似物或衍生物,例如,天然产生的抗体或免疫球蛋白分子或者工程化的抗体分子或以与抗体分子相似的方式结合抗原的片段。

[0039] 如本文中所用的,“SEMA4D与SEMA4D受体相互作用的抑制剂”是指“抗-SEMA4D结合分子”、“抗-神经丛蛋白B1结合分子”以及SEMA4D或SEMA4D受体的小分子抑制剂。

[0040] 如本文中所用的,“人”或“完全人”抗体包括具有人免疫球蛋白的氨基酸序列的抗体,并且包括分离自人免疫球蛋白文库的抗体或分离自对一种或多种人免疫球蛋白是转基因的并且不表达内源性免疫球蛋白的动物的抗体,如下文所述,并且例如Kucherlapati等的U.S.专利No.5,939,598中所述。“人”或“完全人”抗体还包括含至少重链可变结构域或至少重链和轻链可变结构域的抗体,其中所述可变结构域具有人免疫球蛋白可变结构域的氨基酸序列。

[0041] “人”或“完全人”抗体还包括包含本文中所述的抗体分子的变体(包括衍生物)(例如,VH区和/或VL区)的如上所述的“人”或“完全人”抗体、基本上由本文中所述的抗体分子的变体(包括衍生物)(例如,VH区和/或VL区)组成的如上所述的“人”或“完全人”抗体或由本文中所述的抗体分子的变体(包括衍生物)(例如,VH区和/或VL区)组成的如上所述的“人”或“完全人”抗体,该抗体或其片段免疫特异性地结合SEMA4D多肽或者其片段或变体。可以使用本领域技术人员已知的标准技术在编码人抗SEMA4D抗体的核苷酸序列中引入突变,所述技术包括但不限于,导致氨基酸置换的定点诱变和PCR介导的诱变。优选地,相对于参照VH区、VHCDR1、VHCDR2、VHCDR3、VL区、VLCDR1、VLCDR2或VLCDR3,该变体(包括衍生物)编码少于50个氨基酸置换、少于40个氨基酸置换、少于30个氨基酸置换、少于25个氨基酸置换、少于20个氨基酸置换、少于15个氨基酸置换、少于10个氨基酸置换、少于5个氨基酸置换、少于4个氨基酸置换、少于3个氨基酸置换或少于2个氨基酸置换。

[0042] 在特定的实施方案中,氨基酸置换是保守性氨基酸置换,如以下进一步讨论的。或

者,可以沿着全部或部分编码序列随机引入突变,如通过饱和诱变,并且筛选所得到的突变体的生物活性以鉴定出保持活性(例如,结合SEMA4D多肽的能力,例如,人、鼠或人和鼠两者的SEMA4D)的突变体。这样的“人”或“完全人”抗体的变体(或其衍生物)也可以称为“优化的”或“针对抗原结合优化的”人或完全人抗体并且包括具有提高的抗原亲和性的抗体。

[0043] 术语“抗体”和“免疫球蛋白”在本文中可以互换使用。抗体或免疫球蛋白包含至少重链可变结构域,并且通常包含至少重链和轻链的可变结构域。脊椎动物系统中的基本免疫球蛋白结构是相对了解充分的。参见,例如,Harlow等(1988)Antibodies:A Laboratory Manual(抗体:实验室手册)(第2版;Cold Spring Harbor Laboratory Press)。

[0044] 如本文中所用的,术语“免疫球蛋白”包括可以生化区分的各种宽泛类型的多肽。本领域技术人员将认识到,重链分类为gamma、mu、alpha、delta或epsilon(γ、μ、α、δ、ε),其中还有一些亚类(例如,γ1-γ4)。该链的性质决定抗体“类别”分别为IgG、IgM、IgA、IgG或IgE。免疫球蛋白亚类(同种型),例如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1等已经得到充分表征,且已知造成功能特化。根据本文公开内容,本领域技术人员不难区分这些类别和同种型中各种的修饰形式,且因此,它们涵盖在本发明范围内。所有免疫球蛋白类别明显属于本发明的范围,以下讨论总体针对免疫球蛋白分子的IgG类。关于IgG,标准的免疫球蛋白分子包括分子量约为23,000道尔顿的两个相同轻链多肽和分子量为53,000-70,000的两个相同重链多肽。这四条链通常以“Y”构型通过二硫键连接起来,其中轻链从“Y”形的口部开始并延续通过可变区而与重链合在一起。

[0045] 轻链分类为kappa或lambda(κ、λ)。各重链类别可与任一κ或λ轻链结合。通常,在免疫球蛋白由杂交瘤、B细胞或遗传工程宿主细胞产生时,轻链和重链互相共价结合,且两条重链的“尾”部通过共价二硫键或非共价连接互相结合。在重链中,氨基酸序列从位于Y构型的分叉末端的N端延伸到各条链底部的C端。

[0046] 轻链和重链都可以分成结构和功能同源的区域。术语“恒定”和“可变”从功能意义使用。在这方面,应理解轻链(VL或VK)和重链(VH)部分的可变结构域决定抗原识别和特异性。相反,轻链(CL)和重链(CH1、CH2或CH3)的恒定结构域赋予重要的生物学特性,如分泌、跨胎盘移动、Fc受体结合、补体结合等。通常,随着离抗体的抗原结合位点或氨基末端越远,恒定区结构域的编号增大。N-端部分是可变区,C-端部分是恒定区;CH3和CL结构域实际上分别包括重链和轻链的羧基端。

[0047] 如上所示,可变区允许抗体选择性地识别和特异性地结合抗原上的表位。也就是说,抗体的VL结构域和VH结构域,或这些可变结构域内互补决定区(CDR)的子集组合形成限定三维抗原结合位点的可变区。这种四元抗体结构形成在Y形的每条臂末端存在的抗原结合位点。更具体地,所述抗原结合位点由各VH和VL链上的三个CDR确定。在一些情况下,例如,在源自骆驼种类或基于骆驼免疫球蛋白工程改造的某些免疫球蛋白分子中,完整的免疫球蛋白分子可以仅由重链构成而不含轻链。参见,例如,Hamers-Casterman等,Nature 363:446-448(1993)。

[0048] 在天然产生的抗体中,各个抗原结合结构域上存在的六个“互补决定区”或“CDR”是短的非连续的氨基酸序列,随着抗体在水性环境中确定其三维构型时,它们特别地定位以形成抗原结合结构域。抗原结合结构域中的其余氨基酸(称为“框架”区)显示出较小的分子间变异性。框架区主要采取β-折叠片构象,且CDR形成连接β-折叠片结构的,并且在某些

情况下,形成称为β-折叠片结构的部分的环。因此,框架区作用在于通过链间非共价相互作用提供CDR沿正确方向定位的支架。通过定位的CDR形成的抗原结合结构域限定与免疫反应性抗原上的表位互补的表面。这种互补表面促进了抗体与其关联表位的非共价结合。分别构成CDR和框架区的氨基酸可以由本领域普通技术人员对于任何给定的重链或轻链可变结构域容易地确定,因为它们已被精确定义(参见下文)。

[0049] 除非明确陈述是相反的,否则在本领域内所使用和/或接受的某一术语有两种或多种定义的情况下,本文所用的该术语定义应包括所有这些含义。具体实例是术语"互补决定区"("CDR")用于描述在重链和轻链多肽的可变区内发现的非连续抗原结合位点。这一特定区域由Kabat等(1983),美国卫生与公众服务部(U.S.Dept.of Health and Human Services),"Sequences of Proteins of Immunological Interest(具有免疫学意义的蛋白质的序列)"以及Chothia和Lesk,J.Mol.Biol.196:901-917(1987)描述,按引用将其并入本文中,其中所述定义在互相比较时包括重叠的氨基酸残基或氨基酸残基的子集。尽管如此,任一定义用于表示抗体或其变体的CDR的应用均应落入本文所定义和使用的术语范围内。包括上文引用的各参考文献中定义的CDR的合适氨基酸残基列于以下表1中以作比较。包括特定CDR的准确残基编号将根据CDR的序列和大小而变化。考虑到抗体的可变区氨基酸序列,本领域技术人员可以常规地确定哪些残基特定的CDR。

[0050] 表1.CDR定义[1]

[0051]

	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

[0052] [1]表1中所有CDR定义的编号均根据Kabat等所给出的编号规则(参见下文)。

[0053] Kabat等也定义了适用于任何抗体的可变结构域序列的编号系统。本领域普通技术人员能明确地将这一"Kabat编号"系统应用于任何可变区序列而不依赖序列本身以外的任何实验数据。本文所用的"Kabat编号"是指Kabat等(1983)美国卫生与公众服务部,"Sequences of Proteins of Immunological Interest(具有免疫学意义的蛋白质序列)"中所给出的编号系统。除非另有说明,本发明抗SEMA4D抗体或其抗原结合片段、变体或衍生物中具体氨基酸残基位置编号的指称均按照Kabat编号系统。

[0054] 本发明的抗体或其抗原结合片段、变体、或衍生物包括但不限于:多克隆抗体、单克隆抗体、多特异性和双特异性抗体(其中至少一个臂对于SEMA4D是特异性的)、人抗体、人源化抗体、灵长动物化(primatized)抗体或嵌合抗体、单链抗体、表位结合片段(例如,Fab、Fab'和$F(ab')_2$)、Fd、Fv、单链Fv(scFv)、二硫键连接的Fv(scFv)、包含VL或VH结构域的片段、由Fab表达文库产生的片段和抗独特型(抗-Id)抗体(包括,例如,本文公开的抗SEMA4D抗体的抗-Id抗体)。ScFv分子是本领域已知的,并且描述于例如美国专利号5,892,019中。本发明的免疫球蛋白或抗体分子可以是任何类型(例如,IgG、IgE、IgM、IgD、IgA和IgY)、类

别(例如,IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1和IgA2等)或亚类的免疫球蛋白分子。

[0055] 如本文中所用的,术语“重链部分”包括源自免疫球蛋白重链的氨基酸序列。在特定的实施方案中,包含重链部分的多肽包括以下至少一种:VH结构域、CH1结构域、铰链(例如,上部、中部和/或下部铰链区)结构域、CH2结构域、CH3结构域或者其变体或片段。例如,本发明所用的结合多肽可包括含有CH1结构域的多肽链;含有CH1结构域、至少一部分铰链结构域和CH2结构域的多肽链;含有CH1结构域和CH3结构域的多肽链;含有CH1结构域、至少一部分铰链区和CH3结构域的多肽链,或者含有CH1结构域、至少一部分铰链区、CH2结构域和CH3结构域的多肽链。在另一个实施方案中,本发明的多肽包括含有CH3结构域的多肽链。另外,本发明所用的结合多肽可能缺乏至少一部分CH2结构域(例如,全部或部分CH2结构域)。如上所述,本领域普通技术人员将理解,可以修饰这些结构域(例如,重链部分)以使得它们的氨基酸序列不同于天然产生的免疫球蛋白分子。

[0056] 在本文公开的某些抗SEMA4D抗体或其抗原结合片段、变体或衍生物中,多聚体的一条多肽链的重链部分与该多聚体的第二条多肽链上的那些相同。或者,本发明的含重链部分的单体是不同的。例如,各单体可包含不同的靶结合位点,从而形成例如双特异性抗体。

[0057] 本文公开的方法中所用的结合分子的重链部分可源自不同的免疫球蛋白分子。例如,多肽的重链部分可包含源自IgG1分子的C_{H1}结构域和源自IgG3分子的铰链区。在另一个实例中,重链部分可包含部分源自IgG1分子、部分源自IgG3分子的铰链区。在另一个实例中,重链部分可包含部分源自IgG1分子、部分源自IgG4分子的嵌合铰链。

[0058] 如本文中所用的,术语“轻链部分”包括源自免疫球蛋白轻链,例如,κ或λ轻链的氨基酸序列。优选地,所述轻链部分包含VL或CL结构域中的至少一个。

[0059] 本文所公开的抗SEMA4D抗体或其抗原结合片段、变体或衍生物可以根据它们识别或特异性结合的抗原(例如,本文所公开的靶多肽(例如,SEMA4D)的表位或部分进行描述或说明。与抗体的抗原结合结构域特异性相互作用的靶多肽部分是“表位”或“抗原决定簇”。靶多肽可包含单一表位,但通常包含至少两个表位,并可包括任意数目的表位,这取决于抗原的大小、构象和类型。此外,应该注意,靶多肽上的“表位”可以是或可包括非多肽成分,例如表位可包括糖侧链。

[0060] 据认为抗体的肽或多肽表位的最小尺寸是约四至五个氨基酸。肽或多肽表位优选包含至少七个,更优选至少九个,最优选至少约15至约30个氨基酸。由于CDR可以识别三级形式的抗原性肽或多肽,所以构成表位的氨基酸不必须是连续的,而是在某些情况下甚至可以不在同一肽链上。本发明的抗SEMA4D抗体识别的肽或多肽表位可以包含SEMA4D的至少4个、至少5个、至少6个、至少7个,更优选至少8个、至少9个、至少10个、至少15个、至少20个、至少25个或约15-约30个连续或非连续氨基酸的序列。

[0061] “特异性结合”通常指抗体通过其抗原结合结构域与表位结合,并且该结合需要抗原结合结构域和表位之间某种互补性。按照这一定义,抗体通过其抗原结合结构域结合某表位比结合随机的无关表位更容易时,该抗体称为“特异性结合”该表位。本文中使用术语“特异性”来定量某一抗体与某一表位结合的相对亲和性。例如,抗体“A”可认为对某给定表位的特异性高于抗体“B”,或者可以说抗体“A”结合表位“C”的特异性高于它对于相关表位“D”的特异性。

[0062] “优先结合”指相比于与相关、相似、同源或类似的表位的结合相比，抗体更容易特异性结合某表位。因此，与相关表位相比，“优先结合”给定表位的抗体更可能结合该表位，即便这种抗体可能与相关表位发生交叉反应。

[0063] 作为非限制性实例，如果抗体与第一表位结合的解离常数(K_D)小于抗体与第二表位的K_D，则可认为该抗体优先结合所述第一表位。在另一个非限制性实例中，如果抗体与第一表位结合的亲和力比抗体与第二表位的亲和力低至少一个数量级，则可认为该抗体优先结合第一抗原。在另一个非限制性实例中，如果抗体与第一表位结合的亲和力比抗体对第二表位的K_D低至少两个数量级，则可认为抗体优先结合第一表位。

[0064] 在另一个非限制性实例中，如果抗体与第一表位结合的解离速率(k(off))比抗体与第二表位的k(off)低，则可认为该抗体优先结合第一表位。在另一个非限制性实例中，如果抗体与第一表位结合的亲和力比抗体与第二表位的k(off)低至少一个数量级，则可认为该抗体优先结合第一表位。在另一个非限制性实例中，如果抗体与第一表位结合的亲和力比抗体与第二表位的k(off)低至少两个数量级，则可认为抗体优先结合第一表位。本文所述的抗体或其抗原结合片段、变体或衍生物可称为以低于或等于$5X10^{-2}s^{-1}$、$10^{-2}s^{-1}$或$5X10^{-3}s^{-1}$的解离速率(k(off))结合本文公开的靶多肽(例如，SEMA4D，例如，人、鼠或者人和鼠SEMA4D)或其片段或变体。更优选地，本发明的抗体可称为以低于或等于$5X10^{-4}s^{-1}$、$10^{-4}s^{-1}$、$5X10^{-5}s^{-1}$，或$10^{-5}s^{-1}$、$5X10^{-6}s^{-1}$、$10^{-6}s^{-1}$、$5X10^{-7}s^{-1}$或$10^{-7}s^{-1}$的解离速率(k(off))结合本文公开的靶多肽(例如，SEMA4D，例如，人、鼠或者人和鼠SEMA4D)或其片段或变体。

[0065] 本文公开的抗体或抗原结合片段、变体或衍生物可称为以高于或等于$10^{3}M^{-1}s^{-1}$、$5X10^{3}M^{-1}s^{-1}$、$10^{4}M^{-1}s^{-1}$或$5X10^{4}M^{-1}s^{-1}$的结合速率(k(on))结合本文公开的靶多肽(例如，SEMA4D，例如，人、鼠或者人和鼠SEMA4D)或其片段或变体。更优选地，本发明的抗体可称为以高于或等于$10^{5}M^{-1}s^{-1}$、$5X10^{5}M^{-1}s^{-1}$、$10^{6}M^{-1}s^{-1}$或$5X10^{6}M^{-1}s^{-1}$或$10^{7}M^{-1}s^{-1}$的结合速率(k(on))结合本文公开的靶多肽(例如，SEMA4D，例如，人、鼠或者人和鼠SEMA4D)或其片段或变体。

[0066] 如果抗体优先结合给定表位达到阻断参照抗体与所述表位结合的程度，则认为该抗体竞争性抑制参照抗体与该表位的结合。竞争性抑制可以通过本领域已知的任何方法确定，例如竞争ELISA实验。抗体可以称为竞争性抑制参照抗体与给定表位的结合至少90％、至少80％、至少70％、至少60％或至少50％。

[0067] 本文中所用的术语“亲和力”是指单个表位与免疫球蛋白分子的CDR结合强度的量度。参见，例如，Harlow等(1988)Antibodies:A Laboratory Manual(抗体:实验室手册)Cold Spring Harbor Laboratory Press(冷泉港实验室出版社，第2版)，第27-28页。本文中所用的术语“亲合力”指免疫球蛋白群体和抗原之间的复合物的总体稳定性，即免疫球蛋白混合物与抗原的功能性结合强度。参见例如，Harlow，第29-34页。亲合力与群体中单个免疫球蛋白分子与特定表位的亲和性相关，也与免疫球蛋白分子和抗原的价态相关。例如，二价单克隆抗体与具有高度重复表位结构的抗原(例如聚合物)之间的相互作用是高亲合力的一个实例。

[0068] 本发明的抗SEMA4D抗体或其抗原结合片段、变体或衍生物也可以按照其交叉反应性来描述或说明。本文中所用的术语“交叉反应性”是指对某一种抗原具有特异性的抗体与第二种抗原发生反应的能力;它是两种不同抗原性物质之间相关度的量度。因此，如果抗体与诱导其形成的表位以外的其他表位结合，则其具有交叉反应性。交叉反应性表位通常含

有许多与诱导表位相同的互补性结构特征，且在某些情况下可以实际上比原始表位更适合。

[0069] 例如，某些抗体具有一定程度的交叉反应性，因为它们结合相关但不相同的表位，例如，与参照表位具有至少95％、至少90％、至少85％、至少80％、至少75％、至少70％、至少65％、至少60％、至少55％和至少50％同一性(如使用本领域已知的和本文中描述的方法计算的)的表位。如果抗体不结合与参照表位具有少于95％、少于90％、少于85％、少于80％、少于75％、少于70％、少于65％、少于60％、少于55％和少于50％同一性(如使用本领域已知的和本文中描述的方法计算的)的表位，则可以说该抗体具有很小或没有交叉反应性。如果抗体不结合某表位的任何其它类似物、直系同源物或同源物，则可认为该抗体对该特定表位是“高度特异性的”。

[0070] 本发明的抗SEMA4D结合分子，例如，抗体或其抗原结合片段、变体或衍生物，可以根据其与本发明多肽(例如SEMA4D，例如，人、鼠或者人和鼠的SEMA4D)的结合亲和力进行描述或说明。优选的结合亲和力包括解离常数或Kd低于$5x10^{-2}$M、10^{-2}M、$5x10^{-3}$M、10^{-3}M、$5x10^{-4}$M、10^{-4}M、$5x10^{-5}$M、10^{-5}M、$5x10^{-6}$M、10^{-6}M、$5x10^{-7}$M、10^{-7}M、$5x10^{-8}$M、10^{-8}M、$5x10^{-9}$M、10^{-9}M、$5x10^{-10}$M、10^{-10}M、$5x10^{-11}$M、10^{-11}M、$5x10^{-12}$M、10^{-12}M、$5x10^{-13}$M、10^{-13}M、$5x10^{-14}$M、10^{-14}M、$5x10^{-15}$M或10^{-15}M的那些。在特定的实施方案中，本发明的抗SEMA4D结合分子，例如，抗体或其抗原结合片段，以约$5x10^{-9}$M至约$6x10^{-9}$M的Kd结合人SEMA4D。在另一个实施方案中，本发明的抗SEMA4D结合分子，例如，抗体或其抗原结合片段，以约$1x10^{-9}$M至约$2x10^{-9}$M的Kd结合鼠SEMA4D。

[0071] 本文中所用的术语“嵌合抗体”将用来表示其中免疫反应性区域或位点获自或源自第一物种而恒定区(根据本发明，其可以是完整的、部分的或修饰的)获自第二物种的任何抗体，。在优选的实施方案中，靶结合区域或位点来自非人来源(例如，小鼠或灵长类动物)，而恒定区是人的。

[0072] 本文中所用的术语“工程化抗体”指其中通过从具有已知特异性的抗体至少部分替换一个或多个CDR和必要时通过部分框架区置换和序列变化，来改变重链或轻链或二者的可变结构域的抗体。尽管CDR可以源自与框架区所来源的抗体属于相同的类别或甚至亚类的抗体，但设想CDR将源自不同类别的抗体，优选源自不同物种的抗体。将其中来自具有已知特异性的非人抗体的一个或多个“供体”CDR嫁接到人重链或轻链框架区中的工程化抗体在本文中称为“人源化抗体”。可能不必要用来自供体可变区的完整CDR来替换所有CDR以将一个可变结构域的抗原结合能力转移至另一可变结构域。相反，可能只需要转移对于维持靶结合位点的活性所必需的那些残基。

[0073] 进一步认识到，人源化抗体的重链或轻链或二者的可变结构域内的框架区可以仅包含人来源的残基，在这种情况下人源化抗体的这些框架区称为“完全人框架区”(例如，MAb VX15/2503，作为MAb 2503公开于美国专利申请公开号US 2010/0285036 A1中，按引用将其全部并入本文中)。或者，如果必需，供体可变结构域的框架区的一个或多个残基可以在人源化抗体的重链或轻链或二者的可变结构域的人框架区的相应位置内进行工程化改造以维持与SEMA4D抗原的正确结合或增强与SEMA4D抗原的结合。因此，以此方式工程化改造的人框架区包含人和供体框架区残基的混合，且在本文中称为“部分人框架区”。

[0074] 例如，抗SEMA4D抗体的人源化可以基本按照Winter和其同事的方法(Jones等，Nature 321:522-525(1986)；Riechmann等，Nature 332:323-327(1988)；Verhoeyen等，

Science 239:1534-1536(1988)),通过用啮齿动物的或突变的啮齿动物CDR或CDR序列取代人抗SEMA4D抗体的相应序列而进行。也参见美国专利号5,225,539;5,585,089;5,693,761;5,693,762和5,859,205;其按引用并入本文中。所得到的人源化抗SEMA4D抗体在人源化抗体的重链和/或轻链可变结构域的完全人框架区内包含至少一个啮齿动物或突变的啮齿动物CDR。在一些情况下,人源化抗SEMA4D抗体的一个或多个可变结构域的框架区内的残基被相应的非人(例如,啮齿动物)残基代替(参见例如,美国专利号5,585,089;5,693,761;5,693,762和6,180,370),在这种情况下,所得到的人源化抗SEMA4D抗体将在重链和/或轻链的可变结构域内包含部分人框架区。

[0075] 此外,人源化抗体可以包含在接受体抗体或供体抗体中未发现的残基。进行这些修饰以进一步优化抗体性能(例如,以获得所需亲和力)。通常,人源化抗体将包含基本上全部的至少一个,并且通常两个可变结构域,其中全部或基本上全部的CDR对应于非人免疫球蛋白的CDR,并且全部或基本上全部的框架区是人免疫球蛋白序列的框架区。人源化抗体任选还包含至少一部分免疫球蛋白恒定区(Fc),一般是人免疫球蛋白的免疫球蛋白恒定区。更多的详细内容参见Jones等,Nature 331:522-525(1986);Riechmann等,Nature332:323-329(1988);和Presta,Curr.Op.Struct.Biol.,2:593-596(1992);其按引用并入本文中。因此,这样的"人源化"抗体可以包括其中显著不完整的人可变结构域被来自非人物种的相应序列所取代的抗体。实践中,人源化抗体通常是其中一些CDR残基和可能的一些框架残基被来自啮齿动物抗体中相似位点的残基所取代的人抗体。参见,例如,美国专利号5,225,539;5,585,089;5,693,761;5,693,762和5,859,205。也参见美国专利号6,180,370和国际公开号WO01/27160,其中公开了人源化抗体和用于产生对预定抗原具有提高的亲和性的人源化抗体的技术。

[0076] II.血脑屏障("BBB")

[0077] 血脑屏障(BBB)是循环血和中枢神经系统(CNS)之间的活性界面。BBB限制不同物质在两个区室之间的自由移动,并且在维持CNS的体内平衡中起着关键作用。BBB同时具有屏障功能和载体功能。作为屏障,BBB限制细胞和潜在毒性或有害的物质从血液移动至脑部。另一方面,作为载体,BBB负责将营养物质转运到脑部并移除代谢物。

[0078] BBB主要由三种组分构成:内皮细胞、星形细胞和周细胞。内皮细胞形成覆盖脑中的毛细血管和血管内表面的连续片层(Ransohoff等,"Three or More Routes for Leukocyte Migration Into the Central Nervous System,"Nature Rev.Immun.3:569-581(2003))。内皮细胞位于主要由胶原蛋白IV、纤连蛋白、层粘连蛋白和蛋白聚糖组成的基底膜附近,并且由在细胞的顶部区域形成带样结构的紧密连接互相连接。内皮细胞限制微小物体(例如,细菌)和大的或亲水性分子扩散至脑实质和脑脊髓液(CSF)中,同时允许小的疏水性分子(O_2、激素、CO_2)扩散。该屏障的细胞利用特定的蛋白质主动地运送代谢产物(如,葡糖糖)穿过该屏障。

[0079] 形成脑毛细血管的内皮细胞不同于身体的其他组织中发现的那些。脑毛细血管内皮细胞通过紧密的细胞间连接接合在一起,该紧密的细胞间连接形成对抗分子从血液至脑和CNS其他部分(包括脑脊髓液,CSF)的被动扩散的连续壁。这些细胞的不同之处还在于它们很少具有胞饮囊泡,这在其他组织中允许一定程度的非选择性的跨毛细管壁转运。还缺乏允许非限制性通过的在细胞之间延伸的连续间隙或通道。

[0080] 除了内皮细胞，BBB还由周细胞和星形细胞构成。周细胞位于基底膜内，与内皮细胞相互作用并且在内皮增殖、血管生成和炎性过程的调控中起着重要作用。星形细胞是脑和脊髓中特征性的星形胶质细胞，并且是人脑中最丰富的细胞。它们执行许多功能，包括作为形成血脑屏障的内皮细胞的生化载体、对神经组织提供营养物质、维持细胞外离子平衡以及在脑和脊髓创伤损伤后的修复和结疤过程中发挥作用。

[0081] 血脑屏障发挥作用以确保大脑环境受到稳定控制。血液中各种物质(如激素、氨基酸和离子)的水平经历频繁的小的波动，其可能是由活动(如，进食和锻炼)引起的(Goldstein等，"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))。如果脑没有受到血脑屏障保护以对抗血清组成中的这些变化，那么结果将是不受控制的神经活动。

[0082] 大脑与血流的隔离是不完全的。如果大脑与血流是完全隔离的，脑将由于缺乏营养物质并且由于需要与身体的其他部分交换化学物质而不能正常发挥功能。毛细血管内皮细胞内特定转运系统的存在确保了脑以受控的方式接受正常生长和功能需要的所有化合物。在许多情况中，这些转运系统由膜相关蛋白组成，其选择性地结合和转运特定分子跨过屏障膜。这些转运蛋白称为溶质载体转运蛋白。

[0083] 尽管BBB用于保护脑和中枢神经系统免受外源或外部分子和细胞的损害，但外源或外部分子和细胞常常可以跨越BBB，并且以有限的数量甚至可能是有益的，如，对于CNS的免疫监视。然而，当高活性细胞，如，例如，B细胞、T细胞、白细胞和巨噬细胞，过量地跨过BBB并且到达脑时，它们可以引起大脑的损害。例如，患有水肿、脑创伤、中风和多发性硬化的病人表现出BBB的损坏。

[0084] 已经研究了BBB在各种神经炎性疾病中的作用(Zlokovic BV,“The Blood-Brain Barrier in Health and Chronic Neurodegenerative Disorders,”Neuron57:178-201(2008)；Zhong Z等，“ALS-causing SOD1mutants generate vascular changes prior to motor neuron degeneration,”Nature Neuroscience 11(4):420-422(2008)；Hawkins BT等，“The Blood-Brain Barrier/neurovascular Unit in Health and Disease,”Pharmacological Rev 57(2):173-185(2005)；Oby E等，“The Blood-Brain Barrier and Epilepsy,”Epilepsia 47(11);1761-1774(2006))。此外，存在越来越多关于炎症和血脑屏障(BBB)(Banks和Erickson,2010;Lochhead等,2010)涉及神经疾病如脑膜炎(van der等，2004)、脑水肿(Stamatovic等,2006)、阿尔茨海默病(Kalaria,1992)、帕金森病(Westin,J.E.等，“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))和多发性硬化(Minagar和Alexander,2003)的发病机理的证据。

[0085] 例如，在多发性硬化的情况中，已经使用核磁共振成像(“MRI”)证明，当人发生MS“发作”时，脑或脊髓片段中的BBB损坏，使得T淋巴细胞能够穿过并攻击保护和隔离脑和脊髓中的中枢神经系统神经元的髓磷脂(Zlokovic 2008;Waubant E.,"Biomarkers indicative of blood-brain barrier disruption in multiple sclerosis".Disease Markers 22(4):235-44(2006))。

[0086] 另一方面，当围绕脑和脊髓的膜(这些膜称为脑膜)存在炎症时产生了脑膜炎。当脑膜发炎时，血脑屏障被破坏，使得炎性细胞和各种物质(包括毒素或抗生素)进入脑(Beam,TR Jr.等，(1977年12月)，"Blood,brain,and cerebrospinal fluid concentrations of several antibiotics in rabbits with intact and inflamed meninges".Antimicrobial Agents and Chemotherapy 12(6):710-6)。

[0087] 相似地，在帕金森病(PD)的情况中，已经表明由于转运蛋白P-糖蛋白(P-gp)(其是介导摄入的毒性亲脂性代谢物的快速去除的ATP依赖性流出泵)的低活性，推定的PD毒素的吸收或代谢及其跨BBB的不完全消除，可能在PD的发病机理中起着作用(Kortekaas,R.,Leenders,K.L.,van Oostrom,J.C.,Vaalburg,W.,Bart,J.,Willemsen,A.T.和Hendrikse,N.H.Blood-brain barrier dysfunction in parkinsonian midbrain in vivo.Ann.Neurol.57,176-179,2005)。神经炎症在PD病人和PD的实验模型中也表现为普遍存在的发现。已经描述了吞噬细胞激活、提高的促炎性细胞因子合成和释放、补体激活、小胶质细胞的激活和活性氧物质(ROS)的释放(Whitton,P.S.Inflammation as a causative factor in the aetiology of Parkinson's disease.Br.J.Pharmacol.150,963-976,2007)。

[0088] 在癫痫中，研究已经表明由于常见的血液蛋白，白蛋白和星形细胞之间的特定相互作用，血脑屏障的功能障碍参与引发慢性或急性发作。这些发现表明急性发作是人为或炎性机制导致的BBB破坏的结果(Oby,E等(2006)."The Blood-Brain Barrier and Epilepsy"(PDF).Epilepsia 47(11):1761-1774)。

[0089] 在患有阿尔茨海默病(AD)的病人中，证据指向血脑屏障的破坏允许含有淀粉状蛋白β(Aβ)的血浆通过RAGE进入脑中，RAGE是Aβ跨过BBB的主要流入转运蛋白。研究已经表明Aβ/RAGE相互作用导致循环Aβ跨过BBB进入脑实质中的转胞吞(transcytosis)及其与神经元的结合、造成促炎性细胞因子分泌的NF-κB介导的内皮激活、粘附分子的表达以及内皮缩血管肽-1(其抑制CBF(脑血流量))的产生。此外，已经表明Aβ/RAGE相互作用通过产生对RAGE-表达神经元的氧化性损伤和通过激活小胶质细胞而造成神经元杀灭(Zlokovic,B.V.The Blood-Brain Barrier in Health and Chronic Neurodegenerative Disorders.Neuron 57,178-201,2008)。在AD发病的情况中也已经发现了Aβ错误地流出脑实质并经由BBB进入微脉管系统，并且部分归因于受损的低密度脂蛋白受体相关蛋白1(LRP1)功能。LRP1是结合和转运Aβ的不同结构构象体的远腔侧(abluminal)BBB膜蛋白(Deane等，"LRP/amyloid beta-peptide interaction mediates differential brain efflux of Abeta isoforms."Neuron 43,333-344,2004)。Aβ暴露将脑微血管内皮细胞上的紧密连接蛋白(包括闭合蛋白-5和ZO-2)的细胞表面表达模式转变为胞质(Marco等，"Amyloidβ-peptide 1-42alters tight junction protein distribution and expression in brain microvessel endothelial cells."Neurosci.Lett.401,219-224,2006)，并且严重地影响这些细胞的单层的跨内皮电阻(TEER)(Gonzalez-Velasquez等，"Soluble aggregates of the amyloid-beta protein selectively stimulate permeability in human brain microvascular endothelial monolayers."J.Neurochem.107,466-477,2008)。

[0090] 在肌萎缩性侧索硬化症(ALS)中，研究已经表明BBB破坏可以导致与运动神经元相互作用以产生ROS(活性氧物质)和启动自体免疫应答的血清蛋白的渗漏，从而引起脱髓鞘、

神经传递的破坏和细胞死亡(Zlokovic 2008)。

[0091] 最近的研究表明BBB的弱化可以由通过内皮细胞的VEGF-A受体介导的内皮细胞的紊乱引起(Argaw AT等,“VEGF-mediated disruption of endothelial CLN-5promotes blood-brain barrier breakdown,”PNAS 106(6):1977-1982(2009))。根据该研究,VEGF-A,其源自星形细胞,靶向并破坏内皮跨膜紧密连接蛋白闭合蛋白-5(CLN-5)和occludin(OCLN)两者的表达。随着CLN-5和OCLN两者表达的降低,BBB的破坏增加。

[0092] 如本文实例中所示,BBB弱化的另一种可能的机制是作为通过SEMA4D的神经丛蛋白-B1高亲和性(1nM)受体的内皮细胞紊乱的结果。神经丛蛋白-B1可以通过内皮细胞表达。在SEMA4-D的存在下,内皮细胞可以发生改变内皮细胞的形态或功能的转化,从而引起BBB的弱化,例如,通过紧密连接的改变。这种BBB弱化随后可以提高BBB对细胞和分子的渗透性,并且允许这些细胞和分子进入并改变脑和中枢神经系统的活性。因此,添加抗-SEMA4D或抗-神经丛蛋白-B1可以防止内皮细胞发生转化并减轻BBB的弱化。

[0093] III.靶多肽的描述

[0094] 如本文中所用的,术语“臂板蛋白-4D”、“SEMA4D”和“SEMA4D多肽”可以互换使用,“SEMA4D”和“Sema4D”也是如此。在特定的实施方案中,SEMA4D在细胞的表面上表面或由细胞分泌。在另一个实施方案中,SEMA4D是膜结合的。在另一个实施方案中,SEMA4D是可溶性的,例如,sSEMA4D。在其他实施方案中,SEMA4D可以包括全尺寸的SEMA4D或其片段,或者SEMA4D变体多肽,其中SEMA4D的片段或SEMA4D变体多肽保持全尺寸SEMA4D的一些或全部功能特性。

[0095] 全尺寸人SEMA4D蛋白是由两个150kDa的多肽链组成的同型二聚体跨膜蛋白。SEMA4D属于细胞表面受体的臂板蛋白家族,并且也称为CD100。人和小鼠SEMA4D/Sema4D从其跨膜形式蛋白水解切割以产生120-kDa可溶形式,表明存在两个种Sema4D异形体(Kumanogoh等,J.Cell Science 116(7):3464(2003))。臂板蛋白包括可溶的和膜结合的蛋白质,其最初限定为在发育过程中的轴突-指导因子(axonal-guidance factor),其在建立神经元与其合适靶标之间的精确连接中起着重要作用。从结构上考虑IV类臂板蛋白,全尺寸SEMA4D包括氨基端信号序列,接着为特征性的“Sema”结构域(其含有17个保守的半胱氨酸残基)、Ig-样结构域、富赖氨酸区段、疏水性跨膜区和细胞质尾。

[0096] SEMA4D的各多肽链包括约13个氨基酸的信号序列,接着是约512个氨基酸的臂板蛋白结构域、约65个氨基酸的免疫球蛋白-样(Ig-样)结构域、104个氨基酸的富赖氨酸区段、约19个氨基酸的疏水性跨膜区和110个氨基酸的细胞质尾。细胞质尾中用于酪氨酸磷酸化的共有位点支持预定的SEMA4D与酪氨酸激酶的关联(Schlossman等编辑,(1995)Leucocyte Typing V(Oxford University Press,Oxford))。

[0097] 已知SEMA4D具有至少两个受体。受体之一,神经丛蛋白-B1,在非淋巴组织中表达,并且已经显示出是SEMA4D的高亲和性(1nM)受体(Tamagnone等,Cell 99:71-80(1999))。神经丛蛋白-B1信号传导的SEMA4D刺激已经显示出诱导神经元的生长锥塌陷,并且诱导少突细胞的突起伸长破坏(process extension collapse)和细胞凋亡(Giraudon等,J.Immunol.172:1246-1255(2004);Giraudon等,NeuroMolecular Med.7:207-216(2005))。

[0098] 在淋巴组织中,CD72用作低亲和性(300nM)SEMA4D受体(Kumanogoh等,Immunity 13:621-631(2000))。B细胞和APC表达CD72,并且抗-CD72抗体具有许多与sSEMA4D相同的效

应，如CD40诱导的B细胞应答的增强和CD23的B细胞脱落。据认为CD72通过募集酪氨酸磷酸酶SHP-1而作为B细胞应答的负调节剂发挥作用，酪氨酸磷酸酶SHP-1可以与许多抑制性受体相关。SEMA4D与CD72的相互作用导致SHP-1的解离和这种负激活信号的丧失。SEMA4D已经显示出促进T细胞刺激及B细胞聚集和体外存活。加入SEMA4D-表达细胞或sSEMA4D在体外增强CD40诱导的B细胞增殖和免疫球蛋白产生，并且在体内加速抗体应答(Ishida等，Inter.Immunol.15:1027-1034(2003)；Kumanogoh和H.Kukutani,Trends in Immunol.22:670-676(2001))。sSEMA4D增强CD40诱导的DC成熟，包括共刺激分子的上调和IL-12分泌的增加。此外，sSEMA4D可以抑制免疫细胞迁移，这可以通过添加阻断抗-SEMA4D抗体来逆转(Elhabazi等，J.Immunol.166:4341-4347(2001)；Delaire等，J.Immunol.166:4348-4354(2001))。

[0099] Sema4D在淋巴器官(包括脾、胸腺和淋巴结)中以及在非淋巴器官(如脑、心脏和肾脏)中高水平地表达。在淋巴器官中，Sema4D在静息T细胞上大量地表达，但在静息B细胞和抗原呈递细胞(APC)(如，树突细胞(DC))上只是微弱地表达。细胞激活提高了SEMA4D的表面表达以及可溶性SEMA4D(sSEMA4D)的产生。

[0100] SEMA4D的表达模式表明其在免疫系统中起着重要的生理学作用以及病理学作用。SEMA4D已经显示出促进B细胞激活、聚集和存活；增强CD40-诱导的增殖和抗体产生；增强对T细胞依赖性抗原的抗体应答；增加T细胞增殖；增强树突细胞成熟和刺激T细胞的能力；并且直接参与脱髓鞘和轴突退化(Shi等，Immunity 13:633-642(2000)；Kumanogoh等，J Immunol 169:1175-1181(2002)；和Watanabe等，J Immunol 167:4321-4328(2001))。

[0101] SEMA4D敲除(SEMA4D-/-)小鼠提供了SEMA4D在体液和细胞免疫应答中起着重要作用的其他证据。在SEMA4D-/-小鼠的非淋巴组织中不存在已知的重大异常。来自SEMA4D-/-小鼠的树突细胞(DC)具有差的同种异体刺激(allostimulatory)能力，并且在共刺激分子表达中显示出缺陷，这可以通过加入sSEMA4D来拯救。SEMA4D缺陷(SEMA4D-/-)小鼠不能产生由髓磷脂少突细胞糖蛋白肽诱导的实验性自体免疫脑脊髓炎，因为在不存在SEMA4D的情况中，髓磷脂少突细胞糖蛋白特异性T细胞很少产生(Kumanogoh等，J Immunol 169:1175-1181(2002))。在自体免疫倾向的MRL/lpr小鼠(全身性自体免疫疾病如SLE的模型)的血清中也检测到显著量的可溶性SEMA4D，但在正常小鼠中没有检测到。此外，sSEMA4D的水平与自身抗体的水平相关并且随着年龄增加(Wang等，Blood 97:3498-3504(2001))。可溶性SEMA4D也已经显示出在患有脱髓鞘疾病的病人的脑脊液和血清中累积，并且sSEMA4D诱导人多能性神经前体(Dev细胞)的凋亡，而这两种情况都抑制突起伸长和在体外诱导大鼠少突细胞的凋亡(Giraudon等，J Immunol 172(2):1246-1255(2004))。这种凋亡通过抗-SEMA4D MAb来阻断。

[0102] IV.抗-SEMA4D抗体

[0103] 现有技术中已经描述了结合SEMA4D的抗体。参见，例如，美国公开号2008/0219971A1、US 2010/0285036A1和US 2006/0233793A1、国际专利申请WO 93/14125、WO 2008/100995和WO 2010/129917以及Herold等，Int.Immunol.7(1):1-8(1995)，将各篇文献全部按引用并入本文中。

[0104] 本申请一般地涉及一种降低患有神经炎性疾病(例如，CNS炎性疾病或神经退行性疾病)的受试者(例如，人患者)中血脑屏障渗透性的方法，包括施用特异性结合SEMA4D的抗

体或其抗原结合片段、变体或衍生物。在特定的实施方案中，抗体阻断了SEMA4D与其一种或多种受体(例如，神经丛蛋白-B1)的相互作用。具有这些特性的抗-SEMA4D抗体可以用于本文中提供的方法中。可以使用的抗体包括，但不限于MAb VX15/2503、67和76及其抗原结合片段、变体或衍生物，这些全部描述于US 2010/0285036 A1中。可以用于本文中提供的方法中的其他抗体包括US 2006/0233793 A1中描述的BD16和BB18抗体及其抗原结合片段、变体或衍生物；或US 2008/0219971 A1中描述的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和MAb 2285中的任一种，及其任何片段、变体或衍生物。在特定的实施方案中，用于本文中提供的方法中的抗-SEMA4D抗体结合人、鼠或人和鼠两者的SEMA4D。有用的还有结合与上述任一种抗体相同的表位的抗体和/或竞争性地抑制上述任一种抗体与SEMA4D结合的抗体。

[0105] 在特定的实施方案中，在本文提供的方法中有用的抗SEMA4D抗体或其抗原结合片段、变体或衍生物具有与参照抗SEMA4D抗体分子(例如，上面描述的那些)具有至少约80％、约85％、约88％、约89％、约90％、约91％、约92％、约93％、约94％或约95％序列同一性的氨基酸序列。在进一步的实施方案中，结合分子与参照抗体共有至少约96％、约97％、约99％或100％的序列同一性。

[0106] 在另一个实施方案中，在本文提供的方法中有用的抗SEMA4D抗体或其抗原结合片段、变体或衍生物包含免疫球蛋白重链可变结构域(VH结构域)，或基本上由免疫球蛋白重链可变结构域(VH结构域)组成，或由免疫球蛋白重链可变结构域(VH结构域)组成，其中该VH结构域的至少一个CDR具有与SEQ ID NO:9或10的CDR1、CDR2或CDR3至少约80％、约85％、约90％、约95％、约96％、约97％、约98％、约99％或完全相同的氨基酸序列。

[0107] 在另一个实施方案中，在本文提供的方法中有用的抗SEMA4D抗体或其抗原结合片段、变体或衍生物包含免疫球蛋白重链可变结构域(VH结构域)，或基本上由免疫球蛋白重链可变结构域(VH结构域)组成，或由免疫球蛋白重链可变结构域(VH结构域)组成，其中该VH结构域的至少一个CDR具有与SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7或SEQ ID NO:8至少约80％、约85％、约90％、约95％、约96％、约97％、约98％、约99％或完全相同的氨基酸序列。

[0108] 在另一个实施方案中，在本文提供的方法中有用的抗SEMA4D抗体或其抗原结合片段、变体或衍生物包含免疫球蛋白重链可变结构域(VH结构域)，或基本上由免疫球蛋白重链可变结构域(VH结构域)组成，或由免疫球蛋白重链可变结构域(VH结构域)组成，其中该VH结构域的至少一个CDR具有除1、2、3、4或5个保守氨基酸置换外与SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7或SEQ ID NO:8相同的氨基酸序列。

[0109] 在另一个实施方案中，在本文提供的方法中有用的抗SEMA4D抗体或其抗原结合片段、变体或衍生物包含VH结构域，或基本上由VH结构域组成，或由VH结构域组成，所述VH结构域具有与SEQ ID NO:9或SEQ ID NO:10至少约80％、约85％、约90％、约91％、约92％、约93％、约94％、约95％、约96％、约97％、约99％或100％相同的氨基酸序列，其中包含该编码的VH结构域的抗SEMA4D抗体特异性地、优先地或竞争性地结合SEMA4D。

[0110] 在另一个实施方案中，在本文提供的方法中有用的抗SEMA4D抗体或其抗原结合片段、变体或衍生物包含免疫球蛋白轻链可变结构域(VL结构域)，或基本上由免疫球蛋白轻链可变结构域(VL结构域)组成，或由免疫球蛋白轻链可变结构域(VL结构域)组成，其中该

VL结构域的至少一个CDR具有与SEQ ID NO:17或18的CDR1、CDR2或CDR3至少约80％、约85％、约90％、约95％、约96％、约97％、约98％、约99％或完全相同的氨基酸序列。

[0111] 在另一个实施方案中，在本文提供的方法中有用的抗SEMA4D抗体或其抗原结合片段、变体或衍生物包含免疫球蛋白轻链可变结构域(VL结构域)，或基本上由免疫球蛋白轻链可变结构域(VL结构域)组成，或由免疫球蛋白轻链可变结构域(VL结构域)组成，其中该VL结构域的至少一个CDR具有与SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15或SEQ ID NO:16至少约80％、约85％、约90％、约95％、约96％、约97％、约98％、约99％或完全相同的氨基酸序列。

[0112] 在另一个实施方案中，在本文提供的方法中有用的抗SEMA4D抗体或其抗原结合片段、变体或衍生物包含免疫球蛋白轻链可变结构域(VL结构域)，或基本上由免疫球蛋白轻链可变结构域(VL结构域)组成，或由免疫球蛋白轻链可变结构域(VL结构域)组成，其中该VL结构域的至少一个CDR具有除1、2、3、4或5个保守氨基酸置换外与SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15或SEQ ID NO:16相同的氨基酸序列。

[0113] 在另一个实施方案中，在本文提供的方法中有用的抗SEMA4D抗体或其抗原结合片段、变体或衍生物包含VL结构域，或基本上由VL结构域组成，或由VL结构域组成，所述VL结构域具有与SEQ ID NO:17或SEQ ID NO:18至少约80％、约85％、约90％、约91％、约92％、约93％、约94％、约95％、约96％、约97％、约98％、约99％或100％相同的氨基酸序列，其中包含该编码的VL结构域的抗SEMA4D抗体特异性地、优先地或竞争性地结合SEMA4D。

[0114] 在另一个实施方案中，在本文提供的方法中有用的抗SEMA4D抗体或其抗原结合片段、变体或衍生物包含免疫球蛋白重链可变结构域(VH结构域)和免疫球蛋白轻链可变结构域(VL结构域)，或基本上由免疫球蛋白重链可变结构域(VH结构域)和免疫球蛋白轻链可变结构域(VL结构域)组成，或由免疫球蛋白重链可变结构域(VH结构域)和免疫球蛋白轻链可变结构域(VL结构域)组成，其中该VH结构域的至少一个CDR具有与SEQ ID NO:9或10的CDR1、CDR2或CDR3至少约80％、约85％、约90％、约95％、约96％、约97％、约98％、约99％或完全相同的氨基酸序列和该VL结构域的至少一个CDR具有与SEQ ID NO:17或18的CDR1、CDR2或CDR3至少约80％、约85％、约90％、约95％、约96％、约97％、约98％、约99％或完全相同的氨基酸序列。

[0115] 在另一个实施方案中，在本文提供的方法中有用的抗SEMA4D抗体或其抗原结合片段、变体或衍生物包含免疫球蛋白重链可变结构域(VH结构域)和免疫球蛋白轻链可变结构域(VL结构域)，或基本上由免疫球蛋白重链可变结构域(VH结构域)和免疫球蛋白轻链可变结构域(VL结构域)组成，或由免疫球蛋白重链可变结构域(VH结构域)和免疫球蛋白轻链可变结构域(VL结构域)组成，其中该VH结构域的至少一个CDR具有除1、2、3、4或5个保守性氨基酸置换外与SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7或SEQ ID NO:8相同的氨基酸序列，并且其中该VL结构域的至少一个CDR具有除1、2、3、4或5个保守性氨基酸置换外与SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15或SEQ ID NO:16相同的氨基酸序列。

[0116] 在另一个实施方案中，在本文提供的方法中有用的抗SEMA4D抗体或其抗原结合片段、变体或衍生物包含VH结构域和VL结构域，或基本上由VH结构域和VL结构域组成，或由VH结构域和VL结构域组成，所述VH结构域具有与SEQ ID NO:9或SEQ ID NO:10至少约80％、约85％、约90％、约91％、约92％、约93％、约94％、约95％、约96％、约97％、约99％或100％相同的氨基酸序列，并且所述VL结构域具有与SEQ ID NO:17或SEQ ID NO:18至少约80％、约

85％、约90％、约91％、约92％、约93％、约94％、约95％、约96％、约97％、约98％、约99％或100％相同的氨基酸序列，其中包含该编码的VH和VL结构域的抗SEMA4D抗体特异性地、优先地或竞争性地结合SEMA4D。

[0117] 在另一个实施方案中，在本文提供的方法中有用的抗SEMA4D抗体或其抗原结合片段、变体或衍生物包含MAb VX15/2503、67或76的VH结构域的三个CDR和VL结构域的三个CDR，或基本上由MAb VX15/2503、67或76的VH结构域的三个CDR和VL结构域的三个CDR组成，或由MAb VX15/2503、67或76的VH结构域的三个CDR和VL结构域的三个CDR组成，MAb VX15/2503、67或76全部描述于US 2010/0285036A1中。在一些实施方案中，本文提供的方法中有用的抗-SEMA4D抗体包括MAb VX15/2503或67。

[0118] 用于本文提供的方法中的还包括编码本文中所述的抗SEMA4D抗体或其抗原结合片段、变体或衍生物的多肽，编码所述多肽的多核苷酸，包含所述多核苷酸的载体和包含所述载体或多核苷酸的宿主细胞，其全部用于产生用于本文所述方法中的抗SEMA4D抗体或其抗原结合片段、变体或衍生物。

[0119] 本发明抗SEMA4D抗体的合适的生物活性变体可以用于本发明的方法中。这样的变体将保持母本抗SEMA4D抗体的所需结合特性。用于制备抗体变体的方法通常是本领域可获得的。

[0120] 用于诱变和核苷酸序列改变的方法是本领域公知的。参见，例如，Walker和Gaastra编辑，(1983)Techniques in Molecular Biology(MacMillan Publishing Company,New York)；Kunkel,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 82:488-492(1985)；Kunkel等，Methods Enzymol.154:367-382(1987)；Sambrook等，(1989)Molecular Cloning:A Laboratory Manual(Cold Spring Harbor,N.Y.)；美国专利号4,873,192；以及其中引用的参考文献；其按引用并入本文中。对于不影响目标多肽生物活性的合适的氨基酸置换的指导可以在Dayhoff等(1978)的模型中找到，见Atlas of Protein Sequence and Structure(Natl.Biomed.Res.Found.,Washington,D.C.),pp.345-352，将其全部按引用并入本文中。Dayhoff等的模型使用了单点可接受突变(PAM)氨基酸相似性矩阵(PAM 250矩阵)来确定合适的保守性氨基酸置换。可能优选的是保守性置换，如用具有相似特性的另一个氨基酸交换一个氨基酸。如Dayhoff等模型的PAM250矩阵教导的保守性氨基酸置换的实例包括但不限于：Gly↔Ala、Val↔Ile↔Leu、Asp↔Glu、Lys↔Arg、Asn↔Gln和Phe↔Trp↔Tyr。

[0121] 在构建抗SEMA4D结合分子的变体中，例如，抗体或其抗原结合片段、目标多肽，进行修饰以使得变体持续拥有所需特性，例如，能够特异性地结合SEMA4D(例如，人、鼠，或人和鼠两者的SEMA4D)，例如，在细胞表面上表达的或由细胞分泌的并且具有SEMA4D阻断活性，如本文中所述的。显然，编码变体多肽的DNA中产生的任何突变一定不能将序列置于阅读框外，且优选不产生可生成二级mRNA结构的互补区。参见例如EP专利申请公开号75,444。

[0122] 用于测量抗SEMA4D结合分子(例如，抗体或其抗原结合片段、变体或衍生物)结合特异性的方法包括但不限于，标准竞争结合分析、监测T细胞或B细胞的免疫球蛋白分泌的分析、T细胞增殖分析、细胞凋亡分析、ELISA分析等。参见，例如，WO93/14125；Shi等，Immunity 13:633-642(2000)；Kumanogoh等，J Immunol 169:1175-1181(2002)；Watanabe

等,J Immunol 167:4321-4328(2001);Wang等,Blood 97:3498-3504(2001);和Giraudon等,J Immunol 172(2):1246-1255(2004)中公开的分析方法,其全部按引用并入本文中。

[0123] 在本文中讨论本文公开的任何具体多肽(包括恒定区、CDR、VH结构域或VL结构域)是否与另一多肽至少约65%、约70%、约75%、约80%、约85%、约90%、约91%、约92%、约93%、约94%、约95%、约96%、约97%、约98%、约99%或甚至约100%相同时,同一性%可以使用本领域已知的方法和计算机程序/软件测定,如但不限于,BESTFIT程序(威斯康星序列分析软件包,用于Unix系统的第8版,遗传学计算机团队(Genetics Computer Group),威斯康星州麦迪逊科学大道575大学研究园(University Research Park),53711)。BESTFIT利用Smith和Waterman(1981)Adv.Appl.Math.2:482-489的局部同源性算法来找到两条序列之间的最佳同源性区段。当使用BESTFIT或任何其它序列比对程序来确定某特定序列是否与本发明所述参照序列(例如)95%相同时,当然要设定参数以使得在参照多肽序列的全长上计算同一性百分数,并且允许在参照序列中最多5%的氨基酸总数的同源性空位。

[0124] 出于本发明的目的,可以使用Smith-Waterman同源性检索算法,采用仿射空位检索以空位开放罚分12和空位延伸罚分2,BLOSUM矩阵62来测定序列同一性百分数。Smith和Waterman(1981)Adv.Appl.Math.2:482-489中公开了Smith-Waterman同源性检索算法。变体与参照抗SEMA4D抗体(例如,MAb VX15/2503、67或76)可以有例如少至1至15个氨基酸残基,少至1至10个氨基酸残基的不同,如6-10个,少至5个,少至4、3、2或者甚至1个氨基酸残基。

[0125] 抗SEMA4D抗体的恒定区可以突变而以多种方式来改变效应子功能。例如,参见美国专利号6,737,056B1和美国专利申请公开号2004/0132101A1,其公开了优化抗体与Fc受体结合的Fc突变。

[0126] 在本文提供的方法中有用的特定抗SEMA4D抗体或其片段、变体或衍生物中,可以使用本领域已知的技术突变Fc部分以降低效应子功能。例如,恒定区结构域的删除或失活(通过点突变或其它方式)可以降低循环的修饰抗体的Fc受体结合,从而提高肿瘤定位。在其它情况中,与本发明相一致的恒定区修饰缓和补体结合,并且因此降低血清半衰期。恒定区的再其它的修饰可以用来改变二硫键或寡糖部分,这由于提高的抗原特异性或抗体灵活性而允许加强的定位。可容易地利用公知的免疫学技术测量或定量所得的生理学特性、生物利用度和修饰的其它生化效应(如肿瘤定位、生物学分布和血清半衰期)而无需过多实验。用于本文提供的方法中的抗SEMA4D抗体包括例如通过任何类型的分子与抗体的共价连接修饰的衍生物,使得共价连接不阻止抗体特异性结合其同源表位。例如,但非限制性的,抗体衍生物包括例如通过糖基化、乙酰化、PEG化、磷酸化、酰胺化、由已知保护/封闭基团衍生、蛋白水解切割、与细胞配体或其它蛋白质连接等方法修饰的抗体。可以通过已知技术进行多种化学修饰中任一种,包括但不限于:特异性化学切割、乙酰化、甲酰化等。此外,衍生物可以含有一个或多个非经典氨基酸。

[0127] “保守性氨基酸置换”是其中氨基酸残基被具有带相似电荷的侧链的氨基酸残基替代的氨基酸置换。本领域已经定义了侧链带相似电荷的氨基酸残基的家族。这些家族包括:具有碱性侧链的氨基酸(例如,赖氨酸、精氨酸、组氨酸)、具有酸性侧链的氨基酸(例如,天冬氨酸、谷氨酸)、具有不带电极性侧链的氨基酸(例如,甘氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸、半胱氨酸)、具有非极性侧链的氨基酸(例如,丙氨酸、缬氨酸、亮氨

酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸、色氨酸)、具有β-分支侧链的氨基酸(例如,苏氨酸、缬氨酸、异亮氨酸)和具有芳族侧链的氨基酸(例如,酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、组氨酸)。或者,可以沿着所有或部分编码序列随机引入突变,例如通过饱和诱变,并且可以筛选所得突变体的生物学活性以鉴定保持活性(例如,结合抗SEMA4D多肽的能力、阻断SEMA4D与其受体的相互作用的能力或降低受试者(例如,患有神经炎症的患者)的BBB渗透性的能力)的突变体。

[0128] 例如,可能仅在抗体分子的框架区中或仅在CDR区中引入突变。引入的突变可以是沉默或中性错义突变,即对抗体的抗原结合能力没有影响或影响很小。这些类型的突变可以用来优化密码子使用,或提高杂交瘤的抗体产生。或者,非中性错义突变可以改变抗体的抗原结合能力。本领域技术人员能够设计和测试具有所需特性的突变分子,所述特性例如抗原结合活性无改变或结合活性有改变(例如,抗原结合活性提高或抗体特异性改变)。诱变后,编码蛋白可以通过常规方式表达,并且可以使用本文中所描述的技术或本领域已知的常规改良技术来测定该编码蛋白的功能和/或生物学活性(例如,免疫特异性结合SEMA4D多肽的至少一个表位的能力)。

[0129] 在特定的实施方案中,用于本文提供的方法中的抗SEMA4D抗体包含至少一个优化的互补决定区(CDR)。“优化的CDR”意指该CDR已经被修饰和优化以提高赋予包含该优化CDR的抗SEMA4D抗体的结合亲和性和/或抗SEMA4D活性。“抗SEMA4D活性”或“SEMA4D阻断活性”可以包括调节以下一种或多种与SEMA4D相关的活性的活性:B细胞激活、聚集和存活;CD40诱导的增殖和抗体产生;对T细胞依赖性抗原的抗体应答;T细胞或其他免疫细胞增殖;树突细胞成熟;脱髓鞘和轴突变性;多能神经前体和/或少突细胞的凋亡;内皮细胞迁移的诱导;自发性单核细胞迁移的抑制;结合细胞表面神经丛蛋白-B1或其他受体,或者与可溶性SEMA4D或SEMA4D+细胞表面上表达的SEMA4D相关的任何其他活性。抗SEMA4D活性也可以归因于与SEMA4D表达或过表达相关的疾病的发病率或严重性的降低,所述疾病包括但不必定限于神经炎性疾病,包括中枢神经系统(CNS)和外周神经系统(PNS)炎性疾病。

[0130] 基于鼠抗-SEMA4D MAb BD16和BB18的优化抗体的实例描述于美国公开号2008/0219971 A1、国际专利申请WO 93/14125和Herold等,Int.Immunol.7(1):1-8(1995)中,将每一篇文献全部按引用并入本文中。修饰可以涉及CDR内氨基酸残基的替代以使得抗SEMA4D抗体保持对SEMA4D抗原的特异性,并且具有提高的结合亲和性和/或提高的抗SEMA4D活性。

[0131] V.使用治疗性抗SEMA4D和抗神经丛蛋白B1抗体的治疗方法

[0132] 本发明的方法涉及利用SEMA4D与SEMA4D受体相互作用的抑制剂来降低患有神经炎性疾病的受试者的血脑屏障渗透性,所述SEMA4D与SEMA4D受体相互作用的抑制剂例如为抗SEMA4D结合分子、抗神经丛蛋白B1结合分子,或其组合,例如,抗体,包括其抗原结合片段、变体和衍生物。在特定的实施方案中,神经炎性疾病是例如多发性硬化、肌萎缩性侧索硬化、癫痫、阿尔茨海默病、帕金森病、脑膜炎、脑水肿、脑创伤或中风。在特定的实施方案中,内皮细胞表达SEMA4D受体;并且在特定的实施方案中,受体是神经丛蛋白-B1。尽管以下讨论涉及抗SEMA4D抗体、抗神经丛蛋白B1抗体及其组合的给药,但本文中所述的方法也适用于保留本发明抗SEMA4D或抗神经丛蛋白B1抗体的所需特性的这些抗SEMA4D或抗神经丛蛋白B1抗体的抗原结合片段、变体和衍生物,所述特性例如为能够特异性地结合SEMA4D(例

如，人，鼠，或人和鼠SEMA4D)，具有SEMA4D中和活性和/或阻断SEMA4D与其受体(例如，神经丛蛋白-B1)的相互作用。

[0133] 在一个实施方案中，治疗包括将抗SEMA4D结合分子、抗神经丛蛋白B1结合分子或其组合(例如，本文中描述的抗体或其抗原结合片段)施用于或应用于患者，其中所述患者患有神经炎性疾病或具有产生神经炎性疾病的风险。在另一个实施方案中，治疗还意图包括将包含抗SEMA4D结合分子、抗神经丛蛋白B1结合分子或其组合(例如，抗体或其抗原结合片段)的药物组合物施用于或应用于患者，其中所述患者患有神经炎性疾病或具有产生神经炎性疾病的风险。应当认识到，由于SEMA4D与内皮细胞上受体的相互作用，预期抗SEMA4D结合分子、抗神经丛蛋白B1结合分子或其组合的施用或应用将发生在血脑屏障的血液侧。通过将抗SEMA4D结合分子、抗神经丛蛋白B1结合分子或其组合暴露于血液侧的途径(例如，包括，但不限于，静脉内施用)施用，抗SEMA4D结合分子、抗神经丛蛋白B1结合分子或其组合将允许抑制SEMA4D与内皮细胞表达的SEMA4D受体的相互作用。

[0134] 抗SEMA4D结合分子、抗神经丛蛋白B1结合分子或其组合，例如，本文中所述的抗体或其结合片段，对于各种神经炎性疾病的治疗是有用的。在一些实施方案中，神经炎性疾病的治疗意图包括减小或降低BBB的渗透性。在其他实施方案中，神经炎性疾病的治疗意图包括提高BBB的电阻率。在其他实施方案中，神经炎性疾病的治疗意图包括提高BBB上存在的内皮细胞的数量、密度和/或浓度。在其他实施方案中，神经炎性疾病的治疗意图包括改变内皮细胞的形态或功能，或者形成BBB的内皮细胞或星形细胞中的相互作用或内皮细胞和星形细胞之间的相互作用。

[0135] 在一个实施方案中，本发明涉及抗SEMA4D结合分子、抗神经丛蛋白B1结合分子或其组合，例如，抗体或其抗原结合片段、变体或衍生物，作为药物的用途，特别是用于治疗或预防神经炎性疾病，以抑制、减轻、预防或最小化BBB的破坏或BBB渗透性的提高。

[0136] 根据本发明的方法，如本文中别处限定的至少一种抗SEMA4D结合分子，或抗神经丛蛋白B1结合分子，例如，抗体或其抗原结合片段、变体或衍生物，可以用于促进关于神经炎性疾病的积极治疗反应。关于神经炎性疾病的“积极治疗反应”意图包括与这些抗体相关的抗炎活性、抗凋亡活性等相关的疾病改善和/或疾病相关症状的改善。即，可以观察到抗增殖效应、SEMA4D表达细胞进一步增殖的阻止、炎性反应的降低(包括但不限于，降低的促炎性细胞因子、粘附分子、蛋白酶、免疫球蛋白(在其中携带SEMA4D的细胞是B细胞的情况中)及其组合的分泌，等等)、提高的抗炎蛋白的产生、自体反应性细胞数量的下降、免疫耐受性的提高、自体反应性细胞存活的抑制、细胞凋亡的降低、内皮细胞迁移的降低、自发性单核细胞迁移的提高、由sSEMA4D或SEMA4D表达细胞的刺激介导的一种或多种症状的减轻和/或降低。这样的积极治疗反应不受限于给药途径，并且可以包括施用于供体、供体组织(如，例如，器官灌注)、主体其任意组合等等。特别地，本文中提供的方法涉及抑制、预防、降低、减轻或缓解患者中神经炎性疾病的发展。因此，例如，疾病的改善可以表征为不存在临床上可观察的症状，BBB渗透性的降低，BBB上存在的内皮细胞的数量、密度或浓度的提高，内皮细胞的形态或功能的改变，或者形成BBB的内皮细胞和周细胞或星形细胞中的相互作用或内皮细胞、周细胞和星形细胞之间的相互作用的改变。

[0137] 可以使用体外模型来测量BBB渗透性的变化。在特定的实施方案中，可以使用动态体外DIV-BBB模型。Cucullo等已经提出了一种由正常成人脑微血管内皮细胞和人成年星形

细胞构成的DIV-BBB模型，用来研究血液动力学变化和全身性炎症怎样影响脑微血管系统的完整性。具体地，这种模型使用盒或中空管来代表血脑屏障，以盒的内部代表血脑屏障的血液侧和盒的外部代表血脑屏障的大脑侧。盒的内部内衬成年人大脑微血管内皮细胞，而盒的外部排列人成年星形细胞。随着血脑屏障调节剂，如SEMA4D，引入盒的内腔内，使用下文所述的跨内皮电阻测量来监测管的内部和外部之间的电流。这种模型的一个实施方案具有跨毛细血管微孔的新颖性，以使得血管和实质区室之间的跨内皮细胞运输可能。体外DIV-BBB模型以及所用的人微血管内皮细胞和成年星形细胞的衍生和培养的深入描述可以在例如Cucullo等，Brain Research.951 243-254(2002)；和Cucullo等，Journal of Cerebral Blood Flow&Metabolism.2:767-77(2011)中找到。应当理解，本领域技术人员将认识到其他BBB模型在现有技术中已经描述并且有利地用于BBB在疾病中的作用的研究，并且本公开内容不应当限于任何一种特定的模型。

[0138] 可以使用跨内皮电阻测量(TEER)来监测BBB的渗透性。TEER用于实时监测BBB的完整性，其已经表明与BBB的渗透性相关。TEER系统使用电子多路技术来快速连续地测量多个盒，并且快速且可靠地评估组织培养双层的完整性和存活力(Cucullo等，2002;Cucullo等，2010;Santaguida等，2006)。在操作中，系统应用跨越激发电极的激发电压(0.06V)，所述激发电极插入腔内和腔外区室中的各个盒中。微控制器从物理参数计算屏障的电阻和电容(每cm^2)。通过比较电压和电流波形来计算电容值。两个波形的峰-峰延迟与电容值成比例，其表示为弧延伸(arch tension)。可以在各实验的整个过程中从初始设置开始测量TEER。

[0139] 抗SEMA4D结合分子、抗神经丛蛋白B1结合分子或其组合，例如，抗体或其抗原结合片段、变体或衍生物，可以与至少一种或多种用于神经炎性疾病的其他治疗结合使用；其中在抗SEMA4D结合分子、抗神经丛蛋白B1结合分子或其组合(例如，抗体或其抗原结合片段、变体或衍生物)治疗之前、之中或之后施用其他治疗。因此，在联合治疗包括与施用另一种治疗剂的给药结合施用抗SEMA4D结合分子、抗神经丛蛋白B1结合分子或其组合，例如，抗体或其抗原结合片段、变体或衍生物，的情况中，本发明的方法包括共同施用，使用单独的制剂或单一药物制剂，同时施用或以任意次序连续施用。

[0140] VI.药物组合物和施用方法

[0141] 制备抗SEMA4D结合分子、抗神经丛蛋白B1结合分子或其组合(例如，抗体或其抗原结合片段、变体或衍生物)并将其施用于需要的受试者的方法是本领域技术人员公知的或容易确定的。抗SEMA4D结合分子、抗神经丛蛋白B1结合分子或其组合(例如，抗体或其抗原结合片段、变体或衍生物)的施用途径可以是，例如，口服、肠胃外、通过吸入或局部。本文中使用的术语肠胃外包括，例如，静脉内、动脉内、腹膜内、肌肉内、皮下、直肠或阴道施用。尽管所有这些施用形式显然包含在本发明的范围之内，但施用形式的实例为注射液，特别是用于静脉内或动脉内注射或点滴。用于注射的合适的药物组合物可以包含缓冲剂(例如，醋酸盐、磷酸盐或柠檬酸盐缓冲剂)、表面活性剂(例如，聚山梨醇酯)，任选地稳定剂(例如，人白蛋白)等。然而，在与本文中的教导相容的其他方法中，抗SEMA4D结合分子、抗神经丛蛋白B1结合分子或其组合，例如，抗体或其抗原结合片段、变体或衍生物，可以直接递送至不利细胞群体的位点，由此提高患病组织对治疗剂的暴露。

[0142] 如本文中讨论的，抗SEMA4D结合分子、抗神经丛蛋白B1结合分子或其组合(例如，抗体或其抗原结合片段、变体或衍生物)可以以用于神经炎性疾病的体内治疗的药物有效

量施用。在这点上，将认识到所公开的结合分子可以配制以使得有助于给药并促进活性剂的稳定性。在特定的实施方案中，根据本发明的药物组合物包含药物可接受的、无毒的、无菌的载体，如生理盐水、无毒缓冲剂、防腐剂等。对于本应用的目的，药物有效量的抗SEMA4D结合分子、抗神经丛蛋白B1结合分子或其组合(例如，抗体或其抗原结合片段、变体或衍生物)应当保持足以实现与靶标有效结合并获得益处的量，所述益处例如为降低患有神经炎性疾病患者的BBB渗透性。

[0143] 本发明中所用的药物组合物包含药物可接受的载体，包括，例如，离子交换剂、氧化铝、硬脂酸铝、卵磷脂、血清蛋白如人血清白蛋白、缓冲物质如磷酸盐、甘氨酸、山梨酸、山梨酸钾、饱和植物脂肪酸的部分甘油酯混合物、水、盐或电解质如硫酸鱼精蛋白、磷酸氢二钠、磷酸氢钾、氯化钠、锌盐、胶体二氧化硅、三硅酸镁、聚乙烯吡咯烷酮、纤维素基物质、聚乙二醇、羧甲基纤维素钠、聚丙烯酸酯、蜡、聚乙烯-聚氧丙烯-嵌段聚合物、聚乙二醇和羊毛脂。

[0144] 用于肠胃外施用的制剂包括无菌水性或非水性溶液、悬浮液和乳液。非水性溶剂的实例是丙二醇、聚乙二醇、植物油，如橄榄油，以及可注射有机酯如油酸乙酯。水性载体包括，例如，水、醇/水溶液、乳液或悬液，包括盐水和缓冲介质。在本发明中，药物可接受的载体包括，但不限于，0.01-0.1M并且优选0.05M的磷酸盐缓冲液或0.8％盐水。其它常见的肠胃外介质包括磷酸钠溶液、林格氏右旋糖、右旋糖和氯化钠、乳酸林格氏溶液或不挥发性油。静脉内介质包括流体和营养补充剂、电解质补充剂，如基于林格氏右旋糖的那些等。也可以存在防腐剂和其它添加剂，例如，抗微生物剂、抗氧化剂、螯合剂和惰性气体等。

[0145] 更特别地，适于注射使用的药物组合物包括无菌水溶液(在水溶性的情况中)或分散液，以及用于临时制备无菌注射液或分散液的无菌粉末。在这些情况下，该组合物必须是无菌的，并应该是达到存在易注射性(easy syringability)程度的流体。它应该在制造和储存条件下是稳定的，并且优选抵抗微生物(如细菌和真菌)的污染作用而保存。载体可以是包含如水、乙醇、多元醇(例如，甘油、丙二醇和液体聚乙二醇等)及其合适混合物的溶剂或分散介质。可以通过例如使用涂层如卵磷脂、通过在分散液情况下保持所需粒度以及通过使用表面活性剂来维持合适的流动性。用于本文所述治疗方法中的合适制剂描述于Remington's Pharmaceutical Sciences(Mack Publishing Co.)，第16版(1980)中。

[0146] 可以通过各种抗细菌剂和抗真菌剂，例如，对羟基苯甲酸酯类、氯丁醇、苯酚、抗坏血酸、硫柳汞等，来实现微生物作用的防止。在许多情况下，组合物中优选包括等渗剂，例如糖、多元醇如甘露醇、山梨醇或氯化钠。通过组合物中包括延迟吸收的试剂(例如，单硬脂酸铝和明胶)能延长可注射组合物的吸收。

[0147] 在任何情况中，可以通过将所需量的活性化合物(例如，抗SEMA4D抗体，或其抗原结合片段、变体或衍生物，本身或结合其他活性剂)掺入按照需要含有本文所列一种成分或多种成分组合的合适溶剂中，然后过滤灭菌来制得无菌注射液。通常，通过将活性化合物掺入含有碱性分散介质和所需的上述其它成分的无菌介质中制备分散液。在用于制备无菌注射液的无菌粉末的情况中，优选的制备方法是真空干燥和冷冻干燥，其从之前无菌过滤的溶液产生了活性成分加任何其它所需成分的粉末。注射制剂在无菌条件下按照本领域已知方法加工，装入容器如安瓿、袋、瓶、注射器或小管中，并密封。另外，可以包装该制剂，并以药盒形式出售。这类制品优选具有标签或包装插页，其标明相关组合物可用于治疗患有或

倾向于患有疾病或失调的受试者。

[0148] 肠胃外制剂可以是单次推注剂量,输注或负荷推注(loading bolus)剂量,随后是维持剂量。这些组合物可以特定的固定间隔或可变间隔施用,例如,每天一次,或“按需”给药。

[0149] 本发明所用的某些药物组合物可以以可接受的剂型口服施用,包括,例如,胶囊、片剂、水性悬浮液或溶液。某些药物组合物也可以通过鼻喷雾或吸入方式给予。这类组合物可以制备成盐水溶液,其中采用苄醇或其它合适的防腐剂、增强生物利用度的吸收促进剂和/或其它常规增溶剂或分散剂。

[0150] 可以与载体材料组合以产生单一剂型的抗SEMA4D结合分子、抗神经丛蛋白B1结合分子或其组合(,例如,抗体,或其片段、变体或衍生物)的量将根据待治疗的主体和特定的施用方式而改变。组合物可以作为单剂量、多剂量或在确定的时间段内输注施用。也可以调节剂量方案以提供最佳的所需反应(例如,治疗性或预防性反应)。

[0151] 与本公开内容的范围一致,可以根据上述治疗方法将抗SEMA4D抗体或其抗原结合片段、变体或衍生物以足以产生治疗作用的量施用于人或其他动物。抗SEMA4D抗体或其抗原结合片段、变体或衍生物可以以常规剂型施用于人或其他动物,所述常规剂型是根据已知技术通过将本发明的抗体与常规的药物可接受的载体或稀释剂混合制得的。本领域技术人员将认识到,药物可接受的载体或稀释剂的形式和特征由与其混合的活性成分的量、给药途径和其它公知变量来决定。本领域技术人员将进一步认识到可以使用包含本发明的一种或多种抗SEMA4D结合分子、抗神经丛蛋白B1结合分子或其组合(例如,抗体或其抗原结合片段、变体或衍生物)的混合物。

[0152] “治疗有效剂量或治疗有效量”或者“有效量”是指在施用时在患有待治疗疾病的患者的治疗方面带来积极治疗反应的抗SEMA4D结合分子、抗神经丛蛋白B1结合分子或其组合(,例如,抗体或其抗原结合片段、变体或衍生物)的量,所述积极治疗反应例如为BBB渗透性的降低,BBB电阻的提高,BBB上存在的内皮细胞的数量、密度或浓度的提高,内皮细胞形态或功能的改变,或者形成BBB的内皮细胞或星形细胞中相互作用或内皮细胞和星形细胞之间相互作用的改变。

[0153] 本发明的组合物用于降低BBB渗透性的治疗有效剂量根据许多不同因素而改变,包括给药方式、目标位点、患者生理状态、患者是人还是动物、施用的其它药物和治疗是预防性还是治疗性的。在特定的实施方案中,患者是人,但也可治疗非人哺乳动物,包括转基因哺乳动物。可以使用本领域技术人员已知的常规方法确定治疗剂量以优化安全性和效力。

[0154] 鉴于本发明的公开内容,本领域普通技术人员无需过多实验即可容易地确定待施用的至少一种抗SEMA4D结合分子、抗神经丛蛋白B1结合分子或其组合(例如,抗体或其结合片段、变体或衍生物)的量。影响施用方式以及相应的至少一种抗SEMA4D结合分子、抗神经丛蛋白B1结合分子或其组合(例如,抗体或其结合片段、变体或衍生物)的量的因素包括但不限于,接受治疗的个体的疾病严重程度、病史以及年龄、身高、体重、健康和身体状况。类似地,待施用的抗SEMA4D结合分子、抗神经丛蛋白B1结合分子或其组合(例如,抗体或其结合片段、变体或衍生物)的量取决于给药方式以及受试者是否将接受单剂量或多剂量的这种药剂。

[0155] 本发明还提供了抗SEMA4D结合分子、抗神经丛蛋白B1结合分子或其组合(例如,抗体或其结合片段、变体或衍生物)在制造用于治疗受试者以用于治疗神经炎性疾病的药物中的用途,其中将药物用于已经用至少一种其他疗法预先治疗过的受试者。“预先治疗的”或“预先治疗”表示受试者在接受包含抗SEMA4D结合分子、抗神经丛蛋白B1结合分子或其组合(例如,抗体或其结合片段、变体或衍生物)的药物之前,已经接受了一种或多种其他疗法(例如,已经用至少一种其他神经炎性疗法进行了治疗)。“预先治疗的”或“预先治疗”包括在用包含本文中公开的抗SEMA4D结合分子(例如,单克隆抗体VX15/2503)或其抗原结合片段、变体或衍生物的药物开始治疗之前的2年内、18个月内、1年内、6个月内、2个月内、6周内、1个月内、4周内、3周内、2周内、1周内、6天内、6天内、4天内、3天内、2天内或甚至1天内,已经用至少一种其他疗法治疗的受试者。受试者不必需是对之前的一种或多种疗法的预先治疗的响应者。因此,接受包含抗SEMA4D结合分子、抗神经丛蛋白B1结合分子或其组合(例如,抗体或其结合片段、变体或衍生物)的药物的受试者对之前疗法的预先治疗或对其中预先治疗包括多种疗法的一种或多种之前疗法已经作出了响应或未产生响应。

[0156] 除非另有说明,本发明的实施将采用细胞生物学、细胞培养、分子生物学、转基因生物学、微生物学、重组DNA和免疫学的常规技术,它们均在本领域技术的范围内。这些技术在文献中已有充分描述。参见例如,Sambrook等编(1989)Molecular Cloning A Laboratory Manual(《分子克隆:实验室手册》)(第2版;冷泉港实验室出版社(Cold Spring Harbor Laboratory Press));Sambrook等编(1992)Molecular Cloning:A Laboratory Manual(《分子克隆:实验室手册》,(纽约州的冷泉港实验室出版社(Cold Springs Harbor Laboratory,NY));D.N.Glover编,(1985)DNA Cloning(《DNA克隆》),第I和II卷;Gait编(1984)Oligonucleotide Synthesis(《寡核苷酸合成》);Mullis等,美国专利号4,683,195;Hames和Higgins编(1984)Nucleic Acid Hybridization(《核酸杂交》);Hames和Higgins编(1984)Transcription And Translation(《转录和翻译》);Freshney(1987)Culture Of Animal Cells(《动物细胞培养》)(ARL公司(Alan R.Liss,Inc.));Immobilized Cells And Enzymes(《固定的细胞和酶》)(IRL出版社(IRL Press))(1986);Perbal(1984)A Practical Guide To Molecular Cloning(《分子克隆实践指南》);论文,Methods In Enzymology(《酶学方法》)(纽约州的学术出版社公司(Academic Press,Inc.));Miller和Calos编(1987)Gene Transfer Vectors For Mammalian Cells(《哺乳动物细胞的基因转移载体》)(冷泉港实验室出版社(Cold Spring Harbor Laboratory));Wu等编,Methods In Enzymology(《酶学方法》),第154和155卷;Mayer和Walker编(1987)Immunochemical Methods In Cell And Molecular Biology(《细胞和分子生物学中的免疫化学方法》)(伦敦的学术出版社(Academic Press,London));Weir和Blackwell编(1986)Handbook Of Experimental Immunology(《实验免疫学手册》),第I-IV卷;Manipulating the Mouse Embryo(《小鼠胚胎操作》),纽约州冷泉港的冷泉港实验室出版社,(1986);和Ausubel等(1989)Current Protocols in Molecular Biology(《新编分子生物学实验指南》)(马里兰州巴尔的摩的约翰韦利父子公司(John Wiley&Sons,Baltimore,Md.))。

[0157] 抗体工程的一般原理列于Borrebaeck编(1995)Antibody Engineering(《抗体工程》)(第2版;牛津大学出版社(Oxford Univ.Press))。蛋白质工程的一般原理可参见Rickwood等编(1995)Protein Engineering,A Practical Approach(《蛋白质工程,实践方

法》),(英国牛津的牛津大学出版社的IRL出版公司(IRL Press at Oxford Univ.Press,Oxford,Eng.))。抗体和抗体-半抗原结合的一般原理可参见:Nisonoff(1984)Molecular Immunology(《分子免疫学》)(第2版;马萨诸塞州桑德兰的辛奥尔联合公司(Sinauer Associates,Sunderland,Mass.));和Steward(1984)Antibodies,Their Structure and Function(《抗体,其结构和功能》)(Chapman和Hall,纽约州纽约市)。此外,本领域已知且没有具体描述的免疫学标准方法通常按照下述文献所述进行:Current Protocols in Immunology(《新编免疫学实验指南》),纽约州的约翰韦利父子公司(John Wiley&Sons);Stites等编(1994),Basic and Clinical Immunology(《基础和临床免疫学》)(第8版;Appleton和Lange,康涅狄格州的诺沃克(Norwalk,Conn.))和Mishell和Shiigi(编)(1980)Selected Methods in Cellular Immunology(《细胞免疫学的选用方法》)(纽约州的W.H.弗里曼公司(W.H.Freeman and Co.,NY))。

[0158] 给出免疫学一般原理的标准参考文献包括:Current Protocols in Immunology(《新编免疫学实验指南》),纽约州的约翰韦利父子公司(John Wiley&Sons);Klein(1982)J.,Immunology:The Science of Self-Nonself Discrimination(《免疫学:自身-非自身区分的科学》)(纽约州的约翰韦利父子公司);Kennett等编(1980)Monoclonal Antibodies,Hybridoma:A New Dimension in Biological Analyses(《单克隆抗体,杂交瘤:生物学分析的新领域》)(纽约州普莱努公司(Plenum Press,NY));Campbell(1984)"Monoclonal Antibody Technology",于Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology"(《生化和分子生物学实验室技术》)中,Burden等编(阿姆斯特丹的埃尔斯威尔公司(Elsevere,Amsterdam));Goldsby等编(2000)Kuby Immunnology(《酷比免疫学》)(第4版;H.弗里曼公司(H.Freemand&Co.));Roitt等(2001)Immunology(《免疫学》)(第6版;伦敦:莫斯比公司(Mosby));Abbas等(2005)Cellular and Molecular Immunology(《细胞和分子免疫学》)(第5版;埃尔斯威尔健康科学分公司(Elsevier Health Sciences Division));Kontermann和Dubel(2001)Antibody Engineering(《抗体工程》)(施普林格公司(Springer Verlan));Sambrook和Russell(2001)Molecular Cloning:A Laboratory Manual(《分子克隆:实验室手册》)(冷泉港出版社(Cold Spring Harbor Press));Lewin(2003)Gene VIII(《基因VIII》)(普伦蒂斯霍尔出版社(Prentice Hall 2003);Harlow和Lane(1988)Antibodies:A Laboratory Manual(《抗体:实验室手册》)(冷泉港出版社);Dieffenbach和Dveksler(2003)PCR Primer(《PCR引物》)(冷泉港出版社)。

[0159] 以上引用的所有参考文献以及其中引用的所有参考文献全部按引用并入本文中。

[0160] 通过说明的方式而非限制的方式提供以下实施例。

实施例

[0161] 以下实施例在体外DIV-BBB模型以及体内EAE模型中证明了抗SEMA4D抗体(VX15/2503)在减轻或预防BBB破坏中的功效,即,BBB渗透性的降低。本文中还公开了体内阿尔茨海默病模型实验。关于体外DIV-BBB模型的深度描述可以在例如Cucullo等,Brain Research.951:243-254(2002)和Cucullo等,Journal of Cerebral Blood Flow&Metabolism.1-11(2010)中找到。体内EAE和阿尔茨海默病模型分别公开于,例如,Miller等,Curr Protoc Immunol.CHAPTER:Unit-15.1,2007;Colton等,J Alzheimers Dis 15:

571-587,2008和Wilcock等,J.Neuroscience,29:7957-7965,2009中。

[0162] 实施例1:在体外DIV-BBB模型中,测试抗SEMA4D结合分子(例如,抗体或其抗原结合片段、变体或衍生物),例如,VX15/2503,恢复SEMA4D诱导的BBB破坏后的BBB完整性的能力

[0163] 实验设计。执行动态体外BBB("DIV-BBB")模型来研究重组人SEMA4D(huSEMA4D-his)和VX15/2503(详细描述于US 2010/0285036A1中,将其全部按引用并入本文中)对BBB完整性的影响。在该模型中测试了两个DIV-BBB盒。基础实验设计显示于图1中。将递增浓度的重组SEMA4D(rSEMA4D)以12小时的间隔加入内腔中,使其平衡(大约12小时/浓度)。在时间0时,最初将0.05μg/ml浓度的rSEMA4D加入内腔中。在每个时间间隔,rSEMA4D的浓度提高10倍,例如,12小时时为0.5μg/ml,24小时时为5.0μg/ml,而36小时时为50.0μg/ml。在各个间隔之间获得TEER测量值作为不同rSEMA4D浓度下BBB渗透性变化的反映。在36小时时加入最终50.0μg/ml剂量的rSEMA4D后,在48小时时,将250μg/ml浓度的VX15/2503加入内腔中。在72小时时,即加入VX15/2503后24小时,再次测量BBB的渗透性。

[0164] 使用跨内皮电阻测量(TEER)来实时监测BBB的完整性。如上所述,TEER系统使用电子多路技术来快速连续测量多个盒,并快速且可靠地评价组织培养双层的完整性和存活力(Cucullo等,2002;Santaguida等,2006)。在这个动态体外模型中,设立盒或中空管来代表血脑屏障,以盒的内部代表血脑屏障的血液侧和盒的外部代表血脑屏障的大脑侧。盒的内部内衬成人脑微血管内皮细胞,而外部排列人成年星形细胞。随着血脑屏障调节剂,如SEMA4D,引入盒的内腔内,使用TEER监测管的内部和外部之间的电流。在操作中,TEER系统应用跨激发电极的激发电压(0.06V),所述激发电极插入腔内和腔外区室中的各个盒中。微控制器从物理参数计算屏障的电阻和电容(每cm^2)。通过比较电压和电流波形来计算电容值。两个波形的峰-峰的延迟与电容值成比例,将其表示为弧延伸。在各个实验的整个过程中,从初始设置测量TEER。

[0165] rSEMA4D诱导的BBB渗透性的提高。BBB形成后,通过将递增浓度的重组SEMA4D(rSEMA4D)加入两个盒的内腔中来测量rSEMA4D对BBB完整性的影响。最初在时间0时,将0.05μg/ml浓度的rSEMA4D加入内腔中。以各12小时的间隔,将rSEMA4D的浓度提高10倍,例如,12小时时为0.5μg/ml,24小时时为5.0μg/ml,而36小时时为50.0μg/ml。在各间隔之间和各间隔的过程中获得TEER测量值作为不同rSEMA4D浓度下BBB渗透性变化的反映。总体上,在0.05μg/ml rSEMA4D下,BBB的渗透性保持相对稳定。从0.5μg/ml开始,增加浓度的rSEMA4D(即,0.5μg/ml、5μg/ml和50μg/ml)导致降低的TEER测量值,反映出提高的内皮细胞层的渗透性。这些结果显示于图2中。

[0166] 抗体诱导的rSEMA4D处理BBB的渗透性降低。为了测量暴露于递增剂量的rSEMA4D后,抗SEMA4D抗体对BBB的作用,在48小时时加入250μg/ml浓度的VX15/2503。在72小时时获取TEER测量值。用VX15/2503处理导致了两个盒中BBB渗透性的总体降低(或电阻的提高)。这种渗透性的降低反映出BBB的恢复。结果显示于图2中。

[0167] 实施例2:在体外DIV-BBB模型中,测试抗SEMA4D结合分子(例如,抗体或其抗原结合片段、变体或衍生物),例如,VX15/2503,恢复SEMA4D诱导的BBB破坏后的BBB完整性的能力

[0168] 实验设计。进行了使用体外DIV-BBB模型的第二实验来研究SEMA4D和VX15/2503对

BBB完整性的影响。基础实验设计与以上实施例1和图1中所示的相似。两周时间，DIV-BBB盒经历了内皮细胞和星形细胞区室中的BBB形成。如TEER反映的BBB形成显示于图3和4中。

[0169] rSEMA4D诱导的BBB渗透性的提高。BBB形成后，通过将递增浓度的重组SEMA4D(rSEMA4D)以12小时的间隔加入一组三个盒中的第一个盒的内腔中来测量rSEMA4D对BBB完整性的影响，使其平衡(大约12小时/浓度)。最初在时间0时，将0.5μg/ml浓度的rSEMA4D加入内腔中。在每个间隔，rSEMA4D的浓度提高10倍，例如，12小时时为5μg/ml，24小时时为50μg/ml。在各个间隔之间获得TEER测量值作为不同rSEMA4D浓度下BBB渗透性变化的反映。总体上，递增浓度的rSEMA4D导致降低的TEER测量，其反映出提高的内皮细胞层的渗透性。这些结果显示于图3中。

[0170] 为了测试在非靶向内皮细胞层的抗原存在下BBB的完整性，以相同的12小时间隔将相似制备的重组蛋白对照(CTRL，C35蛋白)以等摩尔浓度(即，时间0时为0.25μg/ml，12小时时为2.5μg/ml，24小时时为25μg/ml)加入另外的两个对照盒中。与rSEMA4D的作用相反，CTRL蛋白没有诱导明显的TEER变化，反映出BBB的渗透性没有有意义的改变。然而，如果在加入最高浓度的CTRL蛋白后12小时，加入50.0μg/ml的rSEMA4D，诱导了与使用递增计量的rSEMA4D观察到的TEER降低相似的TEER快速降低。结果显示于图4中。

[0171] 抗体诱导的rSEMA4D处理BBB的渗透性的降低。在24小时时加入50.0μg/ml最终剂量的rSEMA4D后，测量了VX15/2503对TEER和BBB渗透性的影响。在图3中，在36小时时，将250μg/ml浓度的VX15/2503抗体加入接受了递增剂量的rSEMA4D的三个盒中的两个盒中，同时将相同浓度的同种型对照抗体加入剩余的一个接受了递增剂量的rSEMA4D的盒中。在随后的不同时间点获取TEER测量值。VX15/2503的处理导致TEER回升到实验开始时的峰值水平，反映出BBB渗透性的总体降低(即，BBB的恢复)。在接受了同种型对照的一个盒中，TEER水平保持在由rSEMA4D处理诱导的相对降低的水平，表明BBB渗透性没有有意义的降低。相似结果显示于图4中。在图4中，在48小时时，将250μg/ml浓度的VX15/2503抗体加入接受了最初对照重组C35蛋白接着50μg/ml rSEMA4D 12小时的两个盒中。VX15/2503的处理导致TEER回升到实验开始时的峰值水平，反映出BBB渗透性的总体降低(即，BBB的恢复)。

[0172] 实施例3：在体外DIV-BBB模型中，测试抗神经丛蛋白B1结合分子(例如，抗体或其抗原结合片段、变体或衍生物)恢复SEMA4D诱导BBB破坏后的BBB完整性的能力

[0173] 进行了另一项研究来测量抗神经丛蛋白B1抗体(MAB37491人神经丛蛋白-B1MAb(克隆559830)，R&D Systems)对BBB完整性的影响。该抗体阻断SEMA4D与神经丛蛋白-B1受体的结合。该研究的结果显示于图5中。如图5中所示，四个DIV-BBB盒中的人内皮细胞和星形细胞经历了与上述实验相似的BBB形成。BBB形成后，加入50.0μg/ml浓度的rSEMA4D，从而诱导BBB渗透性的提高(即，BBB的破坏)。加入rSEMA4D后，在6小时时将125μg/ml浓度的抗神经丛蛋白-B1抗体加入四个盒中的两个中，将250μg/ml浓度的VX15/2503抗体加入四个盒中的一个中，并且将250μg/ml浓度的同种型对照抗体加入剩余的盒中。在随后的不同时间点获取TEER测量值。VX15/2503或抗神经丛蛋白-B1抗体的处理导致TEER水平随两种试剂而提高。VX15/2503的处理在最后时间点导致TEER的提高比抗神经丛蛋白-B1抗体的处理更高一些。两种抗体的作用在所有其他时间点都是不可区分的。TEER的提高反映出在VX15/2503或抗神经丛蛋白-B1抗体存在下，BBB渗透性的整体降低(即，BBB的恢复)。在接受同种型对照的一个盒中，TEER水平保持在rSEMA4D处理诱导的相对降低的水平，表明BBB的渗透性没有

有意义的降低。应当认识到也可以使用VX15/2503和抗神经丛蛋白-B1的组合来进行处理。

[0174] 实施例4:在体外DIV-BBB模型中,测试了抗SEMA4D结合分子(例如,抗体或其抗原结合片段、变体或衍生物),例如,VX15/2503,恢复由激活的PBMC和流动停止诱导的BBB破坏后的BBB完整性的能力

[0175] 实验设计。进行了使用体外DIV-BBB模型的另一项实验来研究通过激活的外周血单核细胞(PBMC)和流动停止诱导的BBB破坏后,VX15/2503对恢复BBB完整性的作用。在两周时间内,两个DIV-BBB盒经历了内皮细胞和星形细胞区室中的BBB形成。

[0176] 激活的PBMC诱导的BBB渗透性的提高。BBB形成后,测量了激活的PBMC对BBB完整性的作用。PBMC用PMA/离子霉素(ionomycin)激活2小时,然后以10^6/ml的浓度加入两个盒的内腔中。在加入激活的PBMC之前和之后,获得TEER测量值作为BBB渗透性变化的反映。总体上,将激活的PBMC以10^6/ml加入盒中导致了降低的TEER测量值,反映出提高的BBB渗透性。这些结果显示于图6中。

[0177] 将激活的PBMC加入盒中后大约2-4小时,进行流动停止1小时。在流动停止之前和之后获得TEER测量值作为BBB渗透性变化的反映。总体上,流动停止导致TEER测量值进一步的降低,反映出提高的BBB渗透性。这些结果也显示于图6中。

[0178] 抗体诱导的暴露于激活PBMC的BBB的渗透性降低。暴露于激活的PBMC和流动停止后,测量了VX15/2503对TEER和BBB渗透性的作用。将250μg/ml浓度的VX15/2503抗体加入接受了激活PBMC的两个盒中的一个中,同时将相同浓度的同种型对照抗体(同种型对照Ig,2269)加入剩余的盒中。在随后的不同时间点获取TEER测量值。如图6中所示,VX15/2503的处理导致TEER回升到实验开始时的峰值水平,反映出BBB渗透性的整体降低(即,BBB的恢复)。在接受了同种型对照抗体的盒中,TEER水平保持在激活的PBMC和流动停止处理诱导的相对降低的水平,表明BBB渗透性没有有意义的降低。

[0179] 实施例5:在体内EAE模型中,测试了抗SEMA4D分子(例如,抗体或其抗原结合片段、变体或衍生物),例如,VX15/2503,保护BBB完整性的能力

[0180] 在体内实验自体免疫脑脊髓炎(EAE)模型中测试了抗SEMA4D结合分子(例如,抗体或其抗原结合片段、变体或衍生物),例如,VX15/2503。

[0181] 在体内EAE模型中,通过检验如通过纤维蛋白原从血液渗透进入脑实质所反映的脑渗透性变化和通过检查内皮紧密连接蛋白(包括闭合蛋白-5)来研究BBB的破坏。在这个模型中,通过用PLP肽(139-151)进行免疫在小鼠中诱导了EAE。当然,本领域技术人员将理解,也可以使用其他EAE诱导蛋白(例如,髓磷脂抗原,例如髓磷脂-少突细胞糖蛋白肽35-55),并且为获得最高效率,这些诱导蛋白或肽可以在一个物种与另一种物种之间和在一个小鼠种系与另一种系之间是不同的,Steinman,L.Neuron 24:511-514(1999)。然后对蛋白(纤维蛋白原和闭合蛋白-5,其作为BBB破坏的标志物),将来自不同疾病阶段的动物中枢神经系统的组织切片进行免疫染色。

[0182] 实验设计。在体内EAE模型中,通过用CFA(完全弗氏佐剂)中的PLP肽(139-151)免疫12周大的SJL/J小鼠(10只小鼠/组)来诱导EAE。然后从诱导后7天用600μg抗SEMA4D抗体(VX15/2503抗体)或对照IgG每周处理小鼠一次。在诱导后11d(dpi),第一次观察到了神经学信号。在诱导后13天,在疾病急性期中,将每组4只小鼠处死并且制备腰脊髓样品用于组织病理学分析。为了检测样品中的BBB破坏,将这些样品针对纤维蛋白原和闭合蛋白-5进行

免疫染色。用于免疫染色的程序如下:将切片在PBS中清洗两次,然后在PBS 0.1%甘氨酸中孵育10min,在PBS 0.3%Triton X-100 10%山羊血清中封闭1h,并用封闭缓冲液中的一抗Abs在4℃下孵育过夜。对于闭合蛋白-5(CLN-5),在封闭前,将切片浸在EDTA,pH8,100℃中。所用的一抗为抗CLN-5(1:50)和抗纤维蛋白原(1:1,000)。在PBS 0.3%,Triton X-100中洗涤三次后,然后将切片在封闭缓冲液中的相关物种特异性二抗中,在25℃下孵育1h,所述二抗与AlexaFluor 488和/或AlexaFluor 594(1/100;Molecular Probes)偶联,再次洗涤三次,并且用4,6-二脒基-2-苯基吲哚(DAPI)复染。使用与Axiovert 200倒置荧光显微镜连接的Zeiss LSM 510META激光扫描共焦系统来检查所有样品并拍照。

[0183] 如下对小鼠的临床疾病进行评分:0=无症状;1=下垂的尾;2=后肢虚弱;4=前后肢虚弱;5=死亡。在诱导后11天时第一次观察到神经学信号。在用VX15/2503抗体处理的小鼠中,临床疾病达到了0.75的平均严重性评分,表示轻微的尾虚弱,而对照组小鼠的临床疾病达到了2.25的平均严重性评分,表示下肢轻瘫。

[0184] 诱导后13天时免疫染色的结果显示于图7A-7C中。正常情况下,纤维蛋白原不渗透血脑屏障(BBB)。在EAE中,随着BBB受损,在大脑物质中检测到了绿色纤维蛋白原染色(左图)。此外,作为构成BBB的紧密连接的成分的闭合蛋白-5(CLN-5,红色染色)的表达降低。对照组中的小鼠显示出降低的闭合蛋白-5表达和提高的纤维蛋白原血管外渗漏的水平,这与BBB的破坏相关。另一方面,在用VX15/2503抗体处理的小鼠中,维持了闭合蛋白-5的表达并且纤维蛋白原的渗漏显著减少。这些结果证明了这些处理的小鼠中VX15/2503抗体对抗BBB破坏的保护性作用,并且特别地证明了抗SEMA4D抗体怎样防止BBB破坏,防止纤维蛋白原的血管外渗漏(7A左图和7B中的定量),以及如通过红色染色所检测的保持闭合蛋白-5(7A右图和7C中的定量)。

[0185] 实施例6:SEMA4D对脑内皮细胞培养物中的紧密连接蛋白的作用

[0186] 实验设计。研究了用可溶性重组SEMA4D处理CNS源的内皮细胞后,关键内皮紧密连接蛋白闭合蛋白-5的表达。在这个模型中,分离了原代小鼠中枢神经系统(CNS)内皮培养物,并且涂布于6-孔基质胶(matrigel)覆盖的平板上(将从10个脑分离的MBCEC重悬浮于3ml原代内皮细胞培养基中,并且以250ul/孔涂布)。培养物在分离后7天时使用。用1ng/ml、10ng/ml或100ng/ml重组小鼠SEMA4D或100ng/ml小鼠VEGF-A(阳性对照)处理培养物24小时。然后将动物的内皮培养物进行SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)和针对闭合蛋白-5紧密连接蛋白和肌动蛋白加样对照的免疫印迹。扫描数据,并且使用ImageJ软件(NIH)进行光密度分析。

[0187] 免疫印迹的结果显示于图8中。如图8中所提供的,用100ng/ml重组SEMA4D处理的内皮细胞培养物显示出闭合蛋白-5蛋白表达的明显降低。用100ng/ml VEGF-A处理的内皮细胞培养物作为闭合蛋白-5下调的阳性对照进行测试。这证明了SEMA4D在调节BBB的关键紧密连接蛋白的表达中的重要作用。

[0188] 实施例7:在体内阿尔茨海默病(AD)模型中,测试了抗SEMA4D或抗神经丛蛋白B1结合分子(例如,抗体或其抗原结合片段、变体或衍生物)降低BBB渗透性的能力

[0189] 在各种神经炎性疾病的模型系统中测试抗SEMA4D或抗神经丛蛋白B1结合分子,例如,抗体或其抗原结合片段、变体或衍生物,例如,MAb 67(详细描述于US2010/0285036中,将其全部按引用并入本文中),所述模型系统包括但不限于体内实验性阿尔茨海默病(AD)

转基因小鼠模型APPSwDI/NOSC$^{-/-}$。通过将APP-Swedish-Dutch-Iowa突变小鼠与一氧化氮合酶敲除小鼠杂交来产生这些小鼠(Colton等,J Alzheimers Dis.15:571-587,2008;Van Nostrand等,Stroke 41:S135-S138,2010)。APPSwDI/NOSC$^{-/-}$小鼠产生年龄相关的神经血管淀粉样变性,具有破坏的BBB功能、实质内淀粉样斑块、小鼠tau过度磷酸化、神经炎症、神经元细胞死亡和认知缺陷。Wilcock等已经表明用β淀粉样蛋白指导主动免疫疗法处理APPSwDI/NOSC$^{-/-}$小鼠导致淀粉样蛋白沉积的显著降低,但具有提高的微出血发病率(Wilcock等,J Neurosci.29:7957-7965,2009)。

[0190] 在体内AD模型中,通过检查淀粉样蛋白沉积的免疫组织化学印记,tau过度磷酸化和BBB渗漏(纤维蛋白原),以及通过评价基于空间记忆的行为范式中的认知能力来研究AD的进展。在这个模型中,静脉内给予转基因小鼠30mg/kg浓度的MAb 67或对照Ig(Mab 2B8),从26周到38周大,总共13个剂量。

[0191] 最初在10-12周大时,将小鼠进行基线行为测试,例如,开场、RAWn和Barnes Maze测试,并且将达到活动性和学习/记忆标准的小鼠包括在追踪研究中。在38、39和40周大时,再次测量行为缺陷,并记录体重。将没有达到研究入组标准的小鼠处死。在41周终点时,将动物安乐死,并且将脑进行处理以用于针对可溶性和不溶性β淀粉样蛋白水平和沉积的生化和免疫组织学分析。在10、25和41周大时,在给药前、给药过程中和PK终点时收集血清。可以针对纤维蛋白原将来自不同疾病阶段的动物的中枢神经系统(CNS)的组织切片进行免疫染色,纤维蛋白原可以用作BBB破坏的标志物。

[0192] 鉴于之前的描述和相关附图中呈现的教导的益处,这些发明所述领域的技术人员将认识到本文中所示发明的许多变化和其他实施方案。因此,将理解本发明不限于公开的特定实施方案,并且变化和其他实施方案意图包括在所附权利要求和本文公开的实施方案列表的范围内。尽管本文中使用了特定术语,但它们只是以一般的和描述性的含义来使用,而不是为了限制的目的。

[0193] 本发明涉及以下各项:

[0194] 项1.一种降低患有神经炎性疾病的受试者中血脑屏障渗透性的方法,包括将有效量的与臂板蛋白-4D(SEMA4D)特异性结合的分离的结合分子施用于该受试者,由此降低所述受试者的血脑屏障渗透性。

[0195] 项2.一种维持或提高患有神经炎性疾病的受试者中闭合蛋白-5表达的方法,包括将有效量的与臂板蛋白-4D(SEMA4D)特异性结合的分离的结合分子施用于该受试者,其中所述结合分子维持或提高所述受试者的闭合蛋白-5表达。

[0196] 项3.项1或2的方法,其中所述结合分子抑制SEMA4D与神经丛蛋白-B1的相互作用。

[0197] 项4.一种降低患有神经炎性疾病的受试者中血脑屏障渗透性的方法,包括将有效量的特异性地抑制臂板蛋白4D(SEMA4D)与SEMA4D受体相互作用的分离的结合分子施用于该受试者,由此降低所述受试者的血脑屏障渗透性。

[0198] 项5.一种治疗患有神经炎性疾病的受试者的方法,包括将有效量的特异性地抑制臂板蛋白4D(SEMA4D)与SEMA4D受体相互作用的分离的结合分子施用于该受试者,其中所述结合分子降低血脑屏障的渗透性,由此治疗所述受试者。

[0199] 项6.项4或5的方法,其中所述SEMA4D受体是神经丛蛋白-B1。

[0200] 项7.项4-6中任一项的方法,其中所述结合分子特异性地结合SEMA4D或神经丛蛋

白-B1。

[0201] 项8.项1-7中任一项的方法，其中所述结合分子竞争性地抑制选自VX15/2503或67的参照单克隆抗体与SEMA4D的特异性结合。

[0202] 项9.一种降低患有神经炎性疾病的受试者中血脑屏障渗透性的方法，包括将有效量的与SEMA4D特异性结合的分离的结合分子施用于该受试者，其中所述结合分子竞争性地抑制选自VX15/2503或67的参照单克隆抗体与SEMA4D的特异性结合，由此降低所述受试者的血脑屏障渗透性。

[0203] 项10.项1-9中任一项的方法，其中所述结合分子特异性地结合与选自VX15/2503或67的参照单克隆抗体相同的SEMA4D表位。

[0204] 项11.项1-10中任一项的方法，其中所述结合分子包括抗体或其抗原结合片段。

[0205] 项12.项11的方法，其中所述抗体或其抗原结合片段包括可变重链(VH)和可变轻链(VL)，所述可变重链包括分别包含SEQ ID NO:6、7和8的VHCDR 1-3，且所述可变轻链包括分别包含SEQ ID NO:14、15和16的VLCDR 1-3。

[0206] 项13.项12的方法，其中所述抗体或其抗原结合片段是单克隆抗体VX15/2503或67。

[0207] 项14.项7的方法，其中所述结合分子特异性地结合神经丛蛋白-B1。

[0208] 项15.项14的方法，其中所述结合分子竞争性地抑制SEMA4D与神经丛蛋白-B1的结合。

[0209] 项16.项14或15的方法，其中所述结合分子是抗神经丛蛋白-B1抗体或其抗原结合片段。

[0210] 项17.一种治疗患有神经炎性疾病的受试者的方法，包括将有效量的与臂板蛋白-4D(SEMA4D)特异性结合的分离的结合分子和与神经丛蛋白-B1特异性结合的分离的结合分子施用于该受试者，其中所述SEMA4D和神经丛蛋白-B1结合分子降低血脑屏障的渗透性，由此治疗所述受试者。

[0211] 项18.一种治疗患有神经炎性疾病的受试者的方法，包括将有效量的臂板蛋白4D(SEMA4D)与SEMA4D受体相互作用的抑制剂施用于该受试者，其中所述抑制剂降低血脑屏障的渗透性，由此治疗所述受试者。

[0212] 项19.项18的方法，其中所述抑制剂选自抗SEMA4D结合分子、抗神经丛蛋白B1结合分子、SEMA4D的小分子抑制剂或SEMA4D受体的小分子抑制剂。

[0213] 项20.项1-19中任一项的方法，其中所述神经炎性疾病选自多发性硬化、肌萎缩性侧索硬化、癫痫、阿尔茨海默病、帕金森病、脑膜炎、脑水肿和脑创伤。

序列表

<110> 瓦西尼斯公司.
SMITH, Ernest S.

ZAUDERER, Maurice

<120> 臂板蛋白-4D 结合分子用于调节血脑屏障渗透性的用途

<130> 1843.068PC03/EJH/BNC

<140> 待指定
<141> 与本文一起

[0001]

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

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

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

<160> 40

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1
<211> 862
<212> PRT
<213> 智人

<400> 1

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

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

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

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

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

[0002]

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

[0003]

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

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

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

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

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

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

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

Ala Cys Ile Asp Ser Glu Ala Arg Ala Ala Asn Tyr Thr Ser Ser Leu
370 375 380

Asn Leu Pro Asp Lys Thr Leu Gln Phe Val Lys Asp His Pro Leu Met
385 390 395 400

Asp Asp Ser Val Thr Pro Ile Asp Asn Arg Pro Arg Leu Ile Lys Lys
405 410 415

Asp Val Asn Tyr Thr Gln Ile Val Val Asp Arg Thr Gln Ala Leu Asp
420 425 430

[0004]

Gly Thr Val Tyr Asp Val Met Phe Val Ser Thr Asp Arg Gly Ala Leu
435 440 445

His Lys Ala Ile Ser Leu Glu His Ala Val His Ile Ile Glu Glu Thr
450 455 460

Gln Leu Phe Gln Asp Phe Glu Pro Val Gln Thr Leu Leu Leu Ser Ser
465 470 475 480

Lys Lys Gly Asn Arg Phe Val Tyr Ala Gly Ser Asn Ser Gly Val Val
485 490 495

Gln Ala Pro Leu Ala Phe Cys Gly Lys His Gly Thr Cys Glu Asp Cys
500 505 510

Val Leu Ala Arg Asp Pro Tyr Cys Ala Trp Ser Pro Pro Thr Ala Thr
515 520 525

Cys Val Ala Leu His Gln Thr Glu Ser Pro Ser Arg Gly Leu Ile Gln
530 535 540

Glu Met Ser Gly Asp Ala Ser Val Cys Pro Asp Lys Ser Lys Gly Ser
545 550 555 560

Tyr Arg Gln His Phe Phe Lys His Gly Gly Thr Ala Glu Leu Lys Cys
565 570 575

Ser Gln Lys Ser Asn Leu Ala Arg Val Phe Trp Lys Phe Gln Asn Gly
580 585 590

Val Leu Lys Ala Glu Ser Pro Lys Tyr Gly Leu Met Gly Arg Lys Asn
595 600 605

[0005] Leu Leu Ile Phe Asn Leu Ser Glu Gly Asp Ser Gly Val Tyr Gln Cys
610 615 620

Leu Ser Glu Glu Arg Val Lys Asn Lys Thr Val Phe Gln Val Val Ala
625 630 635 640

Lys His Val Leu Glu Val Lys Val Val Pro Lys Pro Val Val Ala Pro
645 650 655

Thr Leu Ser Val Val Gln Thr Glu Gly Ser Arg Ile Ala Thr Lys Val
660 665 670

Leu Val Ala Ser Thr Gln Gly Ser Ser Pro Pro Thr Pro Ala Val Gln
675 680 685

Ala Thr Ser Ser Gly Ala Ile Thr Leu Pro Pro Lys Pro Ala Pro Thr
690 695 700

Gly Thr Ser Cys Glu Pro Lys Ile Val Ile Asn Thr Val Pro Gln Leu
705 710 715 720

His Ser Glu Lys Thr Met Tyr Leu Lys Ser Ser Asp Asn Arg Leu Leu
725 730 735

Met Ser Leu Phe Leu Phe Phe Phe Val Leu Phe Leu Cys Leu Phe Phe
740 745 750

Tyr Asn Cys Tyr Lys Gly Tyr Leu Pro Arg Gln Cys Leu Lys Phe Arg
755 760 765

Ser Ala Leu Leu Ile Gly Lys Lys Lys Pro Lys Ser Asp Phe Cys Asp
770 775 780

Arg Glu Gln Ser Leu Lys Glu Thr Leu Val Glu Pro Gly Ser Phe Ser
[0006] 785 790 795 800

Gln Gln Asn Gly Glu His Pro Lys Pro Ala Leu Asp Thr Gly Tyr Glu
805 810 815

Thr Glu Gln Asp Thr Ile Thr Ser Lys Val Pro Thr Asp Arg Glu Asp
820 825 830

Ser Gln Arg Ile Asp Asp Leu Ser Ala Arg Asp Lys Pro Phe Asp Val
835 840 845

Lys Cys Glu Leu Lys Phe Ala Asp Ser Asp Ala Asp Gly Asp
850 855 860

<210> 2
<211> 861
<212> PRT

〈213〉 鼠科

〈400〉 2

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

Val Leu Arg Thr Ala Val Ala Phe Ala Pro Val Pro Arg Leu Thr Trp
20 25 30

Glu His Gly Glu Val Gly Leu Val Gln Phe His Lys Pro Gly Ile Phe
35 40 45

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

[0007]

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Pro Ser Phe Val Phe Ala Asp Val Ile Gln Lys Ser Pro Asp Gly Pro
210 215 220

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

[0008]

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

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

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

Val Phe Asn Ile Leu Gln Asp Val Phe Val Leu Arg Ala Pro Gly Leu
290 295 300

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

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

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

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

Ala Cys Ile Asp Ser Glu Ala Arg Ala Ala Asn Tyr Thr Ser Ser Leu
370 375 380

Asn Leu Pro Asp Lys Thr Leu Gln Phe Val Lys Asp His Pro Leu Met
385 390 395 400

Asp Asp Ser Val Thr Pro Ile Asp Asn Arg Pro Lys Leu Ile Lys Lys
405 410 415

[0009]

Asp Val Asn Tyr Thr Gln Ile Val Val Asp Arg Thr Gln Ala Leu Asp
420 425 430

Gly Thr Phe Tyr Asp Val Met Phe Ile Ser Thr Asp Arg Gly Ala Leu
435 440 445

His Lys Ala Val Ile Leu Thr Lys Glu Val His Val Ile Glu Glu Thr
450 455 460

Gln Leu Phe Arg Asp Ser Glu Pro Val Leu Thr Leu Leu Leu Ser Ser
465 470 475 480

Lys Lys Gly Arg Lys Phe Val Tyr Ala Gly Ser Asn Ser Gly Val Val
485 490 495

Gln Ala Pro Leu Ala Phe Cys Glu Lys His Gly Ser Cys Glu Asp Cys
500 505 510

Val Leu Ala Arg Asp Pro Tyr Cys Ala Trp Ser Pro Ala Ile Lys Ala
515 520 525

Cys Val Thr Leu His Gln Glu Glu Ala Ser Ser Arg Gly Trp Ile Gln
530 535 540

Asp Met Ser Gly Asp Thr Ser Ser Cys Leu Asp Lys Ser Lys Glu Ser
545 550 555 560

Phe Asn Gln His Phe Phe Lys His Gly Gly Thr Ala Glu Leu Lys Cys
565 570 575

Phe Gln Lys Ser Asn Leu Ala Arg Val Val Trp Lys Phe Gln Asn Gly
580 585 590

[0010] Glu Leu Lys Ala Ala Ser Pro Lys Tyr Gly Phe Val Gly Arg Lys His
595 600 605

Leu Leu Ile Phe Asn Leu Ser Asp Gly Asp Ser Gly Val Tyr Gln Cys
610 615 620

Leu Ser Glu Glu Arg Val Arg Asn Lys Thr Val Ser Gln Leu Leu Ala
625 630 635 640

Lys His Val Leu Glu Val Lys Met Val Pro Arg Thr Pro Pro Ser Pro
645 650 655

Thr Ser Glu Asp Ala Gln Thr Glu Gly Ser Lys Ile Thr Ser Lys Met
660 665 670

Pro Val Ala Ser Thr Gln Gly Ser Ser Pro Pro Thr Pro Ala Leu Trp
675 680 685

Ala Thr Ser Pro Arg Ala Ala Thr Leu Pro Pro Lys Ser Ser Ser Gly
690 695 700

Thr Ser Cys Glu Pro Lys Met Val Ile Asn Thr Val Pro Gln Leu His
705 710 715 720

Ser Glu Lys Thr Val Tyr Leu Lys Ser Ser Asp Asn Arg Leu Leu Met
725 730 735

Ser Leu Leu Leu Phe Ile Phe Val Leu Phe Leu Cys Leu Phe Ser Tyr
740 745 750

Asn Cys Tyr Lys Gly Tyr Leu Pro Gly Gln Cys Leu Lys Phe Arg Ser
755 760 765

[0011]

Ala Leu Leu Leu Gly Lys Lys Thr Pro Lys Ser Asp Phe Ser Asp Leu
770 775 780

Glu Gln Ser Val Lys Glu Thr Leu Val Glu Pro Gly Ser Phe Ser Gln
785 790 795 800

Gln Asn Gly Asp His Pro Lys Pro Ala Leu Asp Thr Gly Tyr Glu Thr
805 810 815

Glu Gln Asp Thr Ile Thr Ser Lys Val Pro Thr Asp Arg Glu Asp Ser
820 825 830

Gln Arg Ile Asp Glu Leu Ser Ala Arg Asp Lys Pro Phe Asp Val Lys
835 840 845

Cys Glu Leu Lys Phe Ala Asp Ser Asp Ala Asp Gly Asp
850 855 860

<210> 3
<211> 30
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 多核苷酸抗-CD100 VH CDR1

<400> 3
ggctacagct tcagcgacta ctacatgcac 30

<210> 4
<211> 51
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 多核苷酸抗-CD100 VH CDR2

<400> 4
[0012] cagattaatc ctaccactgg cggcgctagc tacaaccaga agttcaaggg c 51

<210> 5
<211> 27
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 多核苷酸抗-CD100 VH CDR3

<400> 5
tattactacg gcagacactt cgatgtc 27

<210> 6
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 多肽抗-CD100 VH CDR1

<400> 6

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

<210> 7
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 多肽抗-CD100 VH CDR2

<400> 7

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

Gly

[0013]

<210> 8
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 多肽抗-CD100 VH CDR3

<400> 8

Tyr Tyr Tyr Gly Arg His Phe Asp Val
1 5

<210> 9
<211> 118
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 多肽抗-CD100 VH 2503

<400> 9

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

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

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

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

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

[0014]

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

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

Thr Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 10
<211> 118
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 多肽抗-CD100 VH 67

<400> 10

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

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

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

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

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

[0015]

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

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

Thr Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 11
<211> 45
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 多核苷酸抗-CD100 VL CDR1

<400> 11
aaggccagcc aaagcgtgga ttatgatggc gatagctata tgaac 45

<210> 12
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 多核苷酸抗-CD100 VL CDR2

<400> 12
gctgcatcca atctggaaag c 21

<210> 13
<211> 27
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 多核苷酸抗-CD100 VL CDR3

[0016]

<400> 13
cagcaaagca atgaggatcc ctacacc 27

<210> 14
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 多肽抗-CD100 VL CDR1

<400> 14

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

<210> 15
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 多肽抗-CD100 VL CDR2

<400> 15

Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser
1 5

<210> 16
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 多肽抗-CD100 VL CDR3

<400> 16

Gln Gln Ser Asn Glu Asp Pro Tyr Thr
1 5

[0017]

<210> 17
<211> 111
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 多肽抗-CD100 VL 2503

<400> 17

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

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

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

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

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

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

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

<210> 18
<211> 111
<212> PRT
<213> 人工的

[0018] <220>
<223> 多肽抗-CD100 VL 67

<400> 18

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

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

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

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

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile His

65 70 75 80

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

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

<210> 19
<211> 354
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 多核苷酸抗-CD100 VH 2503

<400> 19
caggtgcagc tggtgcagag cggcgctgag gtgaagaagc ctggcagcag cgtgaaggtc 60

[0019]

tcctgcaagg ctagcggcta cagcttcagc gactactaca tgcactgggt gagacaggcc 120

cctggccaag gcctggagtg gatgggccag attaatccta ccactggcgg cgctagctac 180

aaccagaagt tcaagggcaa ggccaccatt accgtggaca aaagcaccag cacagcctac 240

atggagctga gcagcctgag aagcgaggac accgccgtgt attactgtgc cagatattac 300

tacggcagac acttcgatgt ctggggccaa ggcaccacgg tcaccgtctc ttca 354

<210> 20
<211> 354
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 多核苷酸抗-CD100 VH 67

<400> 20
caggtccagc tgcagcagtc tggacctgag ctggtgaagc ctggggcttc agtgaagata 60

tcctgcaagg cttctggtta ctcattcagt gactactaca tgcactgggt gaagcaaagt 120

cctgaaaata gtcttgagtg gattggacag attaatccta ccactggggg tgctagctac 180

aaccagaagt tcaagggcaa ggccacatta actgtagata aatcctccag cacagcctac 240

atgcagctca agagcctgac atctgaagag tctgcagtct attactgtac aagatattac 300

tacggtagac acttcgatgt ctggggccaa gggaccacgg tcaccgtttc ctca 354

<210> 21
<211> 333
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 多核苷酸抗-CD100 VL 2503

<400> 21
gacatcgtga tgacccagag cccagacagc ctggctgtga gcctgggcga gagggccacc 60

[0020]

atcaactgca aggccagcca aagcgtggat tatgatggcg atagctatat gaactggtac 120

cagcagaaac caggccagcc tcctaagctg ctgatttacg ctgcatccaa tctggaaagc 180

ggcgtgcctg acagattcag cggcagcggc agcggcacag atttcactct gaccatcagc 240

agcctgcagg ctgaagatgt ggcagtgtat tactgtcagc aaagcaatga ggatccctac 300

accttcggcc aagggaccaa gctcgagatc aaa 333

<210> 22
<211> 333
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 多核苷酸抗-CD100 VL 67

<400> 22
gacattgtga tgacccagtc tccagcttct ttggctgtgt ctctagggca gagggccacc 60

atctcctgca aggccagcca aagtgttgat tatgatggtg atagttatat gaactggtac 120

caacagaaac caggacagcc acccaaactc ctcatctatg ctgcatccaa tctagaatct 180

gggatcccag ccaggtttag tggcagtggg tctgggacag acttcaccct caacatccat 240

cctgtggagg aggaggatgc tgcaacctat tactgtcagc aaagtaatga ggatccgtac 300

acgttcggag gggggaccaa gctcgagatc aaa 333

<210> 23
<211> 2586
<212> DNA
<213> 智人

<400> 23
atgaggatgt gcacccccat taggggggctg ctcatggccc ttgcagtgat gtttgggaca 60

gcgatggcat ttgcacccat accccggatc acctgggagc acagagaggt gcacctggtg 120

[0021] cagtttcatg agccagacat ctacaactac tcagccttgc tgctgagcga ggacaaggac 180

accttgtaca taggtgcccg ggaggcggtc ttcgctgtga acgcactcaa catctccgag 240

aagcagcatg aggtgtattg gaaggtctca gaagacaaaa aagcaaaatg tgcagaaaag 300

gggaaatcaa aacagacaga gtgcctcaac tacatccggg tgctgcagcc actcagcgcc 360

acttcccttt acgtgtgtgg gaccaacgca ttccagccgg cctgtgacca cctgaactta 420

acatccttta agtttctggg gaaaaatgaa gatggcaaag gaagatgtcc ctttgaccca 480

gcacacagct acacatccgt catggttgat ggagaacttt attcggggac gtcgtataat 540

tttttgggaa gtgaacccat catctcccga aattcttccc acagtcctct gaggacagaa 600

tatgcaatcc cttggctgaa cgagcctagt ttcgtgtttg ctgacgtgat ccgaaaaagc 660

ccagacagcc ccgacggcga ggatgacagg gtctacttct tcttcacgga ggtgtctgtg 720

gagtatgagt ttgtgttcag ggtgctgatc ccacggatag caagagtgtg caaggggac 780

cagggcggcc tgaggacctt gcagaagaaa tggacctcct tcctgaaagc ccgactcatc 840

tgctcccggc cagacagcgg cttggtcttc aatgtgctgc gggatgtctt cgtgctcagg 900

tccccgggcc tgaaggtgcc tgtgttctat gcactcttca ccccacagct gaacaacgtg 960

gggctgtcgg cagtgtgcgc ctacaacctg tccacagccg aggaggtctt ctcccacggg 1020

aagtacatgc agagcaccac agtggagcag tcccacacca agtgggtgcg ctataatggc 1080

ccggtaccca agccgcggcc tggagcgtgc atcgacagcg aggcacgggc cgccaactac 1140

accagctcct tgaatttgcc agacaagacg ctgcagttcg ttaaagacca ccctttgatg 1200

gatgactcgg taaccccaat agacaacagg cccaggttaa tcaagaaaga tgtgaactac 1260

acccagatcg tggtggaccg gacccaggcc ctggatggga ctgtctatga tgtcatgttt 1320

gtcagcacag accggggagc tctgcacaaa gccatcagcc tcgagcacgc tgttcacatc 1380

atcgaggaga cccagctctt ccaggacttt gagccagtcc agaccctgct gctgtcttca 1440

aagaagggca acaggtttgt ctatgctggc tctaactcgg gcgtggtcca ggccccgctg 1500

[0022]

gccttctgtg ggaagcacgg cacctgcgag gactgtgtgc tggcgcggga cccctactgc 1560

gcctggagcc cgcccacagc gacctgcgtg gctctgcacc agaccgagag ccccagcagg 1620

ggtttgattc aggagatgag cggcgatgct tctgtgtgcc cggataaaag taaaggaagt 1680

taccggcagc atttttttcaa gcacggtggc acagcggaac tgaaatgctc ccaaaaatcc 1740

aacctggccc gggtcttttg gaagttccag aatggcgtgt tgaaggccga gagccccaag 1800

tacggtctta tgggcagaaa aaacttgctc atcttcaact tgtcagaagg agacagtggg 1860

gtgtaccagt gcctgtcaga ggagagggtt aagaacaaaa cggtcttcca agtggtcgcc 1920

aagcacgtcc tggaagtgaa ggtggttcca aagcccgtag tggcccccac cttgtcagtt 1980

gttcagacag aaggtagtag gattgccacc aaagtgttgg tggcatccac ccaagggtct 2040

tctcccccaa ccccagccgt gcaggccacc tcctccgggg ccatcaccct tcctcccaag 2100

cctgcgccca ccggcacatc ctgcgaacca aagatcgtca tcaacacggt cccccagctc 2160

cactcggaga aaaccatgta tcttaagtcc agcgacaacc gcctcctcat gtccctcttc 2220

ctcttcttct ttgttctctt cctctgcctc tttttctaca actgctataa gggatacctg 2280

cccagacagt gcttgaaatt ccgctcggcc ctactaattg ggaagaagaa gcccaagtca 2340

gatttctgtg accgtgagca gagcctgaag gagacgttag tagagccagg gagcttctcc 2400

cagcagaatg gggagcaccc caagccagcc ctggacaccg gctatgagac cgagcaagac 2460

accatcacca gcaaagtccc cacggatagg gaggactcac agaggatcga cgacctttct 2520

gccagggaca agcccctttga cgtcaagtgt gagctgaagt tcgctgactc agacgcagat 2580

ggagac 2586

<210> 24
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工的

[0023]

<220>
<223> 蛋白脂质蛋白 PLP(139-151)的肽表位

<400> 24

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

<210> 25
<211> 118
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 多肽抗-CD100 VH 76

<400> 25

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

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

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

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

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

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

[0024]

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

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 26
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 多肽抗-CD100 VH 76 CDR1

<400> 26

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

<210> 27
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 多肽抗-CD100 VH 76 CDR2

<400> 27

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

Asp

<210> 28
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工的

[0025]

<220>
<223> 多肽抗-CD100 VH 76 CDR3

<400> 28

Asp Pro Tyr Gly Trp Thr Met Asp Ser
1 5

<210> 29
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 多肽抗-CD100 VL 76

<400> 29

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

Asp Thr Ile Thr Ile Thr Cys His Ala Ser Gln Asn Ile Asn Val Trp
20 25 30

Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Asn Ile Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Lys Ala Ser Asn Leu His Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Gly Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Gln Ser Tyr Pro Tyr
85 90 95

[0026] Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 30
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 多肽抗-CD100 VL 76 CDR1

<400> 30

His Ala Ser Gln Asn Ile Asn Val Trp Leu Ser
1 5 10

<210> 31
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 多肽抗-CD100 VL 76 CDR2

<400> 31

Lys Ala Ser Asn Leu His Thr
1 5

<210> 32
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 多肽抗-CD100 VL 76 CDR3

<400> 32

Gln Gln Gly Gln Ser Tyr Pro Tyr Thr
1 5

[0027]

<210> 33
<211> 354
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 多核苷酸抗-CD100 VH 76

<400> 33

caggtccagc tgcagcagtc tggggctgaa ctggcaaaac ctggggcctc agtgaagatg 60

tcctgcaagg cttctggcta cacctttact aggtactgga tgcactgggt aaaacagagg 120

cctggacagg gtctggaatg gattggatac attaatccta gcactggtta ttctgattac 180

aatcagaagt tcaaggacaa ggccacattg actgcagaca aatcctccag cacagcctac 240

atgcaactga gcagcctgac atctgaggac tctgcagtct attactgtgc aagagacccc 300

tacggctgga ctatggactc ctggggccaa gggactctgg tcaccgtctc ctca 354

<210> 34
<211> 30
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 多核苷酸抗-CD100 VH 76 CDR1

<400> 34
ggctacacct ttactaggta ctggatgcac 30

<210> 35
<211> 51
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 多核苷酸抗-CD100 VH 76 CDR2

<400> 35
[0028] tacattaatc ctagcactgg ttattctgat tacaatcaga agttcaagga c 51

<210> 36
<211> 27
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 多核苷酸抗-CD100 VH 76 CDR3

<400> 36
gacccctacg gctggactat ggactcc 27

<210> 37
<211> 321
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 多核苷酸抗-CD100 VL 76

<400> 37
gacatccaga tgacccagtc tccatccagt ctgtctgcat cccttggaga cacaattacc 60

atcacttgcc atgccagtca gaacattaat gtttggttaa gctggtacca gcagaaacca 120

ggaaatattc ctaaactatt gatctataag gcttccaact tgcacacagg cgtcccatca 180

aggtttagtg gcagtggatc tggaacaggt ttcacattaa ccatcagcag cctgcagcct 240

gaagacattg ccacttacta ctgtcaacag ggtcaaagtt atccgtacac gttcggaggg 300

gggaccaagc tcgagatcaa a 321

<210> 38
<211> 33
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 多核苷酸抗-CD100 VL 76 CDR1

[0029]

<400> 38
catgccagtc agaacattaa tgtttggtta agc 33

<210> 39
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 多核苷酸抗-CD100 VL 76 CDR2

<400> 39
aaggcttcca acttgcacac a 21

<210> 40
<211> 27
<212> DNA
<213> 人工的

<220>

<223> 多核苷酸抗-CD100 VL 76 CDR3

[0030]

<400> 40

caacagggtc aaagttatcc gtacacg 27

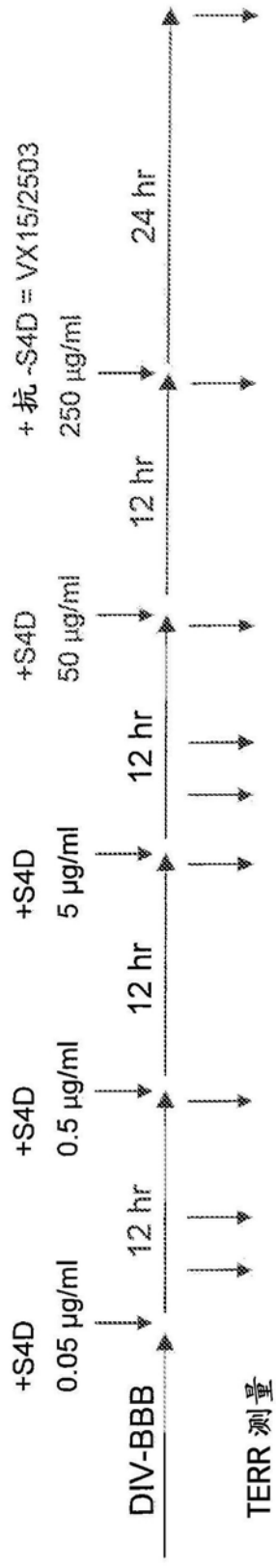

+S4D
0.05 µg/ml
12 hr
+S4D
0.5 µg/ml
12 hr
+S4D
5 µg/ml
12 hr
+S4D
50 µg/ml
12 hr
+抗-S4D = VX15/2503
250 µg/ml
24 hr
DIV-BBB
TERR 测量

图1

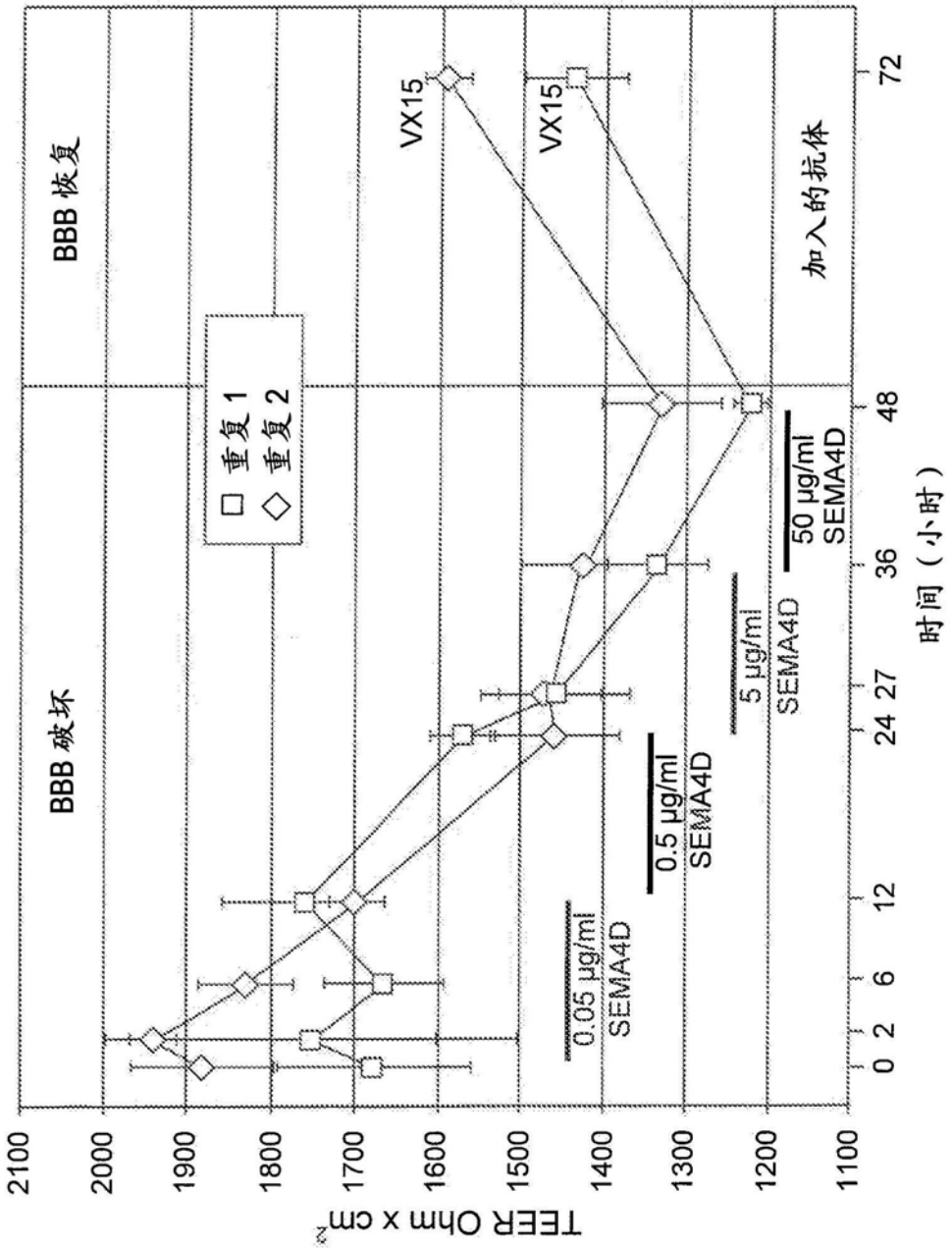

BBB 破坏
BBB 恢复
□ 重复 1
◇ 重复 2
VX15
VX15
加入的抗体
0.05 μg/ml SEMA4D
0.5 μg/ml SEMA4D
5 μg/ml SEMA4D
50 μg/ml SEMA4D
TEER Ohm x cm²
时间（小时）
2100
2000
1900
1800
1700
1600
1500
1400
1300
1200
1100
0 2 6 12 24 27 36 48 72

图2

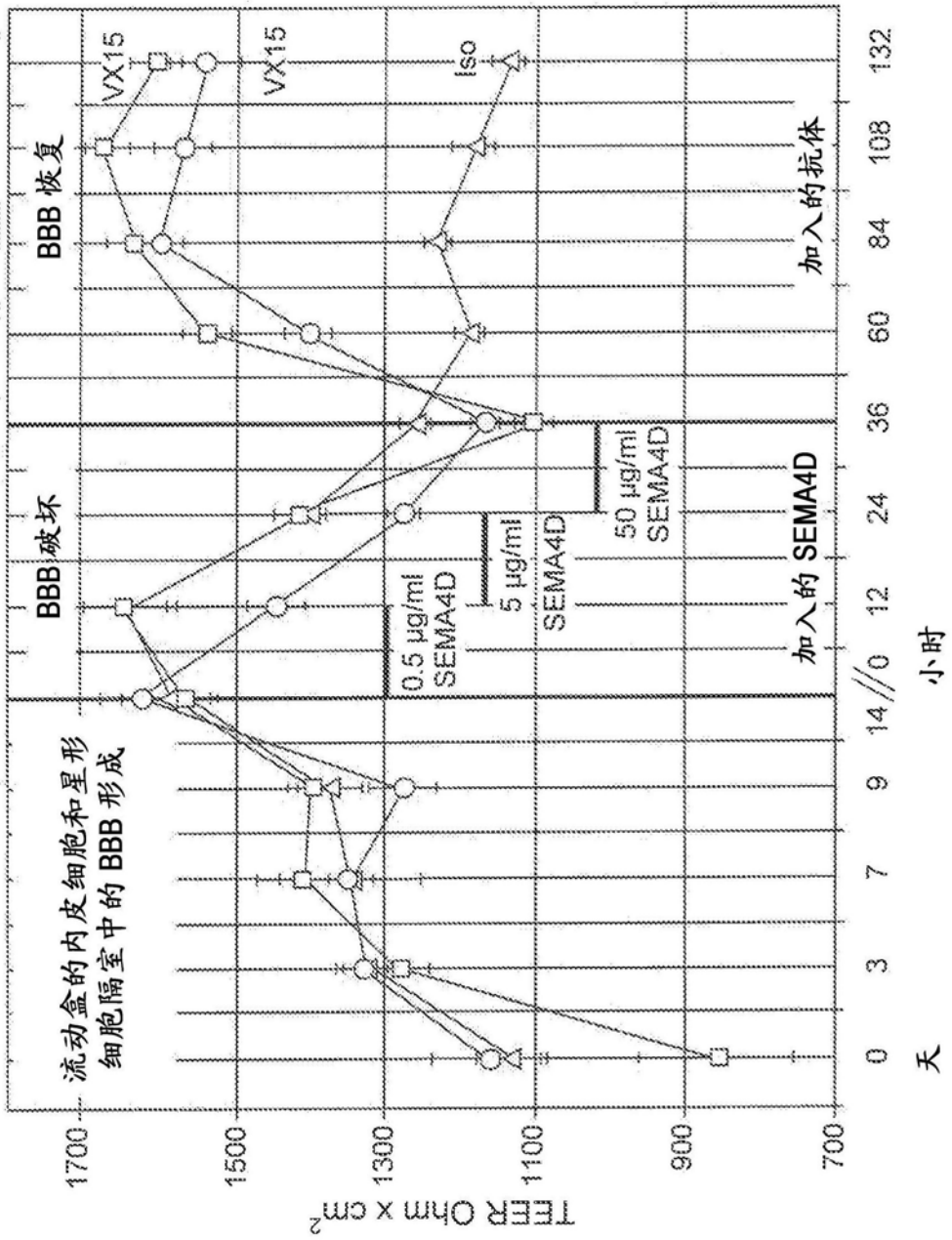

流动盒的内皮细胞和星形细胞隔室中的 BBB 形成
BBB 破坏
BBB 恢复
VX15
VX15
Iso
0.5 µg/ml SEMA4D
5 µg/ml SEMA4D
50 µg/ml SEMA4D
加入的 SEMA4D
加入的抗体
TEER Ohm x cm²
1700
1500
1300
1100
900
700
0
3
7
9
14
0
12
24
36
60
84
108
132
天
小时

图3

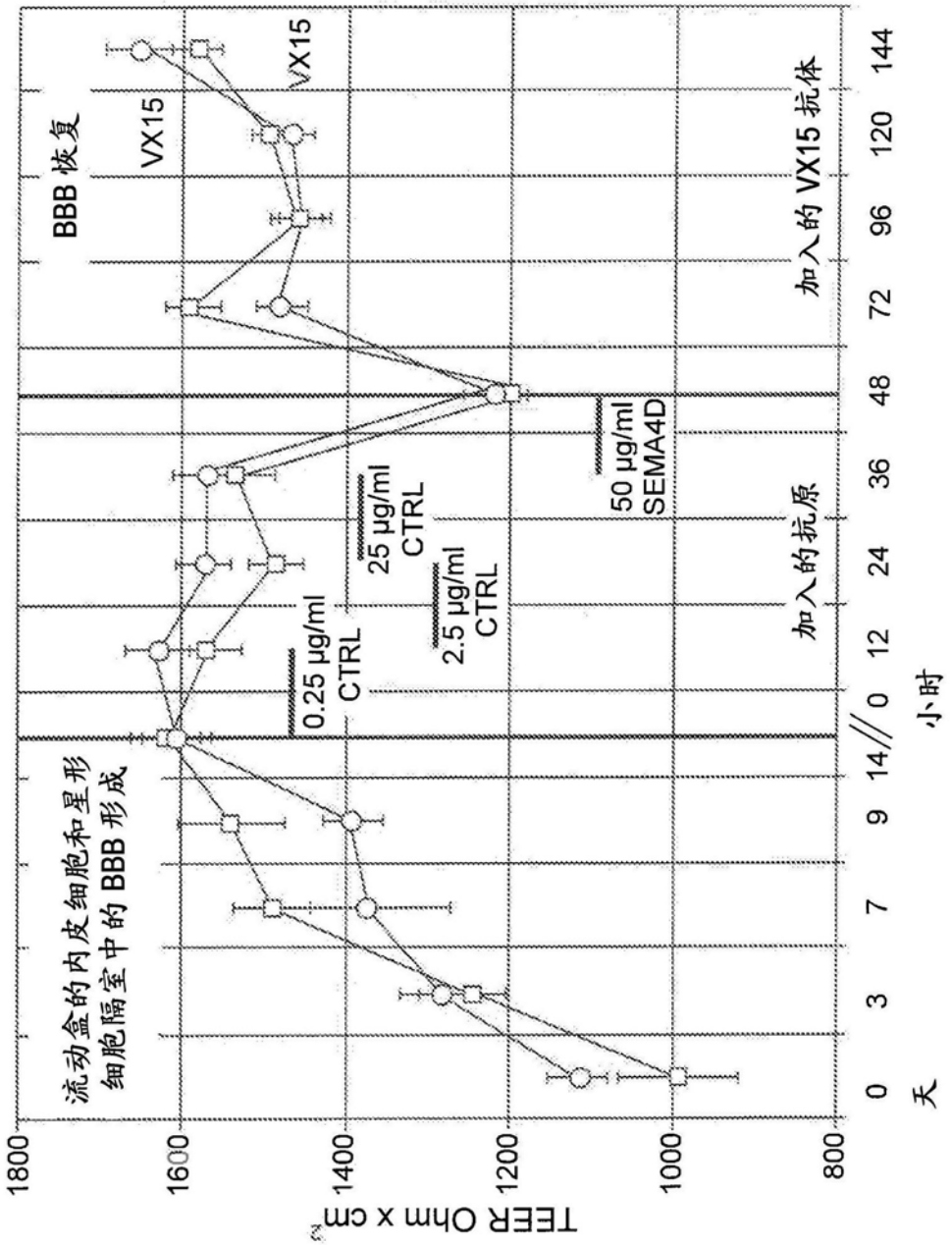

流动盒的内皮细胞和星形细胞隔室中的 BBB 形成
BBB 恢复
VX15
VX15
0.25 µg/ml CTRL
25 µg/ml CTRL
2.5 µg/ml CTRL
50 µg/ml SEMA4D
加入的抗原
加入的 VX15 抗体
TEER Ohm x cm²
1800
1600
1400
1200
1000
800
0
3
7
9
14
0
12
24
36
48
72
96
120
144
天
小时

图4

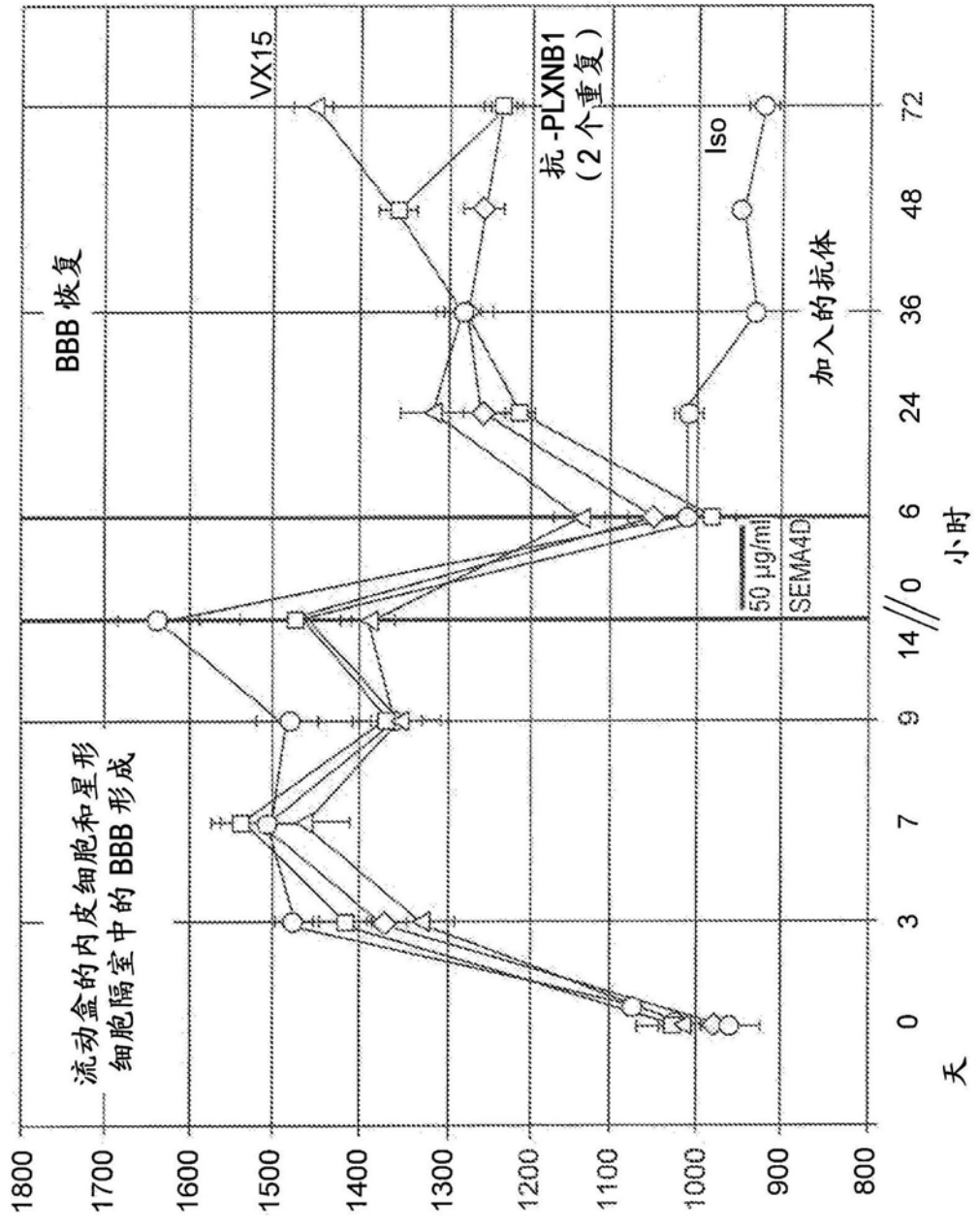

流动盒的内皮细胞和星形细胞隔室中的 BBB 形成
BBB 恢复
VX15
抗 -PLXNB1（2 个重复）
Iso
加入的抗体
50 µg/ml SEMA4D
1800
1700
1600
1500
1400
1300
1200
1100
1000
900
800
0 3 7 9 14 0 6 24 36 48 72
天
小时

图5

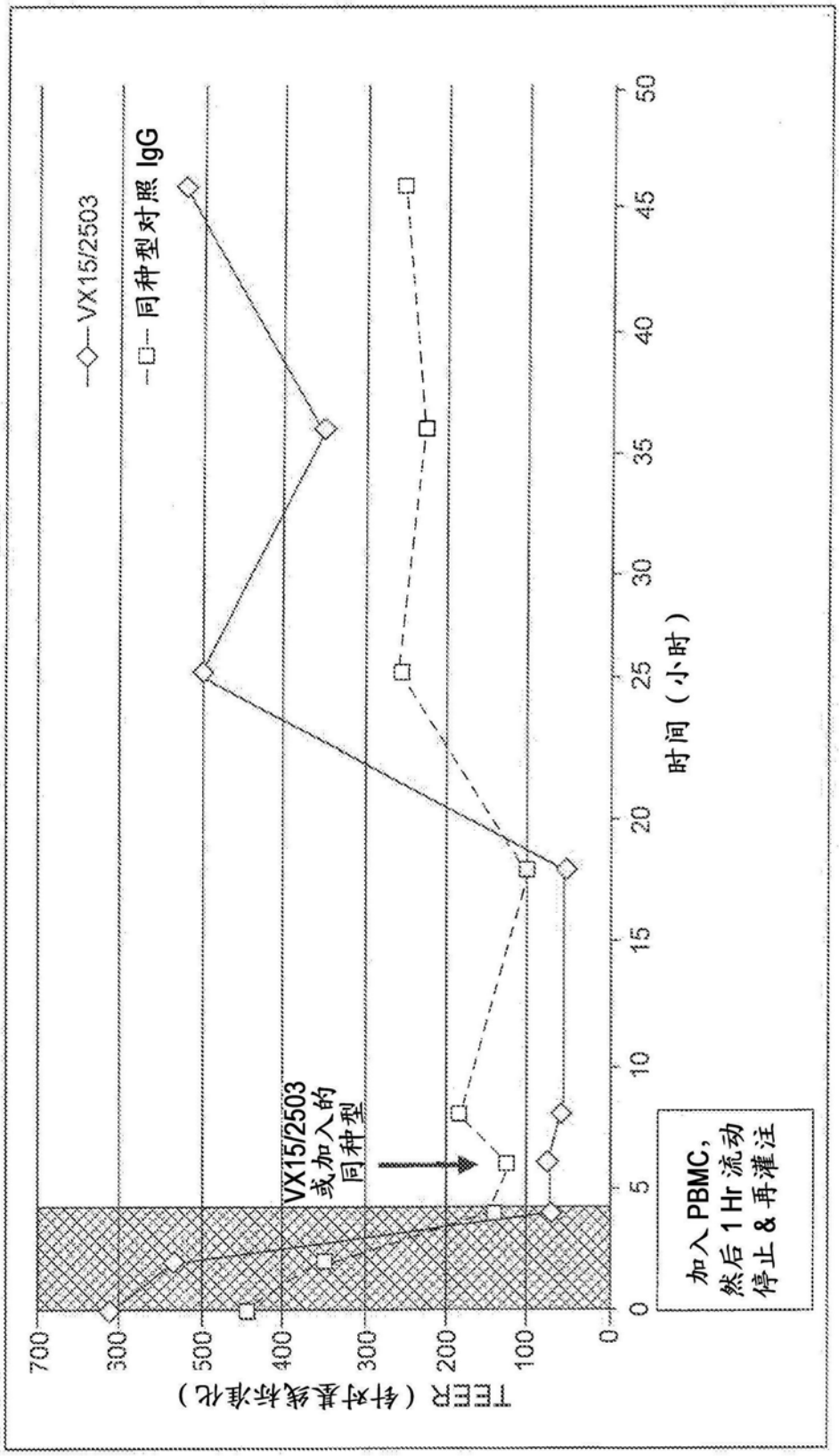

VX15/2503
同种型对照 IgG
TEER（针对基线标准化）
时间（小时）
VX15/2503
或加入的
同种型
加入 PBMC，
然后 1 Hr 流动
停止 & 再灌注
700
300
500
400
300
200
100
0
0
5
10
15
20
25
30
35
40
45
50

图6

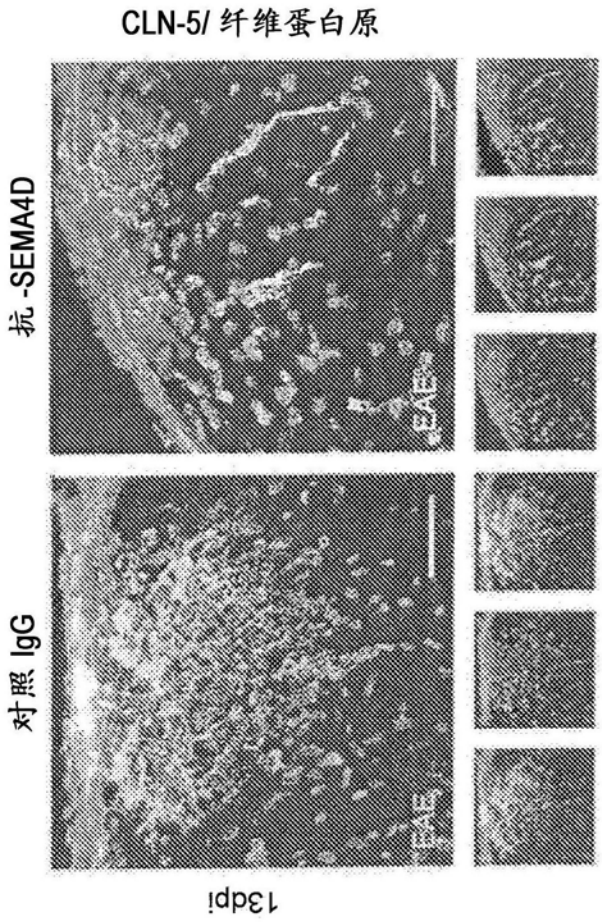

CLN-5/纤维蛋白原
抗-SEMA4D
对照 IgG
EAE
EAE
13dpi

图7A

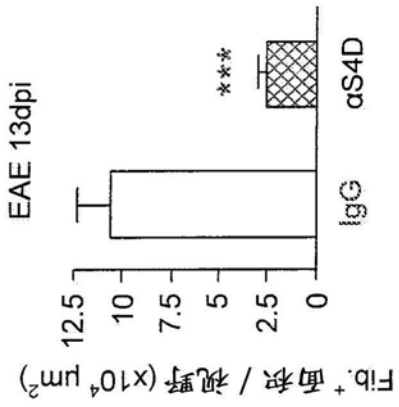

EAE 13dpi
***
IgG
αS4D
12.5
10
7.5
5
2.5
0
Fib.+ 面积 / 视野 (x10⁴ μm²)

图7B

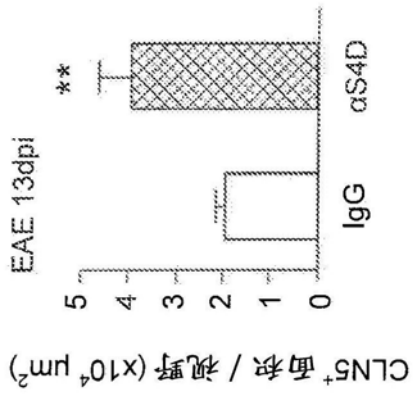

CLN5+ 面积 / 视野 (x10⁴ μm²)
5
4
3
2
1
0
EAE 13dpi
**
IgG
αS4D

图7C

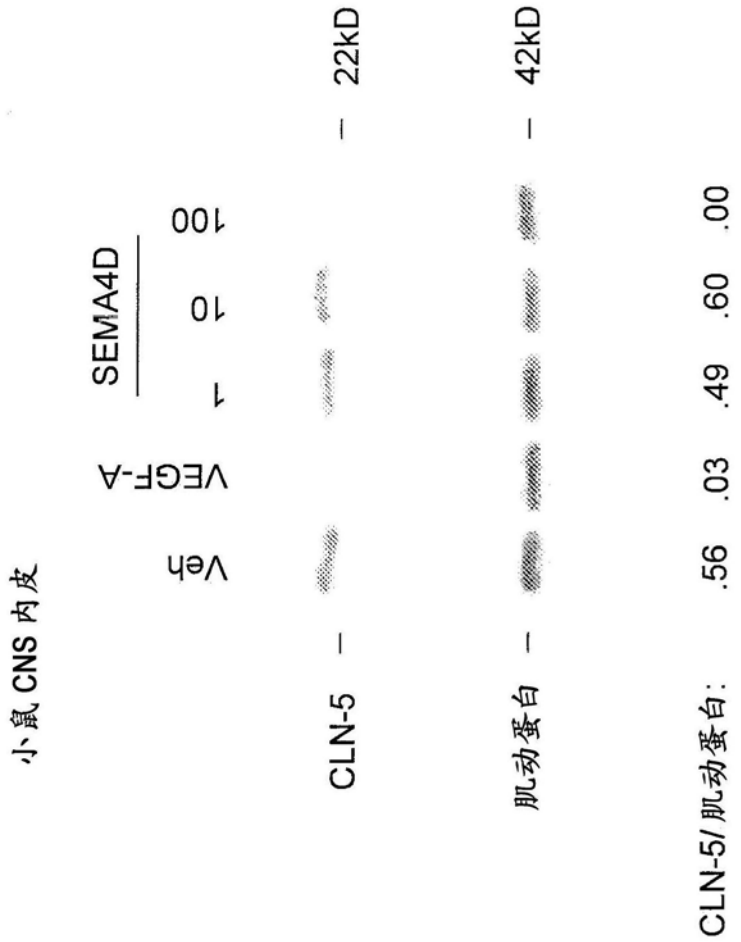

小鼠 CNS 内皮
Veh
VEGF-A
SEMA4D
1
10
100
CLN-5
肌动蛋白
22kD
42kD
CLN-5/肌动蛋白:
.56
.03
.49
.60
.00

图8