

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **201991020** (13) **A2**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки
2020.01.09

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

(22) Дата подачи заявки
2014.10.21

(54) **ПРИМЕНЕНИЕ СЕМАФОРИН-4D-СВЯЗЫВАЮЩИХ МОЛЕКУЛ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ НЕЙРОДЕГЕНЕРАТИВНЫХ НАРУШЕНИЙ**

(31) **61/893,814; 61/979,384; 62/012,805**

(32) **2013.10.21; 2014.04.14; 2014.06.16**

(33) **US**

(62) **201690813; 2014.10.21**

(71) Заявитель:
ВЭКСИНЕКС, ИНК. (US)

(72) Изобретатель:
**Смит Эрнест С., Заудерер Морис,
Бауэрс Уилльям Дж., Джонасон Алан
(US)**

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

(57) Обеспечиваются способы облегчения симптомов у субъекта, имеющего нейродегенеративное нарушение, включающие введение этому субъекту эффективного количества выделенной связывающей молекулы, которая специфически связывается с семафорином 4D (SEMA4D) или его рецепторами плексином-B1 и плексином-B2. Кроме того, обеспечивается выделенная связывающая молекула, которая специфически связывается с тем же эпитопом SEMA4D, что и эталонное моноклональное антитело, выбираемое из группы, состоящей из VX15/2503 и 67.

A2

201991020

201991020

A2

**ПРИМЕНЕНИЕ СЕМАФОРИН-4D-СВЯЗЫВАЮЩИХ МОЛЕКУЛ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ
НЕЙРОДЕГЕНЕРАТИВНЫХ НАРУШЕНИЙ**

Ссылка на родственные заявки

По этой международной заявке испрашивается приоритет предварительной заявки на патент США с № 62/012805, поданной 16 июня 2014, предварительной заявки на патент США с № 61/979384, поданной 14 апреля 2014, и предварительной заявки на патент США с № 61/893814, поданной 21 октября 2013, содержание каждой из которых включено таким образом посредством ссылки во всей ее полноте.

Ссылка на список последовательностей, представленный в электронном виде

Содержание представленного в электронном виде списка последовательностей в текстовом файле ASCII (Имя 58008-137466seq-1stg.txt, размер: 32256 байт и дата создания: 20 октября 2014), поданным с этой заявкой, включено сюда посредством ссылки во всей его полноте.

Уровень техники

Семафорин 4D (SEMA4D), также известный как CD100, представляет собой трансмембранный белок (например, SEQ ID NO:1 (человека); SEQ ID NO:2 (мышь)), который относится к семейству генов семафоринов. SEMA4D представлен на поверхности клетки в виде гомодимера, но при активации клетки SEMA4D может отделяться от поверхности клетки путем протеолитического расщепления с образованием sSEMA4D, растворимой формы белка, который также является биологически активным. Смотрите Suzuki *et al.*, *Nature Rev. Immunol.* 3:159-167 (2003); Kikutani *et al.*, *Nature Immunol.* 9:17-23 (2008).

SEMA4D экспрессируется на высоком уровне в лимфоидных органах, в том числе селезенке, вилочковой железе и лимфатических узлах, и в не лимфоидных органах, таких как головной мозг, сердце и почки. В лимфоидных органах, SEMA4D экспрессируется в большом количестве в покоящихся Т-клетках, но лишь слабо экспрессируется в покоящихся В-клетках и антигенпрезентирующих клетках (APC), таких как дендритные

клетки (DC). Однако его экспрессия увеличивается в этих клетках после активации с помощью различных иммунологических стимулов. Отделение растворимого SEMA4D от поверхности иммунных клеток также увеличивается при активации клеток.

SEMA4D, как было установлено, участвует в развитии нейродегенеративных нарушений, аутоиммунных заболеваний, демиелинизирующих заболеваний и некоторых видов рака. Однако остается прояснить эффект блокирования передачи сигнала от SEMA4D на организацию и функционирование центральной нервной системы (ЦНС), включая головной мозг и спинной мозг, и на поведение под контролем центральной нервной системы. Это важно, поскольку изменения в ЦНС оказывают сильное влияние на поведение и качество жизни субъекта. В частности, такие изменения могут влиять на психоневрологическое поведение субъекта, когнитивное поведение и двигательные навыки. Следовательно, остается потребность в леченных нейродегенеративных нарушениях, которые облегчают симптомы, сопровождающие нарушение.

Краткое изложение сущности настоящего изобретения

Здесь описаны способы применения семафорин-4D-связывающих молекул для облегчения симптомов у субъекта, имеющего нейродегенеративные нарушения. В соответствии с аспектами настоящего изобретения, проиллюстрированными здесь, обеспечивается способ уменьшения интенсивности симптомов у субъекта с нейродегенеративным нарушением, включающий введение субъекту эффективного количества выделенной связывающей молекулы, которая специфически связывается с семафорин-4D (SEMA4D) и ингибирует, подавляет, предотвращает, обращает вспять или замедляет действие SEMA4D.

В соответствии с аспектами, проиллюстрированными здесь, обеспечивается способ лечения субъекта с нейродегенеративным нарушением, включающий введение субъекту эффективного количества выделенной связывающей молекулы, которая специфически связывается с семафорин-4D (SEMA4D), причем связывание с SEMA4D служит для уменьшения интенсивности симптомов, сопровождающих нарушение.

Обеспечиваются способы облегчения симптомов у субъекта, имеющего нейродегенеративное нарушение, включающие введение этому субъекту эффективного количества выделенной связывающей молекулы, которая специфически связывается с семафорин 4D (SEMA4D). В некоторых вариантах осуществления способов связывающая молекула ингибирует взаимодействие SEMA4D с его рецептором или частью его рецептора. В некоторых вариантах осуществления способов рецептор выбирают из группы, состоящей из плексина-B1 и плексина-B2. В некоторых вариантах осуществления способов связывающая молекула ингибирует SEMA4D-опосредованную передачу сигнала от плексина-B1. В некоторых вариантах осуществления способов выделенная связывающая молекула специфически связывается с тем же эпитопом SEMA4D, что и эталонное моноклональное антитело, выбираемое из группы, состоящей из VX15/2503 и 67. В некоторых вариантах осуществления способов выделенная связывающая молекула конкурентно подавляет специфическое связывание эталонного моноклонального антитела, выбираемого из группы, состоящей из VX15/2503 и 67, с SEMA4D. В некоторых вариантах осуществления способов выделенная связывающая молекула включает антитело или его антигенсвязывающий фрагмент. В некоторых вариантах осуществления способов антителом или его антигенсвязывающим фрагментом является моноклональное антитело VX15/2503 и 67. В некоторых вариантах осуществления способов антитело или его антигенсвязывающий фрагмент включает переменную область тяжелой цепи (VH), включающую VHCDR 1-3, включающие SEQ ID NO:6, 7, и 8, соответственно, и переменную область легкой цепи (VL), включающую VLCDR 1-3, включающие SEQ ID NO:14, 15 и 16, соответственно. В некоторых вариантах осуществления способов VH и VL включают, соответственно, SEQ ID NO:9 и SEQ ID NO:17 или SEQ ID NO:10 и SEQ ID NO:18. В некоторых вариантах осуществления любого из вышеупомянутых способов нейродегенеративное нарушение выбирают из группы, состоящей из болезни Альцгеймера, болезни Паркинсона, болезни Хантингтона, синдрома Дауна, атаксии, бокового амиотрофического склероза (ALS), лобно-височной деменции (FTD), связанного с ВИЧ

когнитивного нарушения, волчанки с поражением ЦНС, легкого когнитивного нарушения или их сочетания. В некоторых вариантах осуществления любого из вышеупомянутых способов нейродегенеративное нарушение представляет собой болезнь Альцгеймера или болезнь Хантингтона. В некоторых вариантах осуществления любого из вышеупомянутых способов симптомы выбирают из группы, состоящей из психоневрологических симптомов, когнитивных симптомов, моторной дисфункции, а также любого их сочетания. В некоторых вариантах осуществления любого из вышеупомянутых способов психоневрологические симптомы выбирают из группы, состоящей из уменьшения подобного страху поведения, улучшения пространственной памяти, увеличения локомоции и любого их сочетания.

Обеспечиваются способы облегчения симптомов у субъекта, имеющего нейродегенеративное нарушение, включающие введение этому субъекту эффективного количества выделенной связывающей молекулы, которая специфически связывается с SEMA4D, причем связывающая молекула конкурентно подавляет специфическое связывание эталонного моноклонального антитела, выбираемого из группы, состоящей из VX15/2503 и 67, с SEMA4D. В некоторых вариантах осуществления способов связывающая молекула ингибирует взаимодействие SEMA4D с его рецептором или частью его рецептора. В некоторых вариантах осуществления способов рецептор выбирают из группы, состоящей из плексина-B1 и плексина-B2. В некоторых вариантах осуществления способов связывающая молекула ингибирует SEMA4D-опосредованную передачу сигнала от плексина-B1. В некоторых вариантах осуществления способов выделенная связывающая молекула включает антитело или его антигенсвязывающий фрагмент. В некоторых вариантах осуществления способов антителом или его антигенсвязывающим фрагментом является моноклональное антитело VX15/2503 или 67. В некоторых вариантах осуществления способов антитело или его антигенсвязывающий фрагмент включает переменную область тяжелой цепи (VH), включающую VHCDR 1-3, включающие SEQ ID NO:6, 7 и 8, соответственно, и переменную область легкой цепи (VL), включающую VLCDR 1-3, включающую SEQ ID NO:14, 15 и 16,

соответственно. В некоторых вариантах осуществления способов VN и VL включают, соответственно, SEQ ID NO:9 и SEQ ID NO:17 или SEQ ID NO:10 и SEQ ID NO:18. В некоторых вариантах осуществления любого из вышеупомянутых способов нейродегенеративное нарушение выбирают из группы, состоящей из болезни Альцгеймера, болезни Паркинсона, болезни Хантингтона, синдрома Дауна, атаксии, бокового амиотрофического склероза (ALS), лобно-височной деменции (FTD), связанного с ВИЧ когнитивного нарушения, волчанки с поражением ЦНС, легкого когнитивного нарушения или их сочетания. В некоторых вариантах осуществления любого из вышеупомянутых способов нейродегенеративное нарушение представляет собой болезнь Альцгеймера или болезнь Хантингтона. В некоторых вариантах осуществления любого из вышеупомянутых способов симптомы выбирают из группы, состоящей из психоневрологических симптомов, когнитивных симптомов, моторной дисфункции, а также любого их сочетания. В некоторых вариантах осуществления любого из вышеупомянутых способов психоневрологические симптомы выбирают из группы, состоящей из уменьшения подобного страху поведения, улучшения пространственной памяти, увеличения локомоции и любого их сочетания.

Здесь обеспечиваются дополнительные способы лечения субъекта, имеющего нейродегенеративное или нейровоспалительное нарушение, или обеспечения желаемого результата у субъекта, имеющего нейродегенеративное или нейровоспалительное нарушение. Обеспечиваются способы лечения субъекта, имеющего нейродегенеративное нарушение, включающие введение субъекту эффективного количества выделенной связывающей молекулы, которая специфически связывается с семафорин-4D (SEMA4D), причем связывание с SEMA4D служит для облегчения симптомов, сопровождающих нарушение. Обеспечиваются способы стимулирования миелинизации у субъекта, имеющего нейродегенеративное нарушение, включающие введение этому субъекту эффективного количества выделенной связывающей молекулы, которая специфически связывается с SEMA4D, причем связывающая молекула модулирует опосредуемую астроцитами активность функционирования

олигодендроцитов-миелина. Обеспечиваются способы предотвращения гибели нейронов у субъекта, имеющего нейродегенеративное нарушение, включающие введение этому субъекту эффективного количества выделенной связывающей молекулы, которая специфически связывается с SEMA4D, причем связывающая молекула модулирует опосредуемую астроцитами синаптическую активность. Обеспечиваются способы предотвращения повреждения гематоэнцефалического барьера у субъекта, имеющего нейровоспалительное или нейродегенеративное нарушение, включающие введение этому субъекту эффективного количества выделенной связывающей молекулы, которая специфически связывается с SEMA4D, причем связывающая молекула модулирует опосредуемое астроцитами сохранение целостности гематоэнцефалического барьера. Обеспечиваются способы предотвращения активации астроцитов у субъекта, который имеет, у которого установлено наличие или у которого подозревается наличие нейровоспалительное(го) или нейродегенеративное(ого) нарушение(я), включающие введение этому субъекту эффективного количества выделенной связывающей молекулы, которая специфически связывается с SEMA4D, причем связывающая молекула модулирует опосредуемое астроцитами сохранение целостности гематоэнцефалического барьера. Обеспечиваются способы сохранения или восстановления опосредуемой астроцитами трофической поддержки клеток-предшественников олигодендроцитов (ОРС) у субъекта, который имеет, у которого установлено наличие или у которого подозревается наличие нейровоспалительное(го) или нейродегенеративное(ого) нарушение(я), включающие введение этому субъекту эффективного количества выделенной связывающей молекулы, которая специфически связывается с SEMA4D, причем связывающая молекула предотвращает ретракцию отростков астроцитов и хемотаксическое перемещение ОРС в направлении зон повреждения. Обеспечиваются способы защиты тормозных нейроны от дегенерации на ранней стадии болезни Альцгеймера, включающие введение субъекту, который имеет, у которого установлено наличие или у которого подозревается наличие болезни Альцгеймера на ранней стадии, эффективного количества

выделенной связывающей молекулы, которая специфически связывается с SEMA4D, причем связывающая молекула восстанавливает количество соматостатин-позитивных нейронов, NYP-позитивных нейронов, или как тех, так и других у субъекта. В некоторых вариантах осуществления вышеупомянутых способов связывающая молекула ингибирует взаимодействие SEMA4D с его рецептором или частью его рецептора. В некоторых вариантах осуществления вышеупомянутых способов рецептор выбирают из группы, состоящей из плексина-В1 и плексина-В2. В некоторых вариантах осуществления вышеупомянутых способов связывающая молекула ингибирует SEMA4D-опосредованную передачу сигнала от плексина-В1. В некоторых вариантах осуществления вышеупомянутых способов выделенная связывающая молекула специфически связывается с тем же эпитопом SEMA4D, что и эталонное моноклональное антитело, выбираемое из группы, состоящей из VX15/2503 и 67. В некоторых вариантах осуществления вышеупомянутых способов выделенная связывающая молекула конкурентно подавляет специфическое связывание эталонного моноклонального антитела, выбираемого из группы, состоящей из VX15/2503 и 67, с SEMA4D. В некоторых вариантах осуществления вышеупомянутых способов выделенная связывающая молекула включает антитело или его антигенсвязывающий фрагмент. В некоторых вариантах осуществления вышеупомянутых способов антителом или его антигенсвязывающим фрагментом является моноклональное антитело VX15/2503 или 67. В некоторых вариантах осуществления вышеупомянутых способов антитело или его антигенсвязывающий фрагмент включает переменную область тяжелой цепи (VH), включающую VHCDR 1-3, включающие SEQ ID NO:6, 7 и 8, соответственно, и переменную область легкой цепи (VL), включающую VLCDR 1-3, включающие SEQ ID NO:14, 15 и 16, соответственно. В некоторых вариантах осуществления вышеупомянутых способов VH и VL включают, соответственно, SEQ ID NO:9 и SEQ ID NO:17 или SEQ ID NO:10 и SEQ ID NO:18. В некоторых вариантах осуществления вышеупомянутых способов нейродегенеративное нарушение выбирают из группы, состоящей из болезни Альцгеймера, болезни Паркинсона, болезни Хантингтона,

синдрома Дауна, атаксии, бокового амиотрофического склероза (ALS), лобно-височной деменции (FTD), связанного с ВИЧ когнитивного нарушения, волчанки с поражением ЦНС, легкого когнитивного нарушения или их сочетания. В некоторых вариантах осуществления любого из вышеупомянутых способов нейродегенеративное нарушение представляет собой болезнь Альцгеймера или болезнь Хантингтона. В некоторых вариантах осуществления вышеупомянутых способов симптомы у субъекта, которые ослабляют с помощью этих способов, выбирают из группы, состоящей из психоневрологических симптомов, когнитивных симптомов, моторной дисфункции, а также любого их сочетания. В некоторых вариантах осуществления вышеупомянутых способов психоневрологические симптомы у субъекта, которые ослабляют с помощью этих способов, выбирают из группы, состоящей из уменьшения подобного страху поведения, улучшения пространственной памяти, увеличения локомоции и любого их сочетания. В некоторых вариантах осуществления вышеупомянутых способов устанавливают, что субъект имеет нейродегенеративное нарушение, путем обработки образца или изображения субъекта.

Краткое описание чертежей/фигур

Фиг. 1: Схема экспериментального протокола, описанного в примерах.

Фиг. 2: *In vitro* модель CVN, с помощью которой определяется подобное страху поведение мышей CVN, подвергнутых лечению антителом против SEMA4D («мАт 67») или подобранным по изотипу антителом в качестве контроля («мАт 2В8»). Общая локомоция (фиг. 2А) и локомоция в центре «открытого поля» (фиг. 2В).

Фиг. 3: *In vitro* модель CVN, с помощью которой определяется пространственная память в радиальном шестирукавом водном лабиринте (фиг. 3А) у мышей CVN, подвергнутых лечению антителом против SEMA4D («мАт 67») или подобранным по изотипу антителом в качестве контроля (фиг. 3В).

Фиг. 4: *In vitro* модель CVN, с помощью которой измеряется плотность ГАМКергических синапсов и концентрация везикулярного ГАМК-транспортера (VGAT) у мышей CVN, подвергнутых лечению

антителом против SEMA4D («мАт 67») или подобранным по изотипу антителом в качестве контроля. VGAT-позитивные везикулы (фиг. 4А) и уровень интенсивности VGAT-окрашивания на везикулу (фиг. 4В).

Фиг. 5: In vivo модель YAC128, с помощью которой определяется подобное страху поведение как у мышей, подвергнутых лечению антителом против SEMA4D («мАт 67») или подобранным по изотипу антителом в качестве контроля. Вторжения в центр поля (фиг. 5А) и время, проведенное в центре поля (фиг. 5В).

Фиг. 6: In vivo модель YAC128, с помощью которой определяется пространственная память у мышей, подвергнутых лечению антителом против SEMA4D («мАт 67») или подобранным по изотипу антителом в качестве контроля. Панель А = Испытание 1 (фиг. 6А), и панель В = Испытание 2 (фиг. 6В).

Фиг. 7: In vivo модель YAC128, с помощью которой измеряется объем коры головного мозга (фиг. 7А) и мозолистого тела (фиг. 7В) у мышей, подвергнутых лечению антителом против SEMA4D («мАт 67») или подобранным по изотипу антителом в качестве контроля.

Фиг. 8: In vivo модель YAC128, с помощью которой определяется дегенерация яичек у мышей, подвергнутых лечению антителом против SEMA4D («мАт 67») или подобранным по изотипу антителом в качестве контроля.

Фиг. 9А-Р: Иммуногистохимический анализ типов клеток, экспрессирующих SEMA4D, плексин-В1 и CD72 в спинном мозге нормальных крыс. Nkx2.2 (панель В) является маркером клеток-предшественников олигодендроцитов, глиальный фибриллярный кислый белок (GFAP) (панель G) является маркером астроцитов, и Iba1 (панель N) представляет собой маркер микроглии. На панелях А, Е, I и М представлены совмещенные изображения, а на панелях D, H, L и P представлены те же срезы, окрашенные DAPI для визуализации клеточных ядер.

Фиг. 10: Иммуногистохимический анализ с DAB-окрашиванием амилоидной патологии и активации глиальных клеток у нормальных мышей (три верхние панели) и мышей CVN (три нижние панели).

Срезы подлежащей ткани окрашивали на бета-амилоид 1-42 (левые панели), маркер микроглии Iba1 (средние панели) и маркер астроцитов GFAP.

Фиг. 11А-11В: Характеристика и профили экспрессии рецепторов плексина-В1 и плексина-В2 в модели болезни Альцгеймера на мыши CVN. На фиг. 11А представлен иммуногистохимический анализ экспрессии плексина-В1 у нормальных мышей (верхние панели) и мышей CVN (нижние панели). Срезы головного мозга окрашивали на плексин-В1 и GFAP, а также DAPI для визуализации клеточных ядер. На фиг. 11В представлены уровни экспрессии плексина-В1 (левый график) и плексина-В2 (правый график) после ингибирования передачи сигнала от SEMA4D.

Фиг. 12: Иммуногистохимический анализ экспрессии плексина-В2 у нормальных мышей (верхние панели) и мышей YAC128 (нижние панели). Срезы головного мозга окрашивали на плексин-В2 и GFAP, а также DAPI для визуализации клеточных ядер.

Фиг. 13: Схематическое представление ролей, которые передача сигналов от SEMA4D может играть в регуляции функции астроцитов в здоровом состоянии и в случае заболевания. Левая панель: Плексин+ (заштрихованная область наружной поверхности астроцитов) астроцитарные отростки переплетаются между SEMA4D+ Nkx2.2+ клетками-предшественниками олигодендроцитов (OPC) и обеспечивают трофическую поддержку (SEMA4D+ представлены в виде заштрихованной области наружной поверхности OPC). В случае заболевания ЦНС, активированные астроциты увеличивают экспрессию плексина и ретрактируют отростки через передачу сигналов от SEMA4D. Локально, это приводит к уменьшению трофической поддержки и увеличению иницируемого хемотаксисом перемещения OPC в сторону зон повреждения, в то время как отсутствие астроцитарной поддержки в участке повреждения препятствует ремиелинизации. Центральная панель: В случае заболевания ЦНС, активация астроцитов приводит к увеличению экспрессии плексина (заштрихованная область наружной поверхности астроцитов), увеличению передачи сигналов от SEMA4D и ретракции отростков, что приводит к утрате наведения аксонов нейронов, уменьшению трофической поддержки и/или дисрегуляции

поглощения/выброса глутамата. В конечном счете, в зависимости от тяжести воздействия заболевания может произойти потеря синапсов и последующая эксайтотоксичная гибель нейронов. Правая панель: Индуцированная заболеванием ЦНС активация астроцитов увеличивают передачу сигналов от SEMA4D через плексин (заштрихованная область наружной поверхности астроцитов), что приводит к ретракции нижних частей отростков астроцитов, о чем свидетельствует перераспределение аквапорина-4. Это приводит к дисрегуляции и проницаемости ГЭБ, способствуя тем самым воспалению эндотелия и последующему вхождению лейкоцитов в ЦНС.

Фиг. 14: Иммуногистохимический анализ, показывающий, что SEMA4D-экспрессирующие OPC располагаются в непосредственной близости с GFAP+ астроцитарными отростками. Срезы головного мозга окрашивали на SEMA4D (OPC) и GFAP (астроциты), а также DAPI для визуализации клеточных ядер.

Фиг. 15A, B, C, D: In vitro модель CVN, с помощью которой измеряется соматостатин- (панель A), нейропептид-Y (NPY)- (панель B), рецептор 1 нейропептида Y (NPY1R)- (панель C) или рецептор 2 NPY (NPY2R) (панель D) - позитивная сигнализация в подлежащей ткани и зубчатой извилине, соответственно, у мышей SVM, подвергнутых лечению антителом против SEMA4D («mAt 67») или подобранным по изотипу антителом в качестве контроля. Усы обозначают среднее квадратическое отклонение. «*»= $p < 0,05$ и «***»= $p < 0,005$ в соответствии с однофакторным дисперсионным анализом (ANOVA) с использованием критерия множественного сравнения Бонферрони.

Фиг. 16: Иммуногистохимический анализ профилей экспрессии аквапорина-4 у нормальных мышей и мышей CVN.

Фиг. 17: In vitro модель DIV-BBB, с помощью которой измеряется целостность гематоэнцефалического барьера при добавлении моноклонального антитела против SEMA4D VX15/2503.

Фиг. 18A-18B: Иммуноцитохимический анализ, демонстрирующий активацию астроцитов крысы. На фиг. 18A представлен иммуноцитохимический анализ активации астроцитов, судя по относительному увеличению GFAP-позитивной площади в подвергнутых культивированию астроцитах крыс, обработанных

SEMA4D самим по себе или после предварительной обработки тиацетамидом (ТАА). На фиг. 18В представлен иммуноцитохимический анализ активации астроцитов, судя по соотношению F-актина и G-актина в подвергнутых культивированию астроцитах крыс, обработанных SEMA4D самим по себе или в комбинации с простагландином D2. Усы обозначают среднеквадратическое отклонение. «*»= $p < 0,05$ в соответствии с однофакторным дисперсионным анализом (ANOVA) с использованием критерия множественного сравнения Бонферрони.

Подробное описание настоящего изобретения

I. Определения

Следует отметить, что терминологическая единица «а» или «an» относится к одной или более таких единиц; например, «антитело против SEMA4D», как подразумевается, представляет собой одно или более антител против SEMA4D. Как таковые, термины «а» (или «an»), «один или более» и «по крайней мере один» могут использоваться здесь взаимозаменяемо.

Кроме того, «и/или» при использовании здесь следует рассматривать как конкретное раскрытие каждого из двух указанных элементов или компонентов с добавлением или без другого. Таким образом, термин «и/или», используемый в таком выражении, как «А и/или В», здесь, как подразумевается, включает «А и В», «А или В», «А» (только) и «В» (только). Подобно, термин «и/или», используемый в таком выражении, как «А, В и/или С», как подразумевается, охватывает каждый из следующих вариантов осуществления: А, В и С; А, В или С; А или С; А или В; В или С; А и С; А и В; В и С; А (только); В (только) и С (только).

Если не указано иное, технические и научные термины, используемые здесь, имеют такое же значение, в котором их обычно понимает специалист со средним уровнем компетентности в области техники, к которой относится это изобретение. Например, The Concise Dictionary of Biomedicine and Molecular Biology, Juo, Pei-Show, 2nd ed., 2002, CRC Press; The Dictionary of Cell and Molecular Biology, 3rd ed., 1999, Academic Press; и the Oxford Dictionary Of Biochemistry And Molecular Biology,

Revised, 2000, Oxford University Press, обеспечивают специалиста общим словарем многих из терминов, используемых в этом описании.

Единицы измерения, префиксы и символы указаны в принятой для них форме в Международной системе единиц (СИ). Числовые диапазоны включают числа, определяющие диапазон. Если не указано иное, аминокислотные последовательности записаны слева направо в направлении от амино-конца к карбоксильному концу. Представленные здесь заголовки не являются ограничениями различных аспектов или аспектов настоящего раскрытия, которые могут быть оснащены ссылками на спецификацию в целом. Соответственно, термины, определенные непосредственно ниже, более полно определяются ссылкой на спецификацию в целом.

Используемый здесь термин «не встречающееся в природе» вещество, композиция, объект и/или любая комбинация веществ, композиций или объектов, или любые его грамматические варианты, – это условный термин, который явно исключает, но всего лишь исключает, те формы вещества, композиции, объекта и/или любой комбинации веществ, композиций или объектов, которые широко известны специалистам со средним уровнем компетентности в данной области как «встречающиеся в природе», или которые в соответствии с определением или интерпретацией, или в соответствии с возможным в любое время определением или интерпретацией, судьи или административного или судебного органа являются «встречающимися в природе».

Используемый здесь термин «нейродегенеративное нарушение» или «нейродегенеративное заболевание» относится к нарушению центральной нервной системы (ЦНС), которое характеризуется гибелью нейронов в одной или более областей нервной системы и последующим функциональным ухудшением пораженных сторон. Примеры нейродегенеративных нарушений включают, без ограничения, болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона, болезнь Хантингтона, синдром Дауна, атаксию, боковой амиотрофический склероз (ALS), лобно-височную деменцию (FTD), связанное с ВИЧ когнитивное нарушение (HAND, HIV-Associated Neurocognitive Disorder), волчанку с поражением ЦНС и легкое когнитивное

нарушение. Нейродегенеративные заболевания оказывают огромное влияние на жизни пораженных людей и их семей, а также общество в целом.

Используемый здесь термин «болезнь Альцгеймера» относится к прогрессирующему заболеванию, первоначально проявляющемуся частичной амнезией, а позже беспокойством, дезориентацией, афазией, агнозией или апраксией (снижение познавательной способности), деменцией, а иногда эйфорией или депрессиями. Заболевание, как правило, начинается в возрасте от 40 до 90 лет и преимущественно поражает женщин. Что касается его распространенности, оценки составляют приблизительно 13% населения возрастом старше 65 лет.

Используемый здесь термин «болезнь Хантингтона» относится к нейродегенеративному заболеванию, которое обусловлено удлинением полиглутаминового участка на N-конце белка хантингтина (экспрессируемого геном HTT), причем удлинение быть составляет более 35-40 повторов аминокислоты глутамина в мутантном белке (mHTT). Заболевание проявляется прогрессирующей гибелью нейронов в различных областях головного мозга, включая токсичность в отношении средних шипиковых нейронов полосатого тела, которая определяет появление классической моторной несогласованности и движений, таких как «хорея». Механизм действия mHTT был описан и как усиление, и как утрата функции по сравнению с белком дикого типа и включает в себя приобретение или потерю способности взаимодействовать с различными белками в различных клеточных компартментах.

Термин «терапевтически эффективное количество» относится к количеству антитела, полипептида, полинуклеотида, небольшой органической молекулы или другого лекарственного средства, эффективно для «лечения» заболевания или нарушения у субъекта или млекопитающего. В случае нейродегенеративного нарушения терапевтически эффективное количество лекарственного средства может облегчить симптомы нарушения; снизить, уменьшить, замедлить или остановить частоту симптомов; снизить, уменьшить, отсрочить тяжесть симптомов; ингибировать, например, подавить, отсрочить, предотвратить, остановить или обратить вспять

проявление симптомов; облегчить в некоторой степени один или более симптомов, сопровождающих нарушение; снизить заболеваемость и смертность; улучшить качество жизни; или вызвать комбинацию таких эффектов.

Термин «симптомы», упоминаемый здесь, относится, например, к 1) психоневрологическим симптомам, 2) когнитивным симптомам и 3) моторной дисфункции. Примеры психоневрологических симптомов включают, например, подобное страху поведение. Примеры когнитивных симптомов включают, например, дефицит научения и памяти. Примеры моторной дисфункции включают, например, локомоцию.

Такие термины, как «лечение» или «лечить», или «облегчение» или «облегчать», или «улучшение» или «улучшать» относятся и к 1) терапевтическим мерам, которые излечивают, замедляют, уменьшают симптомы, обращают вспять и/или останавливают прогрессирование диагностированного патологического состояния или нарушения, и к 2) профилактическим или превентивным мерам, которые предотвращают и/или замедляют развитие целевого патологического состояния или нарушения. Таким образом, те, кто нуждается в лечении, включают тех, которые уже имеют нарушение; тех, которые склонны иметь нарушение; и тех, у которых нарушение должно быть предотвращено. Благоприятные или желательные клинические результаты включают, но без ограничения, облегчение симптомов, уменьшение степени заболевания, стабилизацию (т.е. не ухудшение) состояния заболевания, отсрочку или замедление прогрессирования заболевания, улучшение или временное облегчение болезненного состояния, и ремиссию (или частичную, или полную), или выявляемую, или не выявляемую. «Лечение» может также означать продление выживания по сравнению с ожидаемой выживаемостью в случае неполучения лечения. Те, кто нуждается в лечении, включают тех, которые уже имеют состояние или нарушение, а также тех, которые склонны иметь состояние или нарушение; или тех, у которых состояние или нарушение должно быть предотвращено.

Под «субъектом» или «индивидуумом», или «животным», или

«пациентом» или «млекопитающим» подразумевается любой субъект, в частности, являющийся млекопитающим субъект, для которого желательным является диагноз, прогноз или терапия. Являющиеся млекопитающими субъекты включают людей, домашних животных, сельскохозяйственных животных и животных зоологических садов, животных-спортсменов или любимых домашних животных, таких как собаки, кошки, морские свинки, кролики, крысы, мыши, лошади, крупный рогатый скот, коровы, медведи и т.д.

Используемые здесь такие выражения, как «субъект, которому принесет пользу введение антитела против SEMA4D», и «животное, нуждающиеся в лечении», включают субъектов, таких как являющиеся млекопитающими субъекты, которым принесет пользу введение антитела против SEMA4D или другой SEMA4D-связывающей молекулы, используемой, например, для обнаружения полипептида SEMA4D (например, для диагностической процедуры), и/или лечение, т.е. временное облегчение или профилактика заболевания, с помощью антитела против SEMA4D или другой SEMA4D-связывающей молекулы.

Термин «связывающая молекула» или «антигенсвязывающая молекула» настоящего изобретения относится в его самом широком смысле к молекуле, которая специфически связывается с антигенной детерминантой. В одном варианте осуществления связывающая молекула специфически связывается с SEMA4D, например, с трансмембранным полипептидом SEMA4D с М.м. приблизительно 150 кДа или растворимым полипептидом SEMA4D с М.м. приблизительно 120 кДа (обычно называемым sSEMA4D). В другом варианте осуществления связывающая молекула настоящего изобретения представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент. В другом варианте осуществления связывающая молекула настоящего изобретения включает по крайней мере один CDR тяжелой или легкой цепи молекулы антитела. В другом варианте осуществления связывающая молекула настоящего изобретения включает по крайней мере два CDR из одной или более молекул антитела. В другом варианте осуществления связывающая молекула настоящего изобретения включает по крайней мере три CDR из одной или более молекул антитела. В другом варианте

осуществления связывающая молекула настоящего изобретения включает по крайней мере четыре CDR из одной или более молекул антитела. В другом варианте осуществления связывающая молекула настоящего изобретения включает по крайней мере пять CDR из одной или более молекул антитела. В другом варианте осуществления связывающая молекула настоящего изобретения включает по крайней мере шесть CDR из одной или более молекул антитела.

Настоящее изобретение направлено на способ облегчения симптомов у субъекта, имеющего нейродегенеративное нарушение, включающий введение субъекту анти-SEMA4D связывающей молекулы, например, антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, варианта или производного. Если только конкретно не упоминаются полноразмерные антитела, такие как встречающиеся в природе антитела, термин «антитело против SEMA4D» включает полноразмерные антитела, а также антигенсвязывающие фрагменты, варианты, аналоги или производные таких антител, например, встречающееся в природе антитело или молекулы иммуноглобулина или сконструированные молекулы антител или фрагменты, которые связываются с антигеном аналогично молекулам антител.

Как здесь используются, «человеческие» или «полностью человеческие» антитела включают антитела, имеющие аминокислотную последовательность иммуноглобулина человека, и включают антитела, выделенные из библиотек иммуноглобулинов человека или из животных, которые являются трансгенными по одному или нескольким иммуноглобулинам человека и которые не экспрессируют эндогенные иммуноглобулины, как описано ниже и, например, в патенте США с № 5939598, выданном Kucherlapati и др. «Человеческие» или «полностью человеческие» антитела также включают антитела, включающие по крайней мере переменный домен тяжелой цепи или по крайней мере переменные домены тяжелой цепи и легкой цепи, причем переменный домен(ы) имеет аминокислотную последовательность переменного домена(ов) иммуноглобулина человека.

«Человеческие» или «полностью человеческие» антитела также включают «человеческие» или «полностью человеческие» антитела,

описанные выше, которые включают, по существу состоят из или состоят из варианты(ов) (включая производные) молекул антител (например, VH-области(ей) и/или VL-области(ей)), описанных здесь, тех антитела или их фрагментов, которые иммуноспецифично связываются с полипептидом SEMA4D или его фрагментом или вариантом. Для введения мутаций в нуклеотидную последовательность, кодирующую человеческое антитело против SEMA4D, могут использоваться стандартные методы, известные квалифицированным в данной области специалистам, в том числе, но без ограничения, сайт-направленный мутагенез и мутагенез с использованием ПЦР, которые приводят к аминокислотным заменам. В некоторых вариантах осуществления варианты (в том числе производные) кодируют менее 50 аминокислотных замен, менее 40 аминокислотных замен, менее 30 аминокислотных замен, менее 25 аминокислотных замен, менее 20 аминокислотных замен, менее 15 аминокислотных замен, менее 10 аминокислотных замен, менее 5 аминокислотных замен, менее 4 аминокислотных замен, менее 3 аминокислотных замен или менее 2 аминокислотных замен относительно ссылочной VH-области, VHCDR1, VHCDR2, VHCDR3, VL-области, VLCDR1, VLCDR2 или VLCDR3.

В некоторых вариантах осуществления аминокислотные замены являются консервативными аминокислотными заменами, обсуждаемыми в дальнейшем ниже. В качестве альтернативы, мутации могут быть введены случайным образом вдоль всей или части кодирующей последовательности, например, путем насыщающего мутагенеза, и полученные мутанты могут быть подвергнуты скринингу на предмет биологической активности с целью идентификации мутантов, которые сохраняют активность (например, способность связываться с полипептидом SEMA4D, например, SEMA4D человека, мыши или как человека, так и мыши). Такие варианты (или их производные) «человеческих» или «полностью человеческих» антител также могут упоминаться как человеческие или полностью человеческие антитела, которые являются «оптимизированными» или «оптимизированными в отношении связывания антигена», и включают антитела, которые обладают увеличенной аффинностью к антигену.

Термины «антитело» и «иммуноглобулин» используются здесь

взаимозаменяемо. Антитело или иммуноглобулин включает по крайней мере переменный домен тяжелой цепи и обычно включает по крайней мере переменные домены тяжелой цепи и легкой цепи. Основные структуры иммуноглобулинов в системах позвоночных относительно хорошо изучены. См. например, Harlow *et al.* (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual* (2nd ed.; Cold Spring Harbor Laboratory Press).

Используемый здесь термин «иммуноглобулин» включает различные широкие классы полипептидов, которые можно различить биохимически. Квалифицированные в данной области техники специалисты примут во внимание, что тяжелые цепи относятся к гамма-, мю-, альфа-, дельта- или эpsilon-цепям (γ , μ , α , δ , ϵ) с некоторыми подклассами среди них (например, γ_1 - γ). Именно природа этой цепи определяет «класс» антитела как IgG, IgM, IgA, IgG или IgE, соответственно. Подклассы (изотипы) иммуноглобулинов, например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, IgA2 и т.д., хорошо охарактеризованы и, как известно, обеспечивают функциональную специализацию. Модифицированные версии каждого из этих классов и изотипов являются легко различимыми квалифицированным специалистом ввиду настоящего описания и, соответственно, находятся в пределах объема настоящего описания. Все классы иммуноглобулинов находятся, несомненно, в пределах объема настоящего изобретения, последующее обсуждение будет большей частью направлено на класс IgG молекул иммуноглобулинов. Что касается IgG, стандартная молекула иммуноглобулина включает два идентичных полипептида легкой цепи с молекулярной массой, составляющей приблизительно 23000 Дальтон, и два идентичных полипептида тяжелой цепи с молекулярной массой, составляющей 53000-70000. Четыре цепи обычно соединены дисульфидными связями в конфигурации «Y», причем легкие цепи захватывают вилку тяжелых цепей, начиная с сужения «Y» и продолжая сквозь переменную область.

Легкие цепи относятся или к каппа, или к лямбда (κ , λ). Каждый класс тяжелой цепи может связываться с легкой цепью или каппа, или лямбда. Обычно легкие и тяжелые цепи ковалентно

связаны друг с другом, а «хвостовые» части двух тяжелых цепей связаны друг с другом с помощью ковалентных дисульфидных связей или нековалентных связей, когда иммуноглобулины продуцируются или гибридомами, В-клетками, или являются генетически сконструированными клетками-хозяевами. В тяжелой цепи, аминокислотные последовательности тянутся от N-конца на вилкообразных концах Y-конфигурации к C-концу в нижней части каждой цепи.

Как легкие, так и тяжелые цепи разделены на области структурной и функциональной гомологии. Термины «константные» и «вариабельные» используются функционально. В связи с этим следует понимать, что вариабельные домены как легкой (VL или VK), так и тяжелой (VH) цепей определяют распознавание антигена и специфичность. И наоборот, константные домены легкой цепи (CL) и тяжелой цепи (как правило, CH1, CH2 или CH3) придают важные биологические свойства, такие как секреция, способность к движению через плаценту, связывание с Fc-рецептором, связывание комплемента и т.п. Обычно нумерация доменов константной области возрастает по мере того, как они становятся более отдаленными от сайта связывания антигена или amino-конца антитела. N-концевая часть представляет собой вариабельную область, и на C-концевой части находится константная область; CH3- и CL-домены, как правило, включают карбоксильный конец тяжелой и легкой цепи соответственно.

Как было указано выше, вариабельная область позволяет антителу селективно распознавать и специфически связываться с эпитопами в антигенах. То есть, VL-домен и VH-домен, или подмножество определяющих комплементарность участков (CDR) внутри этих вариабельных доменов, антитела объединяются с образованием вариабельной области, которая определяет трехмерный антигенсвязывающий сайт. Эта четвертичная структура антитела образует антигенсвязывающий сайт, присутствующий на конце каждого плеча Y. Конкретнее, антигенсвязывающий сайт определяется тремя CDR в каждой из VH- и VL-областей. В некоторых случаях, например, в некоторых молекулах иммуноглобулинов, полученных из видов семейства верблюдовых или

сконструированных на основе иммуноглобулинов семейства верблюдовых, полная молекула иммуноглобулина может состоять только из тяжелых цепей, без каких-либо легких цепей. Смотри, например, Hamers-Casterman et al., Nature 363: 446-448 (1993).

Во встречающихся в природе антителах шесть «определяющих комплементарность участков» или «CDR», присутствующих в каждом антигенсвязывающем домене, представляют собой короткие, несмежные последовательности аминокислот, которые особым образом располагаются с образованием антигенсвязывающего домена по мере того, как антитело принимает свою трехмерную конфигурацию в водной среде. Остальная часть аминокислот в антигенсвязывающих доменах, называемая «каркасными областями», демонстрирует меньшую степень межмолекулярной вариабельности. Каркасные области главным образом принимают β -складчатую конформацию, а CDR образуют петлевые участки, которые соединяют, а в некоторых случаях составляют часть, β -складчатую структуру (ы). Таким образом, каркасные области служат для образования каркаса, который обеспечивает расположение CDR в правильной ориентации с помощью межцепочечных, нековалентных взаимодействий. Антигенсвязывающий домен, образованный расположенными в правильном положении CDR, определяет поверхность, комплементарную эпитопу в иммунореактивном антигене. Эта комплементарная поверхность способствует нековалентному связыванию антитела с соответствующим ему эпитопом. Аминокислоты, составляющие CDR и каркасные области, соответственно, могут быть без труда идентифицированы для любого конкретного вариабельного домена тяжелой или легкой цепи специалистом со средним уровнем компетентности в данной области, поскольку они были точно определены (смотрите ниже).

В том случае, когда существует два или более определений термина, который используется и/или принят в данной области техники, определение термина, используемого здесь, как подразумевается, включает все такие значения, если явно не указано обратное. Конкретным примером является использование термина «определяющий комплементарность участок» («CDR») для

описания несмежных антигенсвязывающих сайтов, обнаруживаемых в вариабельной области полипептидов и тяжелой, и легкой цепи. Этот конкретный участок был описан Kabat *et al.* (1983) U.S. Dept. of Health and Human Services, "Sequences of Proteins of Immunological Interest" и Chothia and Lesk, *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987), которые включены сюда посредством ссылки, причем определения включают перекрывание или подмножества аминокислотных остатков при сравнении друг с другом. Тем не менее, применение любого из этих определений, чтобы обратиться к CDR антитела или его вариантов, как подразумевается, находится в пределах объема термина, определенного и используемого здесь. Соответствующие аминокислотные остатки, которые охватывают CDR, как это определено каждой из приведенных выше ссылок, приведены ниже в таблице 1 в качестве сравнения. Точные номера остатков, которые охватывают конкретный CDR, будут варьировать в зависимости от последовательности и размера CDR. Квалифицированные в данной области техники специалисты могут обычно определить, какие остатки составляют конкретный CDR с учетом аминокислотной последовательности вариабельной области антитела.

Таблица 1

Определения CDR¹

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

¹Нумерация всех определений CDR в таблице 1 находится в соответствии с правилами нумерации, установленными Kabat и др. (смотри ниже).

Kabat и др. также определили систему нумерации для последовательностей вариабельных доменов, которая применима к любому антителу. Специалист со средним уровнем компетентности в

данной области техники может однозначно установить эту систему «нумерации по Kabat» в любой последовательности переменного домена, без необходимости в использовании каких-либо экспериментальных данных сверх самой последовательности. Как здесь используется, «нумерация по Kabat» относится к системе нумерации, установленной в Kabat *et al.* (1983) U.S. Dept. of Health and Human Services, "Sequence of Proteins of Immunological Interest." Если не указано иное, ссылки на нумерацию положений конкретных аминокислотных остатков в антителе против SEMA4D или его антигенсвязывающем фрагменте, варианте или производном настоящего изобретения находятся в соответствии с системой нумерации по Kabat.

Антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, варианты или производные настоящего изобретения включают, но без ограничения, поликлональные, моноклональные, полиспецифические и биспецифические антитела, в которых по крайней мере одно плечо является специфическим в отношении SEMA4D, человеческие, гуманизированные, приматизированные или химерные антитела, одноцепочечные антитела, эпитоп-связывающие фрагменты, например, Fab, Fab' и F(ab')₂, Fd, Fv, одноцепочечные Fv (scFv), связанные с помощью дисульфидных связей Fv (sdFv), фрагменты, включающие или VL, или VH-домен, фрагменты, продуцируемые Fab-экспрессирующей библиотекой, и антиидиотипические (анти-Id) антитела (включая, например, анти-Id антитела к антителам против SEMA4D, описанным здесь). Молекулы scFv известны в данной области техники и описаны, например, в патенте США с № 5892019. Молекулы иммуноглобулинов или антител настоящего изобретения могут быть любого типа (например, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA и IgY), класса (например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и IgA2 и т.д.), или подкласса молекулы иммуноглобулина.

Используемый здесь термин «часть тяжелой цепи» включает в себя аминокислотные последовательности, происходящие из тяжелой цепи иммуноглобулина. В некоторых вариантах осуществления полипептид, включающий часть тяжелой цепи, включает по крайней мере одно из перечисленного: VH-домен, CH1-домен, шарнирный

(например, верхнюю, среднюю и/или нижнюю часть шарнирной области) домен, СН2-домен, СН3-домен, или его вариант или фрагмент. Например, связывающий полипептид для применения в настоящем изобретении может включать полипептидную цепь, включающую СН1-домен; полипептидную цепь, включающую СН1-домен, по крайней мере часть шарнирного домена и СН2-домен; полипептидную цепь, включающую СН1-домен и СН3-домен; полипептидную цепь, включающую СН1-домен, по крайней мере часть шарнирного домена и СН3-домен, или полипептидную цепь, включающую СН1-домен, по крайней мере часть шарнирного домена, СН2-домен и СН3-домен. В другом варианте осуществления полипептид настоящего изобретения включает полипептидную цепь, включающую СН3-домен. Кроме того, в связывающем полипептиде для применения в настоящем изобретении может отсутствовать по крайней мере часть СН2-домена (например, весь или часть СН2-домена). Как указано выше, специалисту со средним уровнем компетентности в данной области техники будет понятно, что эти домены (например, части тяжелой цепи) могут быть модифицированы таким образом, чтобы они различаются по аминокислотной последовательности от встречающейся в природе молекулы иммуноглобулина.

В некоторых антителах против SEMA4D или их антигенсвязывающих фрагментах, вариантах или производных, описанных здесь, части тяжелой цепи одной полипептидной цепи мультимера идентичны таковым во второй полипептидной цепи мультимера. В качестве альтернативы, содержащие части тяжелой цепи мономеры настоящего изобретения не являются идентичными. Например, каждый мономер может включать отличный мишень-связывающий сайт, образуя, например, биспецифичное антитело.

Части тяжелой цепи связывающей молекулы для применения в способах, раскрытых здесь, могут происходить от различных молекул иммуноглобулинов. Например, часть тяжелой цепи полипептида может включать C_{H1} -домен, происходящий от молекулы IgG1, и шарнирную область, происходящую от молекулы IgG3. В другом примере часть тяжелой цепи может включать шарнирную область, происходящую отчасти от молекулы IgG1 и отчасти от

молекулы IgG3. В другом примере часть тяжелой цепи может включать химерный шарнир, происходящий отчасти от молекулы IgG1 и отчасти от молекулы IgG4.

Используемый здесь термин «часть легкой цепи» включает в себя аминокислотные последовательности, происходящие из легкой цепи иммуноглобулина, например, легкой цепи каппа или лямбда. В некоторых аспектах часть легкой цепи включает по крайней мере один из следующих доменов: VL или CL.

Антитела против SEMA4D или их антигенсвязывающие фрагменты, варианты или производные, раскрытые здесь, могут быть описаны или определены с учетом эпитопа(ов) или части(ей) антигена, например, полипептида-мишени, описанного здесь (например, SEMA4D), который они распознают или специфически связывают. Часть полипептида-мишени, который специфически взаимодействует с антигенсвязывающим доменом антитела, представляет собой «эпитоп» или «антигенную детерминанту». Полипептид-мишень может включать один эпитоп, но, как правило, включает по крайней мере два эпитопа, и может включать в себя любое количество эпитопов, в зависимости от размера, конформации и типа антигена. Кроме того, следует отметить, что термин «эпитоп» в полипептиде-мишени может представлять собой или может включать неполипептидные элементы, например, эпитоп может включать углеводную боковую цепь.

Минимальный размер пептидного или полипептидного эпитопа для антитела, как полагают, составляет приблизительно четыре-пять аминокислот. Пептидные или полипептидные эпитопы могут содержать, например, по крайней мере семь, по крайней мере девять или между по крайней мере приблизительно 15 и приблизительно 30 аминокислот. Поскольку CDR может распознавать антигенный пептид или полипептид в его третичной форме, аминокислоты, составляющие эпитоп, необязательно должны быть смежными, и в некоторых случаях, могут находиться в отдельных пептидных цепях. Пептидный или полипептидный эпитоп, распознаваемый антителами против SEMA4D настоящего изобретения, может содержать последовательность из по крайней мере 4, по крайней мере 5, по крайней мере 6, по крайней мере 7, по

крайней мере 8, по крайней мере 9, по крайней мере 10, по крайней мере 15, по крайней мере 20, по крайней мере 25 или между приблизительно 15 и приблизительно 30 смежных или несмежных аминокислот SEMA4D.

Под выражением «специфически связывается» обычно подразумевается, что антитело связывается с эпитопом через свой антигенсвязывающий домен, и что связывание влечет за собой некоторую степень комплементарности между антигенсвязывающим доменом и эпитопом. В соответствии с этим определением говорят, что антитело «специфически связывается» с эпитопом, когда оно связывается с этим эпитопом, через свой антигенсвязывающий домен, легче, чем оно бы связывалось со случайным, не соотносящимся с ним эпитопом. Термин «специфичность» используется здесь для определения относительной аффинности, в результате которого определенное антитело связывается с определенным эпитопом. Например, антитело «А» может считаться имеющим более высокую специфичность в отношении данного эпитопа, чем антитело «В», или можно сказать, что антитело «А» связывается с эпитоп «С» с более высокой специфичностью, чем оно имеет в отношении соотносящегося с ним эпитопа «D».

Под выражением «предпочтительно связывается» подразумевается, что антитело специфически связывается с эпитопом легче, чем оно бы связывалось с соотносящимся с ним, подобным, гомологичным или аналогичным эпитопом. Таким образом, антитело, которое «предпочтительно связывается» с данным эпитопом, будет скорее связываться с этим эпитопом, чем с соотносящимся с ним эпитопом, даже если такое антитело может перекрестно реагировать с соотносящимся с ним эпитопом.

В качестве неограничивающего примера, можно считать, что антитело предпочтительно связывает первый эпитоп, если оно связывает первый эпитоп с константой диссоциации (K_D), которая меньше K_D антитела для второго эпитопа. В другом неограничивающем примере можно считать, что антитело предпочтительно связывает первый эпитоп, если оно связывает первый эпитоп с аффинностью, которая на по крайней мере один порядок величины меньше K_D антитела для второго эпитопа. В

другом неограничивающем примере, можно считать, что антитело предпочтительно связывает первый эпитоп, если оно связывает первый эпитоп с аффинностью, которая на по крайней мере два порядка величины меньше K_D антитела для второго эпитопа.

В другом неограничивающем примере можно считать, что антитело предпочтительно связывает первый эпитоп, если оно связывает первый эпитоп со скоростью диссоциации ($k(\text{off})$), которая меньше $k(\text{off})$ антитела для второго эпитопа. В другом неограничивающем примере можно считать, что антитело предпочтительно связывает первый эпитоп, если оно связывает первый эпитоп с аффинностью, которая на по крайней мере один порядок величины меньше $k(\text{off})$ антитела для второго эпитопа. В другом неограничивающем примере можно считать, что антитело предпочтительно связывает первый эпитоп, если оно связывает первый эпитоп с аффинностью, которая на по крайней мере два порядка величины меньше $k(\text{off})$ антитела для второго эпитопа. Можно сказать, что антитело или антигенсвязывающий фрагмент, вариант или производное, раскрытые здесь, связывается с полипептидом-мишенью, раскрытым здесь (например, SEMA4D, например, SEMA4D человека, мыши или как человека, так и мыши) или его фрагментом или вариантом со скоростью диссоциации ($k(\text{off})$), которая меньше или равна $5 \times 10^{-2} \text{ c}^{-1}$, 10^{-2} c^{-1} , $5 \times 10^{-3} \text{ c}^{-1}$ или 10^{-3} c^{-1} . В некоторых аспектах можно сказать, что антитело настоящего изобретения связывается с полипептидом-мишенью, раскрытым здесь (например, SEMA4D, например, SEMA4D человека, мыши или как человека, так и мыши) или его фрагментом или вариантом со скоростью диссоциации ($k(\text{off})$), которая меньше или равна $5 \times 10^{-4} \text{ c}^{-1}$, 10^{-4} c^{-1} , $5 \times 10^{-5} \text{ c}^{-1}$ или 10^{-5} c^{-1} , $5 \times 10^{-6} \text{ c}^{-1}$, 10^{-6} c^{-1} , $5 \times 10^{-7} \text{ c}^{-1}$ или 10^{-7} c^{-1} .

Можно сказать, что антитело или антигенсвязывающий фрагмент, вариант или производное, раскрытые здесь, связывается с полипептидом-мишенью, раскрытым здесь (например, SEMA4D, например, SEMA4D человека, мыши или как человека, так и мыши) или его фрагментом или вариантом со скоростью ассоциации ($k(\text{on})$), которая больше или равна $10^3 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$, $5 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$, 10^4

$M^{-1} s^{-1}$ или $5 \times 10^4 M^{-1} s^{-1}$. В некоторых вариантах осуществления можно сказать, что антитело настоящего изобретения связывается с полипептидом-мишенью, раскрытым здесь (например, SEMA4D, например, SEMA4D человека, мыши или как человека, так и мыши) или его фрагментом или вариантом со скоростью ассоциации ($k(on)$), которая больше или равна $10^5 M^{-1} s^{-1}$, $5 \times 10^5 M^{-1} s^{-1}$, $10^6 M^{-1} s^{-1}$ или $5 \times 10^6 M^{-1} s^{-1}$, или $10^7 M^{-1} s^{-1}$.

Говорят, что антитело конкурентно ингибирует связывание эталонного антитела с данным эпитопом, если оно предпочтительно связывается с этим эпитопом в той степени, что оно блокирует, до некоторой степени, связывание эталонного антитела с эпитопом. Конкурентное ингибирование может быть определено любым способом, известным в данной области техники, например, с помощью анализов ELISA конкуренции. Можно сказать, что антитело конкурентно ингибирует связывание эталонного антитела с данным эпитопом на по крайней мере 90%, по крайней мере 80%, по крайней мере 70%, по крайней мере 60% или по крайней мере на 50%.

Используемый здесь термин «аффинность» относится к мере прочности связывания отдельного эпитопа с CDR молекулы иммуноглобулина. Смотрите, например, Harlow et al. (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed.) pages 27-28. Используемый здесь термин «авидность» относится к общей стабильности комплекса между совокупностью иммуноглобулинов и антигеном, т.е. прочности функционального объединения смеси иммуноглобулинов с антигеном. См. например, Harlow на страницах 29-34. Авидность связана как с аффинностью отдельных молекул иммуноглобулинов в совокупности с определенными эпитопами, а также валентностями иммуноглобулинов и антигена. Например, взаимодействие между двухвалентным моноклональным антителом и антигеном с повторяющейся в высокой степени эпитопной структурой, такой как полимер, было бы таковым высокой авидности.

Антитела против SEMA4D или их антигенсвязывающие фрагменты, варианты или производные настоящего изобретения

также могут быть описаны или определены с учетом их перекрестной реактивности. Используемый здесь термин «перекрестная реактивность» относится к способности антитела, специфического в отношении одного антигена, вступать в реакцию со вторым антигеном; мере связанности между двумя различными антигенными веществами. Таким образом, антитело является перекрестно-реактивным, если оно связывается с эпитопом, отличным от того, который индуцировал его образование. Перекрестно-реактивный эпитоп обычно содержит многие из тех же самых комплементарных структурных черт, что и индуцирующий эпитоп, а в некоторых случаях, может фактически подходить лучше, чем исходный эпитоп.

Например, некоторые антитела обладают некоторой степенью перекрестной реактивности, поскольку они связывают родственные, но неидентичные эпитопы, например, эпитопы, идентичные на по крайней мере 95%, на по крайней мере 90%, на по крайней мере 85%, на по крайней мере 80%, на по крайней мере 75%, на по крайней мере 70%, на по крайней мере 65%, на по крайней мере 60%, на по крайней мере 55% и на по крайней мере 50% (как рассчитано с использованием способов, известных в данной области техники и описанных здесь) эталонному эпитопу. Можно сказать, что антитело не обладает или практически не обладает перекрестной реактивностью, если оно не связывает эпитопы, идентичные на менее чем 95%, менее чем на 90%, менее чем на 85%, менее чем на 80%, менее 75%, менее 70%, менее чем на 65%, менее чем на 60%, менее чем на 55% и менее чем 50% (как рассчитано с использованием способов, известных в данной области техники и описанных здесь) эталонному эпитопу. Антитело можно считать «весьма специфическим» для определенного эпитопа, если оно не связывается с любым другим аналогом, ортологом или гомологом этого эпитопа.

Анти-SEMA4D связывающие молекулы, например, антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, варианты или производные, настоящего изобретения также могут быть описаны или определены с учетом их аффинности связывания с полипептидом настоящего изобретения, например, SEMA4D, например, SEMA4D человека, мыши,

или как человека, так и мыши. В некоторых аспектах аффинности связывания включают таковые с константой диссоциации или K_d , составляющей менее 5×10^{-2} М, 10^{-2} М, 5×10^{-3} М, 10^{-3} М, 5×10^{-4} М, 10^{-4} М, 5×10^{-5} М, 10^{-5} М, 5×10^{-6} М, 10^{-6} М, 5×10^{-7} М, 10^{-7} М, 5×10^{-8} М, 10^{-8} М, 5×10^{-9} М, 10^{-9} М, 5×10^{-10} М, 10^{-10} М, 5×10^{-11} М, 10^{-11} М, 5×10^{-12} М, 10^{-12} М, 5×10^{-13} М, 10^{-13} М, 5×10^{-14} М, 10^{-14} М, 5×10^{-15} М или 10^{-15} М. В некоторых вариантах осуществления анти-SEMA4D связывающая молекула, например, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, настоящего изобретения связывает человеческий SEMA4D с K_d от приблизительно 5×10^{-9} до приблизительно 6×10^{-9} . В другом варианте анти-SEMA4D связывающая молекула, например, антитело или антигенсвязывающий фрагмент, настоящего изобретения связывает мышинный SEMA4D с K_d от приблизительно 1×10^{-9} до приблизительно 2×10^{-9} .

Используемый здесь термин «химерное антитело» будет означать любое антитело, в котором иммунореактивная область или сайт получена или происходит из (от) первого вида, а константная область (которая может быть интактной, частичной или модифицированной в соответствии с настоящим изобретением) получена от второго вида. В некоторых вариантах осуществления мишень-связывающий участок или сайт будет происходить из не являющегося человеком источника (например, мыши или примата), а константная область является человеческой.

Используемый здесь термин «сконструированное антитело» относится к антителу, в котором переменный домен или тяжелой, или легкой цепи, или в обеих цепях изменен путем по крайней мере частичной замены одного или более CDR из антитела известной специфичности и, при необходимости, путем частичной замены каркасной области и изменения последовательности. Хотя CDR могут происходить из антитела того же класса или даже подкласса, что и антитело, из которого происходят каркасные области, предусматривается, что CDR будут происходить из антитела отличного класса, или из антитела от отличного вида. Сконструированное антитело, в котором один или более «донорных» CDR из нечеловеческого антитела известной специфичности

пересажен в каркасную область тяжелой или легкой цепи человека, называют здесь «гуманизированным антителом». Не всегда необходимо заменять все CDR целыми CDR из донорного переменного домена для переноса антигенсвязывающей способности одного переменного домена другому. Точнее, можно перенести только те остатки, которые необходимы для сохранения активности мишень-связывающего сайта, который необходимо перенести.

Кроме того, признается, что каркасные области внутри переменного домена в тяжелой или легкой цепи, или в обеих цепях, гуманизированного антитела могут включать исключительно остатки человеческого происхождения, и в этом случае эти каркасные области гуманизированного антитела упоминаются как «полностью человеческие каркасные области» (например, мАТ 1515/2503 или 67, описанное в публикации заявки на патент США с № 2010/0285036 А1, как мАТ 2503, которая включена сюда посредством ссылки в ее полном объеме). В качестве альтернативы, один или более остатков каркасной области(ей) донорного переменного домена может быть создан в соответствующем положении человеческой каркасной области(ей) переменного домена в тяжелой или легкой цепи, или обеих цепях, гуманизированного антитела, если это необходимо для сохранения надлежащего связывания или для усиления связывания с антигеном SEМА4D. Таким образом, человеческая каркасная область, которая была сконструирована таким образом, будет включать смесь человеческих и донорных каркасных остатков, и упоминается здесь как «частично человеческая каркасная область».

Например, гуманизация антитела против SEМА4D может быть по существу выполнена в соответствии с методикой Winter и сотрудников (Jones et al., *Nature* 321:522-525. (1986); Riechmann et al., *Nature* 332:323-327 (1988); Verhoeven et al., *Science* 239:1534-1536 (1988)), путем замены CDR или последовательностями CDR грызуна или мутантными CDR или последовательностями CDR грызуна соответствующих последовательностей человеческого антитела против SEМА4D.

Смотрите также патенты США с № 5225539, 5585089; 5693761; 5693762; 5859205; включенные сюда посредством ссылки. Полученное в результате гуманизованное антитело против SEMA4D будет включать по крайней мере один CDR грызуна или мутантный CDR грызуна внутри полностью человеческих каркасных областей переменного домена тяжелой и/или легкой цепи гуманизованного антитела. В некоторых случаях остатки в каркасных областях одного или более переменных доменов гуманизованного антитела против SEMA4D заменяют соответствующими нечеловеческими (например, грызуна) остатками (смотрите, например, патенты США с №№ 5585089; 5693761; 5693762; и 6180370), и в этом случае полученное в результате гуманизованное антитело против SEMA4D будет включать частично человеческие каркасные области в переменном домене тяжелой и/или легкой цепи.

Кроме того, гуманизованные антитела могут включать остатки, которые не обнаруживаются в антителе-реципиенте или в антителе-доноре. Эти модификации осуществляют для дальнейшего улучшения характеристик антител (например, для получения желаемой аффинности). В общем, гуманизованное антитело будет включать по существу все из по крайней мере одного и обычно двух переменных доменов, в которых все или по существу все CDR соответствуют таковым нечеловеческого иммуноглобулина, и все или по существу все каркасные области являются таковыми последовательности иммуноглобулина человека. Гуманизованное антитело необязательно также будет включать по крайней мере часть константной области иммуноглобулина (Fc), как правило, таковую иммуноглобулина человека. Ради дополнительных подробностей смотрите Jones et al., *Nature* 331:522-525 (1986); Riechmann et al., *Nature* 332:323-329 (1988); и Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2:593-596 (1992); которые включены сюда посредством ссылки. Соответственно, такие «гуманизованные» антитела могут включать антитела, в которых в значительной степени меньше чем интактный переменный домен человека был заменен соответствующей последовательностью не являющегося человеком вида. На практике, гуманизованные антитела

представляют собой, как правило, человеческие антитела, в которых некоторые остатки CDR и возможно некоторые остатки каркасных областей заменены остатками из аналогичных участков антител грызунов. Смотрите, например, патенты США с №№ 5225539; 5585089; 5693761; 5693762; 5859205. Смотрите также патент США с № 6180370 и публикацию международной заявки с № WO 01/27160, где описываются гуманизированные антитела и методы получения гуманизированных антител, имеющих увеличенную аффинность к заданному антигену.

Используемый здесь термин «поставщик медицинских услуг» относится к отдельным лицам или организациям, которые непосредственно взаимодействуют с живыми субъектами, например, являющимися людьми пациентами, и оказывают им помощь. Неограничивающие примеры поставщиков медицинских услуг включают врачей, медсестер, техников, терапевтов, фармацевтов, консультантов, специалистов-практиков альтернативной медицины, медицинские учреждения, офисы врачей, больницы, отделения экстренной медицинской помощи, клиники, центры неотложной помощи, клиники/учреждения альтернативной медицины, а также любая другая организация, обеспечивающая общее и/или специализированное лечение, оценку, техническое обслуживание, терапию, лекарственные средства и/или дающая рекомендацию в отношении всего, или любой части, из состояния здоровья пациента, в том числе, но без ограничения, общего медицинского, специализированного медицинского, хирургического и/или любого другого типа лечения, оценки, технического обслуживания, терапии, лекарственного средства и/или рекомендации.

Используемый здесь термин «поставщик медицинских льгот» охватывает отдельные партии, организации или группы, которые обеспечивают, представляют, предлагают, платят полностью или частично, или являются иным образом связанными с обеспечением доступа пациента к одной или более медицинских льгот, планов с установленными выплатами, медицинскому страхованию и/или программам счетов расходов на здравоохранение.

Используемый здесь термин «клиническая лаборатория» относится к учреждению для проведения исследования или

обработки материалов или изображений, полученных от живого субъекта, например, человека. Неограничивающие примеры обработки включают биологическое, биохимическое, серологическое, химическое, иммуногематологическое, гематологическое, биофизическое, цитологическое, патологическое, генетическое, на основе изображения или другое исследование материалов, полученных из тела человека или частично или полностью тела человека с целью предоставления информации, например, для диагностики, профилактики или лечения любого заболевания или нарушения, или оценки состояния здоровья живых субъектов, например, людей. Эти исследования могут также включать процедуры для сбора или иным образом получения изображения, образца, подготовки, определения, измерения или иным образом описания присутствия или отсутствия различных веществ в теле живого субъекта, например, человека, или образце, полученном из тела живого субъекта, например, человека.

II. Описание полипептида-мишени

Используемые здесь термины «семафорин 4D», «SEMA4D» и «полипептид SEMA4D» используются взаимозаменяемо, так же как и «SEMA4D» и «Sema4D». В некоторых вариантах осуществления SEMA4D представлен на поверхности клетки или секретируется клеткой. В другом варианте осуществления SEMA4D является мембраносвязанным. В других вариантах осуществления SEMA4D является растворимым, например, sSEMA4D. В других вариантах осуществления SEMA4D может включать полноразмерный SEMA4D или его фрагмент, или вариант полипептида SEMA4D, причем фрагмент SEMA4D или вариант полипептида SEMA4D сохраняет некоторые или все функциональные свойства полноразмерного SEMA4D.

Полноразмерный белок SEMA4D человека представляет собой гомодимерный трансмембранный белок, состоящий из двух полипептидных цепей с М.м. 150 кДа. SEMA4D относится к семейству рецепторов клеточной поверхности семафоринов и также упоминается как CD100. SEMA4D/Sema4D и человека, и мыши протеолитически отщепляется от их трансмембранной формы с образованием растворимых форм с М.м. 120 кДа, что указывает на

существование двух изоформ Sema4D (Kumanogoh et al., *J. Cell Science* 116 (7):3464 (2003)). Семафорины состоят из растворимых и мембраносвязанных белков, которые первоначально были определены как факторы аксонального наведения во время развития, которые играют важную роль в установлении точных связей между нейронами и их соответствующей целью. Структурно считающийся семафоринем класса IV, SEMA4D состоит из N-концевой сигнальной последовательности с последующим характерным доменом «Sema», который содержит 17 консервативных остатков цистеина, Ig-подобный домен, богатый лизином участок, гидрофобный трансмембранный участок и цитоплазматический хвост.

Полипептидная цепь SEMA4D может включать сигнальную последовательность из приблизительно 13 аминокислот и, кроме того, включает домен семафорина из приблизительно 512 аминокислот, иммуноглобулин-подобный (Ig-подобный) домен из приблизительно 65 аминокислот, богатый лизином участок из 104 аминокислот, гидрофобный трансмембранный участок из приблизительно 19 аминокислот и цитоплазматический хвост из 110 аминокислот. Консенсусный сайт для фосфорилирования тирозина в цитоплазматическом хвосте поддерживает прогнозируемую ассоциацию SEMA4D с тирозинкиназой (Schlossman, et al., Eds. (1995) *Leucocyte Typing V* (Oxford University Press, Oxford)).

Известно, что SEMA4D имеет по крайней мере три функциональных рецептора, плексин-B1, плексин-B2 и CD72. Один из рецепторов, плексин-B1, экспрессируется в нелимфоидных тканях и, как было установлено, является рецептором с высоким сродством (1 нМ) к SEMA4D (Tamagnone et al, *Cell*, 99:71-80 (1999)). Было установлено, что стимуляция с помощью SEMA4D передачи сигнала от плексина-B1 вызывает коллапс конуса роста нейронов и вызывает коллапс удлинения отростков и апоптоз олигодендроцитов (Giraudon et al., *J. Immunol.* 172:1246-1255 (2004); Giraudon et al., *NeuroMolecular Med.* 7:207-216 (2005)). После связывания с SEMA4D, передача сигнала от плексина-B1 опосредует инактивацию R-Ras, что приводит к уменьшению интегрин-опосредованного прикрепления к экстраклеточному матриксу, а также активацию RhoA, что приводит к реорганизации

цитоскелета и миграции клеток. Смотрите Kruger *et al.*, *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 6:789-800 (2005); Pasterkamp, *TRENDS in Cell Biology* 15:61-64 (2005)). С другой стороны, плексин-B2 обладает промежуточным сродством к SEMA4D, и в недавних сообщениях указывается, что плексин-B2 регулирует миграцию корковых нейронов и пролиферацию и миграцию нейробластов в субвентрикулярной зоне взрослого (Azzarelli *et al.*, *Nat Commun* 2014 Feb 27, 5:3405, DOI: 10.1038/ncomms4405; и Saha *et al.*, *J. Neuroscience*, 2012 November 21, 32(47):16892-16905).

В лимфоидных тканях CD72 используется в качестве рецептора SEMA4D с низким сродством (300 нМ) (Kumanogoh *et al.*, *Immunity* 13:621-631 (2000)). В-клетки и APS экспрессируют CD72, и антитела против CD72 оказывают многие из тех же эффектов, что и sSEMA4D, такие как увеличение CD40-индуцированных гуморальных иммунных ответов и сбрасывания CD23 В-клетками. CD72, как полагают, служит в качестве негативного регулятора гуморального иммунного ответа путем рекрутинга тирозинфосфатазы SHP-1, которая может ассоциироваться со многими ингибирующими рецепторами. Взаимодействие SEMA4D с CD72 приводит к диссоциации SHP-1, и потере этого отрицательного сигнала активации. Сообщалось, что SEMA4D способствует стимуляции Т-клеток и агрегации В-клеток и их выживанию *in vitro*. Добавление SEMA4D-экспрессирующих клеток или sSEMA4D усиливает CD40-индуцированную пролиферацию В-клеток и продукцию иммуноглобулина *in vitro* и ускоряет *in vivo* образование антител (Ishida *et al.*, *Inter. Immunol.* 15:1027-1034 (2003); Kumanogoh and H. Kukutani, *Trends in Immunol.* 22:670-676 (2001)). sSEMA4D усиливает CD40-индуцированное созревание дендритных клеток (DC), в том числе увеличение экспрессии костимулирующих молекул и увеличенную секрецию IL-12. Кроме того, sSEMA4D может ингибировать миграцию клеток иммунной системы, что может быть отменено путем добавления блокирующих антител против SEMA4D (Elhabazi *et al.*, *J. Immunol.* 166:4341-4347 (2001); Delaire *et al.*, *J. Immunol.* 166:4348-4354 (2001)).

Sema4D экспрессируется на высоких уровнях в лимфоидных органах, в том числе селезенке, вилочковой железе и

лимфатических узлах, и в нелимфоидных органах, таких как головной мозг, сердце и почки. В лимфоидных органах Sema4D экспрессируется в большом количестве в покоящихся Т-клетках, но лишь слабо экспрессируется в покоящихся В-клетках и антигенпрезентирующих клетках (АРС), таких как DC. Активация клеток увеличивает представленность на поверхности SEMA4D, а также образование растворимого SEMA4D (sSEMA4D).

Профиль экспрессии SEMA4D наводит на мысль о том, что он играет важную физиологическую, а также патологическую роль в иммунной системе. Было установлено, что SEMA4D стимулирует активацию В-клеток, их агрегации и выживание; усиливает CD40-индуцированную пролиферацию и образование антител; усиливает выработку антител в ответ на Т-зависимые антигены; увеличивает пролиферацию Т-клеток; увеличивает созревание дендритных клеток и их способность к стимуляции Т-клеток; и непосредственно вовлечен в демиелинизацию и дегенерацию аксонов (Shi *et al.*, *Immunity* 13:633-642 (2000); Kumanogoh *et al.*, *J Immunol* 169:1175-1181 (2002); и Watanabe *et al.*, *J Immunol* 167:4321-4328 (2001)).

Мыши с нокаутом гена SEMA4D (SEMA4D^{-/-}) обеспечили дополнительное доказательство того, что SEMA4D играет важную роль как в гуморальном, так и клеточном иммунном ответе. У мышей SEMA4D^{-/-} отсутствуют известные крупные аномалии нелимфоидных тканей. DC от мышей SEMA4D^{-/-} обладают плохой аллостимуляторной способностью и демонстрируют недостаток экспрессии костимулирующих молекул, от чего можно избавиться добавлением sSEMA4D. У мышей, дефицитных по SEMA4D (SEMA4D^{-/-}), не развивается экспериментальный аутоиммунный энцефаломиелит, индуцируемый пептидом гликопротеина миелина-олигодендроцитов, поскольку специфические в отношении гликопротеина миелина-олигодендроцитов Т-клетки плохо генерируются в отсутствие SEMA4D (Kumanogoh *et al.*, *J Immunol*, 169:1175-1181 (2002)). Значительное количество растворимого SEMA4D также обнаруживается в сыворотках предрасположенных к аутоиммунитету мышей MRL/lpr (модели системных аутоиммунных заболеваний, таких как SLE), но не у нормальных мышей. Кроме того, уровни sSEMA4D

соотносятся с уровнями аутоантител и увеличиваются с возрастом (Wang et al., *Blood* 97:3498-3504 (2001)). Было также установлено, что растворимый SEMA4D накапливается в спинномозговой жидкости и сыворотках пациентов с демиелинизирующим заболеванием, и sSEMA4D индуцирует апоптоз плюрипотентных клеток-предшественников нейронов (Dev-клеток) и как ингибирует удлинение отростков, так и индуцирует апоптоз олигодендроцитов крысы *in vitro* (Giraudon et. *J Immunol*, 172(2):1246-1255 (2004)). Этот апоптоз был блокирован с помощью мАТ против SEMA4D.

III. Антитела против SEMA4D

Антитела, которые связываются с SEMA4D, были описаны в данной области техники. Смотрите, например, патент США с № 8496938, публикации заявок на патент США с №№ 2008/0219971 A1, US 2010/0285036 A1 и US 2006/0233793 A1, международные заявки на патенты WO 93/14125, WO 2008/100995 и WO 2010/129917, и Herold et al., *Int. Immunol.* 7(1):1-8 (1995), каждый из которых включен сюда во всей своей полноте посредством ссылки.

Настоящее изобретение в целом относится к способу облегчения симптомов у субъекта, имеющего нейровоспалительное или нейродегенеративное нарушение, например, у являющего человеком пациента, включающему введение антитела, которое специфически связывается с SEMA4D, или его антигенсвязывающего фрагмента, варианта или производного. В некоторых вариантах осуществления антитело блокирует взаимодействие SEMA4D с одним или несколькими из его рецепторов, например, плексином-B1. Антитела против SEMA4D, обладающие этими свойствами, могут использоваться в способах, предусмотренных здесь. Антитела, которые могут использоваться, включают, но без ограничения, мАТ VX15/2503, 67 и 76 и их антигенсвязывающие фрагменты, варианты или производные, которые подробно описаны в US 2010/0285036 A1. Дополнительные антитела, которые могут использоваться в предусмотренных здесь способах, включают антитела BD16 и BB18, описанные в US 2006/0233793 A1, а также их антигенсвязывающие фрагменты, варианты или производные; или любое из мАТ 301, мАТ 1893, мАТ 657, мАТ 1807, мАТ 1656, мАТ 1808, мАТ 59, мАТ 2191,

мАт 2274, мАт 2275, мАт 2276, мАт 2277, мАт 2278, мАт 2279, мАт 2280, мАт 2281, мАт 2282, мАт 2283, мАт 2284 и мАт 2285, а также любые их фрагменты, варианты или производные, описанные в US 2008/0219971 A1. В некоторых вариантах осуществления антитело против SEMA4D для применения в способах, предусмотренных здесь, связывается с SEMA4D человека, мыши, или как человека, так и мыши. Также применимы антитела, которые связываются с тем же эпитопом, что и любое из вышеупомянутых антител, и/или антитела, которые конкурентно ингибируют любое из вышеупомянутых антител.

В некоторых вариантах осуществления антитело против SEMA4D или его антигенсвязывающий фрагмент, вариант или производное, применимое в предусмотренных здесь способах, имеет аминокислотную последовательность, которая идентична на по крайней мере приблизительно 80%, приблизительно 85%, приблизительно 88%, приблизительно 89%, приблизительно 90%, приблизительно 91%, приблизительно 92%, приблизительно 93%, приблизительно 94% или приблизительно 95% аминокислотной последовательности для молекулы эталонного антитела против SEMA4D, например, тех, которые описаны выше. В дополнительном варианте осуществления связывающая молекула идентична по последовательности на по крайней мере приблизительно 96%, приблизительно 97%, приблизительно 98%, приблизительно 99% или 100% эталонному антителу.

В другом варианте осуществления антитело против SEMA4D или его антигенсвязывающий фрагмент, вариант или производное, применимое в предусмотренных здесь способах, включает, по существу состоит из или состоит из варибельного домена тяжелой цепи иммуноглобулина (VH-домена), причем по крайней мере один из CDR VH-домена имеет аминокислотную последовательность, которая идентична на по крайней мере приблизительно 80%, приблизительно 85%, приблизительно 90%, приблизительно 95%, приблизительно 96%, приблизительно 97%, приблизительно 98% или приблизительно 99% CDR1, CDR2 или CDR3 SEQ ID NO:9 или 10.

В другом варианте осуществления антитело против SEMA4D или его антигенсвязывающий фрагмент, вариант или производное,

применимое в предусмотренных здесь способах, включает, по существу состоит из или состоит из переменного домена тяжелой цепи иммуноглобулина (VH-домена), причем по крайней мере один из CDR VH-домена имеет аминокислотную последовательность, которая идентична на по крайней мере приблизительно 80%, приблизительно 85%, приблизительно 90%, приблизительно 95%, приблизительно 96%, приблизительно 97%, приблизительно 98% или приблизительно 99% последовательности SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7 или SEQ ID NO:8.

В другом варианте осуществления антитело против SEMA4D или его антигенсвязывающий фрагмент, вариант или производное, применимое в предусмотренных здесь способах, включает, по существу состоит из или состоит из переменного домена тяжелой цепи иммуноглобулина (VH-домена), причем по крайней мере один из CDR VH-домена имеет аминокислотную последовательность, которая идентична, за исключением 1, 2, 3, 4 или 5 консервативных аминокислотных замен, последовательности SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7 или SEQ ID NO:8.

В другом варианте осуществления антитело против SEMA4D или его антигенсвязывающий фрагмент, вариант или производное, применимое в предусмотренных здесь способах, включает, по существу состоит из или состоит из VH-домена, который имеет аминокислотную последовательность, которая идентична на по крайней мере приблизительно 80%, приблизительно 85%, приблизительно 90%, приблизительно 91%, приблизительно 92%, приблизительно 93%, приблизительно 94%, приблизительно 95%, приблизительно 96%, приблизительно 97%, приблизительно 98%, приблизительно 99% или 100% последовательности SEQ ID NO:9 или SEQ ID NO:10, причем антитело против SEMA4D, включающее кодируемый VH-домен, специфически или предпочтительно связывается с SEMA4D.

В другом варианте осуществления антитело против SEMA4D или его антигенсвязывающий фрагмент, вариант или производное, применимое в предусмотренных здесь способах, включает, по существу состоит из или состоит из переменного домена легкой цепи иммуноглобулина (VL-домена), причем по крайней мере один

из CDR VL-домена имеет аминокислотную последовательность, которая идентична на по крайней мере приблизительно 80%, приблизительно 85%, приблизительно 90%, приблизительно 95%, приблизительно 96%, приблизительно 97%, приблизительно 98% или приблизительно 99% CDR1, CDR2 или CDR3 SEQ ID NO:17 или 18.

В другом варианте осуществления антитело против SEMA4D или его антигенсвязывающий фрагмент, вариант или производное, применимое в предусмотренных здесь способах, включает, по существу состоит из или состоит из переменного домена легкой цепи иммуноглобулина (VL-домена), причем по крайней мере один из CDR VL-домена имеет аминокислотную последовательность, которая идентична на по крайней мере приблизительно 80%, приблизительно 85%, приблизительно 90%, приблизительно 95%, приблизительно 96%, приблизительно 97%, приблизительно 98% или приблизительно 99% последовательности SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:15 или SEQ ID NO:16.

В другом варианте осуществления антитело против SEMA4D или его антигенсвязывающий фрагмент, вариант или производное, применимое в предусмотренных здесь способах, включает, по существу состоит из или состоит из переменного домена легкой цепи иммуноглобулина (VL-домена), причем по крайней мере один из CDR VL-домена имеет аминокислотную последовательность, которая идентична, за исключением 1, 2, 3, 4 или 5 консервативных аминокислотных замен, последовательности SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:15 или SEQ ID NO:16.

В дополнительном варианте осуществления антитело против SEMA4D или его антигенсвязывающий фрагмент, вариант или производное, применимое в предусмотренных здесь способах, включает, по существу состоит из или состоит из VL-домена, который имеет аминокислотную последовательность, которая идентична на по крайней мере приблизительно 80%, приблизительно 85%, приблизительно 90%, приблизительно 91%, приблизительно 92%, приблизительно 93%, приблизительно 94%, приблизительно 95%, приблизительно 96%, приблизительно 97%, приблизительно 98%, приблизительно 99% или 100% последовательности SEQ ID NO:17 или SEQ ID NO:18, причем антитело против SEMA4D,

включающее кодируемый VL-домен, специфически или предпочтительно связывается с SEMA4D.

Для применения в способах, предусмотренных здесь, также включены полипептиды, кодирующие антитела против SEMA4D или их антигенсвязывающие фрагменты, варианты или производные, описанные здесь, полинуклеотиды, кодирующие такие полипептиды, векторы, содержащие такие полинуклеотиды, и клетки-хозяева, содержащие такие векторы или полинуклеотиды, все для продуцирования антител против SEMA4D или их антигенсвязывающих фрагментов, вариантов или производных для применения в способах, описанных здесь.

Подходящие биологически активные варианты антител против SEMA4D настоящего изобретения могут использоваться в способах настоящего изобретения. Такие варианты будут сохранять желаемые свойства связывания родительского антитела против SEMA4D. Способы получения вариантов антител, как правило, доступны в данной области техники.

Методы мутагенеза и изменений нуклеотидных последовательностей хорошо известны в данной области техники. Смотрите, например, Walker and Gaastra, eds. (1983) *Techniques in Molecular Biology* (MacMillan Publishing Company, New York); Kunkel, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:488-492 (1985); Kunkel et al., *Methods Enzymol.* 154:367-382 (1987); Sambrook et al. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor, N.Y.); патент США с № 4873192; и приведенные там ссылки; которые включены сюда посредством ссылки. Руководство в отношении соответствующих аминокислотных замен, которые не влияют на биологическую активность представляющего интерес полипептида, можно найти в модели Dayhoff и др. (1978) в *Atlas of Protein Sequence and Structure* (Natl. Biomed. Res. Found., Washington, D.C.), pp. 345-352, включенном сюда посредством ссылки во всей своей полноте. В модели Dayhoff и др. используется матрица схожести аминокислот на основе закрепившихся точечных мутаций (PAM) (матрица PAM 250) для определения подходящих консервативных аминокислотных замен. В некоторых вариантах осуществления могут использоваться

консервативные замены, такие как замена одной аминокислоты другой, имеющей сходные свойства. Примеры консервативных аминокислотных замен, как указывает матрица PAM 250 модели Dayhoff и др., включают, но без ограничения, Gly↔Ala, Val↔Ile↔Leu, Asp↔Glu, Lys↔Arg, Asn↔Gln и Phe↔Trp↔Tyr.

При конструировании вариантов анти-SEMA4D связывающей молекулы, например, антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, представляющих интерес полипептидов, осуществляют модификации из условия, чтобы варианты по-прежнему обладали желаемыми свойствами, например, были способны специфически связываться с SEMA4D, например, SEMA4D человека, мыши или как человека, так и мыши, например, экспрессировались на поверхности или секретировались клеткой и обладали SEMA4D-блокирующей активностью, как описано здесь. Очевидно, что любые мутации, осуществленные в ДНК, кодирующей вариант полипептида, не должны выводить последовательность из рамки считывания и в некоторых вариантах осуществления не будут создавать комплементарные участки, которые могли бы создавать вторичную структуру мРНК. Смотрите публикации заявки на патент EP с № 75444.

Способы измерения специфичности связывания анти-SEMA4D связывающей молекулы, например, антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, варианта или производного, включают, но без ограничения, стандартные анализы конкурентного связывания, анализы для контроля секреции иммуноглобулинов Т-клетками или В-клетками, анализы пролиферации Т-клеток, анализы апоптоза, анализы ELISA, и т.п. Смотрите, например, такие анализы, которые описаны в WO 93/14125; Shi *et al.*, *Immunity* 13:633-642 (2000); Kumanogoh *et al.*, *J Immunol* 169:1175-1181 (2002); Watanabe *et al.*, *J Immunol* 167:4321-4328 (2001); Wang *et al.*, *Blood* 97:3498-3504 (2001); и Giraudon *et al.*, *J Immunol* 172(2):1246-1255 (2004), все из которых включены сюда посредством ссылки.

При обсуждении здесь, идентичен ли какой-либо конкретный полипептид, в том числе константные области, CDR, VH-домены или

VL-домены, описанные здесь, на по крайней мере приблизительно 65%, приблизительно 70%, приблизительно 75%, приблизительно 80%, приблизительно 85%, приблизительно 90%, приблизительно 91%, приблизительно 92%, приблизительно 93%, приблизительно 94%, приблизительно 95%, приблизительно 96%, приблизительно 97%, приблизительно 98%, приблизительно 99% или даже приблизительно 100% другому полипептиду, может быть определен % идентичности с использованием методов и компьютерных программ/программного обеспечения, известных в данной области техники, таких как, но без ограничения, программа BESTFIT (Wisconsin Sequence Analysis Package, Version 8 for Unix, Genetics Computer Group, University Research Park, 575 Science Drive, Madison, Wis. 53711). В BESTFIT используется алгоритм локальной гомологии Smith и Waterman (1981) в Adv. Appl. Math. 2:482-489, чтобы найти лучший сегмент гомологии между двумя последовательностями. При использовании BESTFIT или любой другой программы для совмещения последовательностей, чтобы определить, идентична ли конкретная последовательность, например, на 95% эталонной последовательности в соответствии с настоящим изобретением, параметры устанавливаются, конечно, таким образом, что процент идентичности вычисляется по всей длине эталонной последовательности полипептида, и допускаются пробелы в гомологии вплоть до 5% от общего количества аминокислот в эталонной последовательности.

Для целей настоящего изобретения процент идентичности последовательности может быть определен с использованием алгоритма поиска гомологии Smith-Waterman, используя поиск схожих гэпов, со штрафом за открытие гэпа в размере 12 и штрафом за удлинение гэпов в размере 2, BLOSUM матрицу 62. Алгоритм поиска гомологии Смита-Waterman сообщается в Smith and Waterman (1981) Adv. Appl. Math. 2:482-489. Вариант может, например, отличаться от эталонного антитела против SEMA4D (например, МАт VX15/2503, 67 или 76) на всего лишь от 1 до 15 аминокислотных остатков, на всего лишь от 1 до 10 аминокислотных остатков, например, 6-10, на всего лишь 5, на всего лишь 4, 3, 2 или даже 1 аминокислотный остаток.

Процент «идентичности последовательности» также может быть определен путем сравнения двух оптимально совмещенных последовательностей в окне сравнения. Для обеспечения оптимального совмещения последовательностей для сравнения, часть полинуклеотидной или полипептидной последовательности в окне сравнения может включать добавления или делеции, называемые гэпами, в то время как эталонную последовательность сохраняют неизменной. Оптимальным совмещением является такое совмещение, которое, даже с гэпами, создает максимально возможное количество «идентичных» положений между эталонной последовательностью и последовательностью сравнения. Процент «идентичности последовательностей» между двумя последовательностями можно определить, используя версию программы «BLAST 2 Sequences», которая была доступна из Национального центра биотехнологической информации по состоянию на 1 сентября 2004 г., причем эта программа включает в себя программы BLASTN (для сравнения нуклеотидных последовательностей) и BLASTP (для сравнения полипептидных последовательностей), которые основаны на алгоритме Karlin и Altschul (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90(12):5873-5877, 1993). При использовании «BLAST 2 Sequences», параметры, которые были параметрами по умолчанию по состоянию на 1 сентября 2004 г., могут быть использовано для размера слова (3), штрафа за открытие гэпа (11), штрафа за удлинение гэпа (1), уменьшения гэпа (50), ожидаемого значения (10) и любого другого необходимого параметр, включая, но без ограничения, вариант матрицы.

Константную область антитела против SEMA4D антитела можно мутировать для изменения эффекторной функции несколькими способами. Например, смотрите патент США с № 6737056B1 и публикацию заявки на патент США с № 2004/0132101A1, в которых описываются мутации в Fc, оптимизирующие связывание антитела с Fc-рецепторами.

В некоторых антителах против SEMA4D или их фрагментах, вариантах или производных, применимых в предусмотренных здесь способах, Fc-часть может быть мутирована для уменьшения

эффекторной функции, используя известные в данной области техники методы. Например, делеция или инактивация (через точечные мутации или другие средства) домена константной области может уменьшить связывание с Fc-рецептором циркулирующего модифицированного антитела, тем самым увеличивая локализацию в опухоли. В других случаях модификации константной области в соответствии с настоящим изобретением ослабляют связывание комплемента и тем самым уменьшают полупериод существования в сыворотке. Тем не менее, другие модификации константной области могут использоваться для модификации дисульфидных связей или олигосахаридных фрагментов, что позволяет увеличить локализацию благодаря увеличенной специфичности в отношении антигена или гибкости антитела. Полученный в результате физиологический профиль, биодоступность и другие биохимические эффекты этих модификаций, такие как локализация в опухоли, биораспределение и полупериод существования в сыворотке, могут быть легко измерены и количественно определены с использованием хорошо известных иммунологических методов, без излишнего экспериментирования. Антитела против SEMA4D для применения в способах, предусмотренных здесь, включают производные, которые модифицированы, например, путем ковалентного присоединения любого типа молекулы к антителу таким образом, что ковалентное присоединение не мешает специфическому связыванию антитела с соответствующим ему эпитопом. Например, но не в качестве ограничения, производные антител включают антитела, которые были модифицированы, например, путем гликозилирования, ацетилирования, пэгирования, фосфорилирования, амидирования, дериватизации с использованием известных защитных/блокирующих групп, протеолитического расщепления, связывания с клеточным лигандом или другим белком и т.д. Любая из многочисленных химических модификаций может быть осуществлена с использованием известных методов, в том числе, но без ограничения, специфического химического расщепления, ацетилирования, формилирования и т.д. Кроме того, производное может содержать одну или несколько неклассических аминокислот.

«Консервативная аминокислотная замена» представляет собой замену, в случае которой аминокислотный остаток заменен на аминокислотный остаток, имеющий боковую цепь со сходным зарядом. Семейства аминокислотных остатков, имеющих боковые цепи со сходными зарядами, были определены в данной области техники. Эти семейства включают аминокислоты с основными боковыми цепями (например, лизин, аргинин, гистидин), кислотными боковыми цепями (например, аспарагиновую кислоту, глутаминовую кислоту), незаряженными полярными боковыми цепями (например, глицин, аспарагин, глутамин, серин, треонин, тирозин, цистеин), неполярными боковыми цепями (например, аланин, валин, лейцин, изолейцин, пролин, фенилаланин, метионин, триптофан), бета-разветвленными боковыми цепями (например, треонин, валин, изолейцин) и ароматическими боковыми цепями (например, тирозин, фенилаланин, триптофан, гистидин). В качестве альтернативы, мутации могут быть введены случайным образом вдоль всей или части кодирующей последовательности, например, путем насыщающего мутагенеза, и полученные мутанты могут быть подвергнуты скринингу на предмет биологической активности с целью идентификации мутантов, которые сохраняют активность (например, способность связываться с полипептидом SEMA4D, блокировать взаимодействие SEMA4D с его рецептором или облегчать симптомы, сопровождающие нейродегенеративное нарушение у пациента).

Например, можно ввести мутации только в каркасные области или только в CDR-участки молекулы антитела. Введенные мутации могут быть молчащими или нейтральными миссенс-мутациями, т.е. не оказывать или оказывать незначительный эффект на способность антитела к связыванию антигенами. Эти типы мутаций могут быть полезны для оптимизации частоты использования кодонов или увеличения выработки антител гибридами. В качестве альтернативы, не являющиеся нейтральными миссенс-мутации могут изменять способность антитела к связыванию антигена. Квалифицированный в данной области техники специалист сможет разработать и проверить мутантные молекулы с желаемыми свойствами, такими как отсутствие изменения антигенсвязывающей

активности или изменения активности связывания (например, увеличений антигенсвязывающей активности или изменения специфичности антител). После мутагенеза, кодируемый белок может быть запросто экспрессирован, и функциональная и/или биологическая активность кодируемого белка (например, способность к иммуноспецифическому связыванию по крайней мере одного эпитопа полипептида SEMA4D) может быть определена, используя методы, описанные здесь, или с помощью обычной модификации методов, известных в данной области техники.

В некоторых вариантах осуществления антитела против SEMA4D для применения в способах, предусмотренных здесь, включают по крайней мере один оптимизированный определяющий комплементарность участок (CDR). Под «оптимизированным CDR» подразумевается, что CDR был модифицирован и оптимизирован для увеличения аффинности и/или анти-SEMA4D активности, которая придается антителу против SEMA4D, включающему оптимизированный CDR. «Анти-SEMA4D активность» или «SEMA4D-блокирующая активность» может включать активность, которая модулирует одну или более из следующих активностей, связанных с SEMA4D: активацию В-клеток, их агрегацию и выживание; CD40-индуцированную пролиферацию и образование антител; выработку антител в ответ на Т-зависимые антигены; пролиферацию Т-клеток и других иммунцитов; созревание дендритных клеток; демиелинизацию и дегенерацию аксонов; апоптоз плюрипотентных клеток-предшественников нейронов и/или олигодендроцитов; индукцию миграции эндотелиальных клеток; ингибирование спонтанной миграции моноцитов; связывание с плексином-В1 на клеточной поверхности или другим рецептором, или любую другую активность, связанную с растворимым SEMA4D или SEMA4D, который представлен на поверхности SEMA4D+ клеток. Анти-SEMA4D активность также может быть связана с уменьшением частоты или тяжести заболеваний, связанных с экспрессией SEMA4D, в том числе, но без ограничения, некоторых типов раков, включая лимфомы, аутоиммунных заболеваний, воспалительных заболеваний, включая воспалительные заболевания центральной нервной системы (ЦНС) и периферической нервной системы (ПНС), отторжений

трансплантата, и инвазивного ангиогенеза. Примеры оптимизированных антител, основанных на мышиных анти-SEMA4D мАТ BD16 и BB18, были описаны в публикации заявки на патент США с № 2008/0219971 A1, в международной заявке на патент WO 93/14125 и Herold et al., *Int. Immunol.* 7 (1):1-8 (1995), каждая из которых включена сюда посредством ссылки во всей своей полноте. Модификации могут включать в себя замену аминокислотных остатков в пределах CDR из условия, чтобы антитело против SEMA4D сохраняло специфичность в отношении антигена SEMA4D и обладало увеличенной аффинностью и/или увеличенной анти-SEMA4D активностью.

IV. Астроциты

Астроциты представляют собой специализированные глиальные клетки, которые выполняют многие важные сложные функции в ЦНС здорового человека, в том числе регуляцию кровотока, гомеостаза жидкостей/ионов/pH/нейромедиаторов, формирования/функционирования синапсов, энергии и метаболизма, а также сохранение гематоэнцефалического барьера (Barres BA (2008) *The mystery and magic of glia: a perspective on their roles in health and disease. Neuron* 60:430-440). Важно отметить, что астроциты реагируют на повреждения ЦНС через процесс, называемый реактивным астроглиозом, который служит в качестве основного патологического признака нейровоспалительных и нейродегенеративных заболеваний. Увеличивающийся объем данных указывает возможность того, что реактивный астроглиоз играет или основную, или дополнительную роль в нарушениях ЦНС через потерю нормальных функций астроцитов или увеличение аномальных активностей. Принимая во внимание их центральную роль во многих заболеваниях ЦНС, существует значительная потребность в идентификации и тщательном тестировании новых молекулярных мишеней, которые восстанавливают нормальную функцию астроцитов, для эффективного замедления или даже обращения вспять прогрессирования заболеваний. Существует несколько возможных путей, через которые астроциты могут влиять на заболевания ЦНС.

Астроциты и поддержка клеток-предшественников олигодендроцитов (ОРС). Демиелинизация, которая происходит при

нейровоспалительных заболеваниях, таких как рассеянный склероз, связана с заметным разрушением и потерей клеток, включая линию олигодендроцитов (Ozawa K, et al. Patterns of oligodendroglia pathology in multiple sclerosis. Brain. 1994; 117:1311-1322). Эндогенные механизмы ремиелинизации не действуют на этапе восстановления частично из-за неспособности ОРС полностью дифференцироваться в зрелые, осуществляющие миелинизацию олигодендроциты (Wolswijk G. Oligodendrocyte survival, loss and birth in lesions of chronic-stage multiple sclerosis. Brain. 2000; 123:105-115). Данные, полученные из других моделей экспериментально индуцированной демиелинизации, показывают, что вновь созревающие ОРС, в отличие от выживающих зрелых олигодендроцитов, необходимы для ремиелинизации во время этапа восстановления (Levine JM, Reynolds R. Activation and proliferation of endogenous oligodendrocyte precursor cells during ethidium bromide-induced demyelination. Exp Neurol. 1999; 160:333-347). Было установлено, что астроциты играют важную роль в поддержании функции и жизнеспособности линии олигодендроцитов. Например, Talbott и его коллеги показали, что в индуцированных бромистым этидием демиелинизированных очагах астроциты необходимы для того, чтобы Nkx2.2+/Olig2+ ОРС полностью дифференцировались в олигодендроциты и осуществляли ремиелинизацию (Exp Neurol. 2005 Mar;192(1):11-24. Endogenous Nkx2.2+/Olig2+ oligodendrocyte precursor cells fail to remyelinate the demyelinated adult rat spinal cord in the absence of astrocytes. Talbott JF, Loy DN, Liu Y, Qiu MS, Bunge MB, Rao MS, Whittemore SR). Arai и Lo продемонстрировали *in vitro*, что астроциты оказывают поддержку в виде растворимой формы трофического фактора клеткам ОРС, которые защищают эти клетки от увеличенного окислительного стресса (Arai, K. and Lo, E. H. (2010), Astrocytes protect oligodendrocyte precursor cells via MEK/ERK and PI3K/Akt signaling. J. Neurosci. Res., 88: 758-763. doi: 10.1002/jnr.22256). Другие показали, что ингибирование активации астроцитов в условиях экспериментального аутоиммунного энцефаломиелита, экспериментального неврита зрительного нерва и повреждения

спинного мозга приводит к улучшению профилей ремиелинизацию и показателей функционального исхода болезни (Brambilla R, Persaud T, Hu X, Karmally S, Shestopalov VI, Dvorianchikova G, Ivanov D, Nathanson L, Barnum SR, Bethea JR. 2009. Transgenic inhibition of astroglial NF-kappa B improves functional outcome in experimental autoimmune encephalomyelitis by suppressing chronic central nervous system inflammation. *J Immunol* 182:2628-2640; Brambilla R, Dvorianchikova G, Barakat D, Ivanov D, Bethea JR, Shestopalov VI. 2012. Transgenic inhibition of astroglial NF-kappaB protects from optic nerve damage and retinal ganglion cell loss in experimental optic neuritis. *J Neuroinflammation* 9:213; Brambilla R, Bracchi-Ricard V, Hu WH, Frydel B, Bramwell A, Karmally S, Green EJ, Bethea JR. 2005. Inhibition of astroglial nuclear factor kappaB reduces inflammation and improves functional recovery after spinal cord injury. *J Exp Med* 202:145-156).

Учитывая ту роль, которую играют астроциты в содействии выживанию и функционированию OPC, непосредственное соседство экспрессирующих SEMA4D OPC и экспрессирующих рецепторы для SEMA4D астроцитов, идентифицированных здесь, предполагает, что связанная с заболеванием активация астроцитов вместе с увеличением экспрессии рецепторов плексина-В и передачей сигнала от SEMA4D оказывают сильное воздействие на функционирование OPC.

Астроциты и поддержка нейронов. Накапливающиеся данные указывают на то, что астроциты играют непосредственную роль в синаптической передаче через регулируемый выброс синаптически активных молекул, включая глутамат, пурины (АТФ и аденозин), GABA (ГАМК) и D-серин (обзор Halassa MM, Fellin T, Haydon PG (2007), *The tripartite synapse: roles for gliotransmission in health and disease. Trends Mol Med* 13:54-63; Nedergaard M, Ransom B, Goldman SA (2003) *New roles for astrocytes: redefining the functional architecture of the brain. Trends Neurosci* 26:523-530). Выброс таких глиомедиаторов происходит в ответ на изменения нейрональной синаптической активности, приводит к возбудимости астроцитов, что отражается увеличением

передачи сигналов по кальциевым каналам астроцитов, и может изменять возбудимость нейронов (Halassa MM, Fellin T, Haydon PG (2007), The tripartite synapse: roles for gliotransmission in health and disease. Trends Mol Med 13:54-63; Nedergaard M, Ransom B, Goldman SA (2003) New roles for astrocytes: redefining the functional architecture of the brain. Trends Neurosci 26:523-530). В дополнение к оказанию непосредственных эффектов на синаптическую активность через выброс глиомедиаторов, астроциты обладают способностью оказывать мощные и длительные влияния на синаптическую функцию через выброс факторов роста и родственных молекул (Barres BA (2008) The mystery and magic of glia: a perspective on their roles in health and disease. Neuron 60:430-440).

Астроциты и целостность ГЭБ. Астроциты играют существенную роль в формировании гематоэнцефалического барьера (ГЭБ) и в регулировании переноса через ГЭБ, гомеостатического процесса, важного для надлежащего функционирования нейронов. ГЭБ представляет собой очень сложную эндотелиальную структуру дифференцированной нейроваскулярной системы головного мозга, состоящую из перицитов, астроцитов и эндотелиальных клеток. Нарушение ГЭБ, как было установлено, вовлечено в ряд нейродегенеративных заболеваний, в том числе менингит, отек головного мозга, эпилепсию, болезнь Альцгеймера (AD), болезнь Паркинсона (PD), инсульт, боковой амиотрофический склероз (ALS) и множественный склероз (MS; обзор Zlokovic BV. Neurovascular pathways to neurodegeneration in Alzheimer's disease and other disorders. Nat Rev Neurosci. 2011; 12:723-738).

Астроциты являются «поляризованными» клетками в том плане, что они удлиняют специализированные мембранные отростки, состоящие из уникальных клеточных механизмов и мембранных компонентов, которые взаимодействуют со специфическими типами клеток. Например, отростки астроцитов со стороны церебральных микрососудов или мягкой мозговой оболочки характеризуются высокой плотностью «водного канала», аквапорина 4 (Aqp4) (Neely JD, Amiry-Moghaddam M, Ottersen OP, Froehner SC, Agre P, Adams ME (2001) Syntrophin-dependent expression and localization of

Aquaporin-4 water channel protein. Proc Natl Acad Sci U S A 98, 14108-14113; Amiry-Moghaddam M, Otsuka T, Hurn PD, Traystman RJ, Haug FM, Froehner SC, Adams ME, Neely JD, Agre P, Ottersen OP, Bhardwaj A (2003) An alpha-syntrophin-dependent pool of AQP4 in astroglial end-feet confers bidirectional water flow between blood and brain. Proc Natl Acad Sci U S A 100, 2106-2111). В противоположность этому, астроцитарные отростки напротив синаптических областей богаты переносчиками глутамата, в то время как плотность Aqp4 является сравнительно низкой (Nielsen S, Nagelhus EA, Amiry-Moghaddam M, Bourque C, Agre P, Ottersen OP (1997) Specialized membrane domains for water transport in glial cells: High-resolution immunogold cytochemistry of aquaporin-4 in rat brain. J Neurosci 17, 171-180; Chaudhry FA, Lehre KP, van Lookeren Campagne M, Ottersen OP, Danbolt NC, Storm-Mathisen J (1995) Glutamate transporters in glial plasma membranes: Highly differentiated localizations revealed by quantitative ultrastructural immunocytochemistry. Neuron 15, 711-720). Интересно, что поляризация астроцитов нарушается в головном мозге, подвергающемся нейродегенерации. Например, в условиях AD, интенсивности окрашивания Aqp4 значительно уменьшаются в зонах со значительной массой амилоидных бляшек. На самом деле, Yang и его коллеги продемонстрировали, что накопление амилоидной патологии у мышей с AD ArcSwe связано во временном и в пространственном отношении с утратой поляризации астроцитов (J Alzheimer's Dis. 2011;27(4):711-22. doi: 10.3233/JAD-2011-110725; Loss of astrocyte polarization in the tg-ArcSwe mouse model of Alzheimer's disease. Yang JL, Lunde LK, Nuntagij P, Oguchi T, Camassa LM, Nilsson LN, Lannfelt L, Xu Y, Amiry-Moghaddam M, Ottersen OP, Torp R.).

Роль передачи сигнала от SEMA4D в стимулировании активации астроцитов. Учитывая связь экспрессии рецепторов SEMA4D и маркера активации астроцитов GFAP, существует вероятность того, что передача сигнала от SEMA4D может усилить активацию астроцитов, тем самым обеспечивая «упреждающий» механизм во время болезненных состояний. Для изучения эффектов SEMA4D на

активацию астроцитов, первичные культуры астроцитов крыс были созданы и обработаны SEMA4D самим по себе или в комбинации с тиаоацетамидом (ТАА) (пример 6 и фиг. 18А ниже), хорошо известным гепатотоксичным и гепатокарциногенным агентом, который, как было установлено, индуцирует экспрессию плексина-B1 *in vivo* (Lim, J. S., Jeong, S. Y., Hwang, J. Y., Park, H. J., Cho, J. W., & Yoon, S. (2006), или простагландином D2 (пример 6 и фиг. 18В ниже), известным фактором активации, продуцируемым в ЦНС, Toxicogenomics Analysis on Thioacetamide-induced Hepatotoxicity in Mice. MOLECULAR & CELLULAR TOXICOLOGY, 2(2), 126-133).

V. Способы лечения с использованием терапевтических антител против SEMA4D

Способы настоящего изобретения направлены на применение анти-SEMA4D связывающих молекул, например, антител, в том числе их антигенсвязывающих фрагментов, вариантов и производных, для лечения субъекта, имеющего нейродегенеративное нарушение. В некоторых вариантах осуществления эндотелиальные клетки экспрессируют рецептор SEMA4D, в других нервные клетки экспрессируют рецептор SEMA4D, а в других как эндотелиальные, так и нервные клетки экспрессируют рецептор SEMA4D. В некоторых вариантах осуществления рецептором является плексин-B1. Хотя последующее обсуждение относится к введению антитела против SEMA4D, описанные здесь способы также применимы к антигенсвязывающим фрагментам, вариантам и производным этих антител против SEMA4D или других биопрепаратов или небольших молекул, у которых сохраняются желаемые свойства антител против SEMA4D настоящего изобретения, например, способным к специфическому связыванию SEMA4D, например, SEMA4D человека, мыши или как человека, так и мыши SEMA4D, обладающим SEMA4D-нейтрализующей активностью и/или блокирующим взаимодействие SEMA-4D с его рецептором, например, плексином-B1. В другом варианте осуществления способы относятся к введению антитела против SEMA4D, способы, описанные здесь, могут также относиться к введению анти-плексин-B1 или анти-плексин-B2 связывающих молекул, которые способны специфически связываться с плексином-

B1 и/или плексином-B2 и блокируют взаимодействие SEMA-4D с одним или обоими его рецепторами плексинами, например, плексином-B1 и/или плексином-B2.

В одном варианте осуществления лечение включает применение или введение анти-SEMA4D связывающей молекулы, например, антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, или других биопрепаратов, или небольших молекул, которые связывают и нейтрализуют SEMA4D, как описано здесь, пациенту, причем пациент имеет или подвержен риску развития нейродегенеративного нарушения. В другом варианте осуществления, как предполагается, лечение также включает применение или введения фармацевтической композиции, включающей анти-SEMA4D связывающую молекулу, например, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, пациенту, причем пациент имеет или подвержен риску развития нейродегенеративного нарушения.

Анти-SEMA4D связывающие молекулы, например, антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, описанные здесь, применимы для лечения различных нейродегенеративных нарушений. В некоторых вариантах осуществления лечение нейродегенеративного нарушения предназначено для вызова уменьшения интенсивности симптомов, сопровождающих нарушение. В других вариантах осуществления лечение нейродегенеративного нарушения предназначено для уменьшения, замедления или остановки увеличения проявлений симптомов. В других вариантах осуществления лечение нейродегенеративного нарушения предназначено для ингибирования, например, подавления, замедления, предотвращения, остановки или обращения вспять проявления симптомов. В других вариантах осуществления лечение нейродегенеративного нарушения предназначено для облегчения в некоторой степени одного или более симптомов, сопровождающих нарушение. В таких ситуациях симптомы могут быть психоневрологическими симптомами, когнитивными симптомами и/или моторной дисфункцией. В других вариантах осуществления лечение нейродегенеративного нарушения предназначено для снижения заболеваемости и смертности. В других вариантах осуществления лечение нейродегенеративного нарушения предназначено для улучшения качества жизни.

В одном варианте осуществления настоящее изобретение относится к применению анти-SEMA4D связывающих молекул, например, антител или их антигенсвязывающих фрагментов, вариантов или производных, в качестве лекарственного средства, в частности, для применения в лечении нейродегенеративных нарушений с целью уменьшения интенсивности симптомов, сопровождающих нарушение.

В соответствии со способами настоящего изобретения по крайней мере одну анти-SEMA4D связывающую молекулу, например, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, вариант или производное; или другой биопрепарат или небольшую молекулу, как определено здесь в другом месте, можно использовать для способствования положительному терапевтическому ответу по отношению к нейродегенеративному нарушению. «Положительный терапевтический ответ» по отношению к нейродегенеративному нарушению, как предполагается, включает уменьшение интенсивности симптомов, сопровождающих нарушение. Такие положительные терапевтические ответы не ограничиваются способом введения и могут включать введение донору донорской ткани (например, назначение перфузии органов), хозяину любой их комбинации и т.п. В частности, предусмотренные здесь способы направлены на ингибирование, предотвращение, уменьшение, облегчение или ослабление прогрессирования нейродегенеративного нарушения у пациента. Так, например, улучшение нарушения можно охарактеризовать как отсутствие клинически наблюдаемых симптомов, уменьшение частоты клинически наблюдаемых симптомов или изменение клинически наблюдаемых симптомов.

Меры, которые изменяют симптомы, сопровождающие нейродегенеративные нарушения, могут быть выявлены и определены с использованием *in vivo* моделей на мышах. В некоторых вариантах осуществления может использоваться модель на мыши CVN. Мышь CVN включает мутации белка-предшественника A β , характерные для наследственной болезни Альцгеймера (AD) в трех независимых линиях, вместе с мутацией, воспроизводящей некоторые из состояний воспаления головного мозга, связанного с

AD Colton *et al.*, *J Alzheimer's Dis.*15:571-587, 2008; Van Nostrand *et al.*, *Stroke* 41:S135-S138, 2010). Модель CVN демонстрирует некоторые из основных патологий, связанных с болезнью Альцгеймера: А β бляшки, гиперфосфорилированный тау-белок, приводящий к нейрофибриллярным клубкам и гибели клеток (потери нейронов), и стойкое ухудшение пространственной памяти и невровакулярные поражения. По сравнению с другими мутантными мышами, используемыми для моделирования болезни Альцгеймера, мыши CVN демонстрируют больше связанных с болезнью Альцгеймера патологий в более раннем возрасте. В других вариантах осуществления может использоваться модель на мыши YAC128 болезни Хантингтона (HD). Мыши YAC128 экспрессируют полноразмерный мутантный ген хантингтина человека (mHTT) и точно повторяют многие из признаков и симптомов HD. Следует понимать, что квалифицированным в данной области техники специалистам будет понятно, что другие модели были описаны и с успехом использовались для изучения механизмов заболевания и лечения симптомов нейродегенеративных нарушений в литературе, и что настоящее изобретение не должно ограничиваться какой-либо одной конкретной моделью.

Анти-SEMA4D связывающие молекулы, например, антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, варианты или производные, или другие биопрепараты, или небольшие молекулы, могут использоваться в комбинации с по крайней мере одним или более других видов лечений нейродегенеративных нарушений; причем дополнительную терапию назначают до, во время или после терапии с использованием анти-SEMA4D связывающей молекулы, например, антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, варианта или производного. Таким образом, когда комбинированные терапии включают введение анти-SEMA4D связывающей молекулы, например, антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, варианта или производного, в комбинации с введением другого терапевтического средства, способы настоящего изобретения охватывают совместное введение, используя отдельные препараты или один фармацевтический препарат с использованием одновременного или

последовательное введения в любом порядке.

Для применения способов и систем настоящего изобретения в некоторых вариантах осуществления, образцы или изображения от пациента могут быть получены до или после, или как до, так и после назначения терапии, включающей эффективное количество выделенной связывающей молекулой, которая специфически связывается с семафорин-4D (SEMA4D), субъекту, у которого установлено наличие нейродегенеративного нарушения, или субъекту, у которого подозревается наличие нейродегенеративного нарушения. В некоторых случаях последовательные образцы или изображения могут быть получены от пациента после начала терапии или после прекращения терапии, или как до, так и после терапии. Образцы или изображения могут, например, быть затребованы поставщиком медицинских услуг (например, врачом) или поставщиком медицинских льгот, получены и/или обработаны одним и тем же или другим поставщиком медицинских услуг (например, медсестрой, больницей) или клинической лабораторией, и после обработки результаты могут быть переданы еще одному поставщику медицинских услуг, поставщику медицинских льгот или пациенту. Так же, измерение/определение одного или более показателей, сравнения показателей, оценка показателей и решения в отношении лечения могут быть выполнены одним или более поставщиков медицинских услуг, поставщиков медицинских льгот и/или клинических лабораторий.

В некоторых аспектах любой из вышеупомянутых процедур нейродегенеративное нарушение выбирают из группы, состоящей из болезни Альцгеймера, болезни Паркинсона, болезни Хантингтона, синдрома Дауна, атаксии, бокового амиотрофического склероза (ALS), лобно-височной деменции (FTD), связанного с ВИЧ когнитивного нарушения, волчанки с поражением ЦНС, легкого когнитивного нарушения или их сочетания. В некоторых аспектах любой из вышеупомянутых процедур нейродегенеративное нарушение представляет собой болезнь Альцгеймера или болезнь Хантингтона.

В некоторых аспектах поставщик медицинских услуг может прописать или поручить другому поставщику медицинских услуг назначить терапию, включающую эффективное количество выделенной

связывающей молекулой, которая специфически связывается с семафорин-4D (SEMA4D), причем субъект имеет, у него установлено наличие, или у него подозревается наличие нейровоспалительного нарушения. Поставщик медицинских услуг может осуществить или поручить другому поставщику медицинских услуг или пациенту осуществить следующие действия: получить образец или изображение, обработать образец или изображение, представить образец или изображение, получить образец или изображение, передать образец или изображение, проанализировать или измерить образец или изображение, осуществить количественное определение образца или изображения, обеспечить результаты, полученные после анализа/измерения/количественной оценки образца или изображения, получить результаты, полученные после анализа/измерения/количественной оценки образца или изображения, сравнить/оценить результаты, полученные после анализа/измерения/количественной оценки одного или более образцов или изображений, обеспечить сравнение/оценку от одного или более образцов, добиться сравнения/оценки от одного или более образцов или изображений, назначить терапию, например, ввести эффективное количество выделенной связывающей молекулы, которая специфически связывается с семафорин-4D (SEMA4D), начать назначение терапии, прекратить назначение терапии, продолжить назначение терапии, временно прекратить назначение терапии, увеличить количество вводимого терапевтического средства, уменьшить количество вводимого терапевтического средства, продолжить введение количества терапевтического средства, увеличить частоту введения терапевтического средства, уменьшить частоту введения терапевтического средства, сохранить ту же частоту введения дозы терапевтического средства, заменить терапию или терапевтическое средство по крайней мере другой терапией или терапевтическим средством, объединить терапию или терапевтическое средство с по крайней мере другой терапией или дополнительным терапевтическим средством.

В некоторых аспектах поставщик медицинских льгот может разрешить или запретить, например, сбор образца, обработку образца, представление образца, получение образца, передачу

образца, анализ или измерение образца, количественную оценку образца, предоставление результатов, полученных после проведения анализа/измерения/количественной оценки образца, передачу результатов, полученных после проведения анализа/измерения/количественной оценки образца, сравнение/оценку результатов, полученных после проведения анализа/измерения/количественной оценки одного или более образцов, передачу сравнения/оценки от одного или более образцов, назначение терапии или терапевтического средства, начало назначения терапии или терапевтического средства, прекращение назначения терапии или терапевтического средства, продолжение назначения терапии или терапевтического средства, временное прекращение назначения терапии или терапевтического средства, увеличение количества вводимого терапевтического средства, уменьшение количества вводимого терапевтического средства, продолжение введения количества терапевтического агента, увеличение частоты введения терапевтического средства, уменьшение частоты введения терапевтического средства, сохранение той же частоты введения дозы терапевтического средства, замену терапии или терапевтического средства по крайней мере другой терапией или терапевтическим средством или объединение терапии или терапевтического средства по крайней мере другой терапией или дополнительным терапевтическим средством.

В некоторых аспектах любой из вышеупомянутых процедур нейродегенеративное нарушение выбирают из группы, состоящей из болезни Альцгеймера, болезни Паркинсона, болезни Хантингтона, синдрома Дауна, атаксии, бокового амиотрофического склероза (ALS), лобно-височной деменции (FTD), связанного с ВИЧ когнитивного нарушения, волчанки с поражением ЦНС, легкого когнитивного нарушения или их сочетания. В некоторых аспектах любой из вышеупомянутых процедур нейродегенеративное нарушение представляет собой болезнь Альцгеймера или болезнь Хантингтона.

Кроме того, поставщик медицинских льгот может, например, разрешать или запрещать назначение терапии, санкционировать страховую сумму для терапии или отказывать в ней, разрешать или

запрещать возмещение стоимости терапии, определять право или лишать права на получение терапии и т.д.

В некоторых аспектах клиническая лаборатория может, например, собирать или получать образец, обрабатывать образец, предоставлять образец, получать образец, передавать образец, анализировать или измерять образец, количественно оценивать образец, предоставлять результаты, полученные после анализа/измерения/количественной оценки образца, получать результаты, полученные после анализа/измерения/количественной оценки образца, сравнивать/оценивать результаты, полученные после анализа/измерения/количественной оценки одного или более образцов, обеспечивать сравнение/оценку от одного или более образцов, добиваться сравнения/оценки от одного или более образцов или осуществлять другие связанные с этим мероприятия.

В некоторых аспектах любой из вышеупомянутых процедур нейродегенеративное нарушение выбирают из группы, состоящей из болезни Альцгеймера, болезни Паркинсона, болезни Хантингтона, синдрома Дауна, атаксии, бокового амиотрофического склероза (ALS), лобно-височной деменции (FTD), связанного с ВИЧ когнитивного нарушения, волчанки с поражением ЦНС, легкого когнитивного нарушения или их сочетания. В некоторых аспектах любой из вышеупомянутых процедур нейродегенеративное нарушение представляет собой болезнь Альцгеймера или болезнь Хантингтона.

В некоторых аспектах любая из вышеупомянутых процедур может быть использована для определения, имеет ли субъект нейродегенеративное нарушение. В некоторых аспектах нейродегенеративное нарушение выбирают из группы, состоящей из болезни Альцгеймера, болезни Паркинсона, болезни Хантингтона, синдрома Дауна, атаксии, бокового амиотрофического склероза (ALS), лобно-височной деменции (FTD), связанного с ВИЧ когнитивного нарушения, волчанки с поражением ЦНС, легкого когнитивного нарушения или их сочетания. В некоторых аспектах любой из вышеупомянутых процедур нейродегенеративное нарушение представляет собой болезнь Альцгеймера или болезнь Хантингтона.

В некоторых аспектах поставщик медицинских услуг, клиническая лаборатория или другой объект может, например,

собирать или получать изображение, обрабатывать изображение, представлять изображение, получать изображение, передать изображение, анализировать или характеризовать изображение, количественно оценивать изображение, обеспечивать результаты, полученные после анализа/измерения/количественной оценки изображения, получать результаты, полученные после анализа/измерения/количественной оценки изображения, сравнивать/оценивать результаты, полученные после анализа/измерения/количественной оценки одного или более изображений, обеспечивать сравнение/оценку от одного или более изображений, добиваться сравнения/оценки от одного или более изображений или осуществлять другие связанные с этим мероприятия. Изображения, которые могут быть использованы в таких аспектах, включают, но без ограничения, изображения, полученные с помощью ангиографии, УЗИ, компьютерной томографии (КТ), магнитно-резонансной томографии (МРТ), позитронно-эмиссионной томографии (ПЭТ), оптической когерентной томографии (ОКТ), спектроскопии в ближней ИК области спектра (НИРС) и флуоресценции ближней ИК области спектра. В некоторых вариантах осуществления могут использоваться методы визуализации, которые были описаны в литературе (Tardif et al. *Circ Cardiovasc Imaging* 4:319-333 (2011)).

VI. Фармацевтические композиции и способы введения

Способы приготовления и введения анти-SEMA4D связывающих молекул, например, антител или их антигенсвязывающих фрагментов, вариантов или производных, субъекту, нуждающемуся в этом, хорошо известны или могут быть легко определены квалифицированными в данной области техники специалистами. Путь введения анти-SEMA4D связывающей молекулы, например, антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, варианта или производного, может быть, например, пероральным, парентеральным, путем ингаляции или местным. Термин «парентеральный», используемый здесь, включает, например, внутривенное, внутриартериальное, внутрибрюшинное, внутримышечное, подкожное, ректальное или вагинальное введение. В то время как все эти формы введения, несомненно,

рассматриваются как находящиеся в пределах объема настоящего изобретения, пример формы для введения будет представлять собой раствор для инъекции, в частности, для внутривенной или внутриартериальной инъекции или капельно. Подходящая фармацевтическая композиция для инъекции может включать буфер (например, ацетатный, фосфатный или цитратный буфер), поверхностно-активное вещество (например, полисорбат), необязательно стабилизатор (например, альбумин человека) и т.д. Однако в других способах, совместимых с представленным здесь учением, анти-SEMA4D связывающие молекулы, например, антитела, или их антигенсвязывающие фрагменты, варианты или производные, могут быть доставлены непосредственно в место неблагоприятной клеточной популяции, тем самым увеличивая подвержение нездоровой ткани воздействию терапевтического средства.

Как обсуждается здесь, анти-SEMA4D связывающие молекулы, например, антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, варианты или производные, могут быть введены в фармацевтически эффективном количестве для *in vivo* лечения нейродегенеративных нарушений. В связи с этим следует понимать, что описанные связывающие молекулы могут быть приготовлены таким образом, чтобы облегчить введение и способствовать стабильности активного агента. В некоторых вариантах осуществления фармацевтические композиции в соответствии с настоящим изобретением включают фармацевтически приемлемый, нетоксичный, стерильный носитель, такой как физиологический солевой раствор, нетоксичные буферы, консерванты и т.п. Для целей настоящей заявки фармацевтически эффективное количество анти-SEMA4D связывающей молекулы, например, антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, варианта или производного, будет означать количество, достаточное для достижения эффективного связывания с мишенью и для достижения преимуществ, например, уменьшения интенсивности симптомов, сопровождающих нейродегенеративное нарушение.

Фармацевтические композиции, используемые в этом изобретении, включают фармацевтически приемлемые носители, в том числе, например, иониты, окись алюминия, стеарат алюминия,

лецитин, сывороточные белки, такие как сывороточный альбумин человека, буферные вещества, такие как фосфаты, глицин, сорбиновую кислоту, сорбат калия, смеси неполных глицеридов насыщенных растительных жирных кислот, воду, соли или электролиты, такие как протамина сульфат, гидрофосфат динатрия, гидрофосфат калия, хлорид натрия, соли цинка, коллоидный диоксид кремния, трисиликат магния, поливинилпирролидон, вещества на основе целлюлозы, полиэтиленгликоль, карбоксиметилцеллюлозу натрия, полиакрилаты, воски, блок-сополимеры этилена и оксипропилена, полиэтиленгликоль и ланолин.

Препараты для парентерального введения включают стерильные водные или неводные растворы, суспензии и эмульсии. Примерами неводных растворителей являются пропиленгликоль, полиэтиленгликоль, растительные масла, такие как оливковое масло, и инъеклируемые органические сложные эфиры, такие как этилолеат. Водные носители включают, например, воду, спиртовые/водные растворы, эмульсии или суспензии, включая солевые и буферные среды. В заявленном изобретении фармацевтически приемлемые носители включают, но без ограничения, 0,01-0,1 М, например, приблизительно 0,05 М фосфатный буфер или 0,8% физиологический раствор. Другие распространенные носители для парентерального введения включают растворы фосфата натрия, декстрозу Рингера, декстрозу и хлорид натрия, раствор Рингера с лактатом или жирные масла. Носители для внутривенного введения включают наполнители жидкости и питательные наполнители, электролитные наполнители, такие как те, которые основаны на декстрозе Рингера, и т.п. Могут также присутствовать консерванты и другие добавки, такие как, например, противомикробные вещества, антиоксиданты, хелатные добавки и инертные газы и т.п.

Конкретнее, фармацевтические композиции, подходящие для применения в виде инъекций, включают стерильные водные растворы (если водорастворимые) или дисперсии и стерильные порошки для приготовления стерильных инъекционных растворов или дисперсий для немедленного приема. В таких случаях композиция должна быть

стерильной и должна быть жидкой до такой степени, что существует удобная возможность использовать шприц. Она должна быть стабильной в условиях производства и хранения и может быть защищена от загрязняющего действия микроорганизмов, таких как бактерии и грибы. Носитель может быть растворителем или дисперсионной средой, содержащей, например, воду, этанол, полиол (например, глицерин, пропиленгликоль и жидкий полиэтиленгликоль и т.п.) и их подходящие смеси. Надлежащую текучесть можно поддерживать, например, за счет использования покрытия, такого как лецитин, путем поддержания требуемого размера частиц в случае дисперсии и посредством использования поверхностно-активных веществ. Подходящие препараты для применения в терапевтических способах, раскрытых здесь, описаны в Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Publishing Co.) 16th ed. (1980).

Предотвращение действия микроорганизмов может быть достигнуто с помощью различных антибактериальных и противогрибковых агентов, например, парабенов, хлорбутанола, фенола, аскорбиновой кислоты, тимеросала и т.п. Во многих случаях могут быть включены изотонические агенты, например сахара, многоатомные спирты, такие как маннит, сорбит или хлорид натрия. Пролонгированное всасывание инъектируемых композиций может быть осуществлено путем включения в композицию агента, который задерживает всасывание, например, моностеарата алюминия и желатина.

В любом случае стерильные растворы для инъекций могут быть приготовлены путем включения активного соединения (например, антитела против SEMA4D или его антигенсвязывающего фрагмента, варианта или производного, самого по себе или в комбинации с другими активными агентами) в требуемом количестве в соответствующий растворитель с одним или комбинацией ингредиентов, перечисленных здесь, в случае необходимости, с последующей стерилизацией фильтрованием. Как правило, дисперсии получают путем введения активного соединения в стерильный носитель, который содержит основную дисперсионную среду и требуемые другие ингредиенты из тех, которые перечислены выше.

В случае стерильных порошков для приготовления стерильных инъекционных растворов способы приготовления включают вакуумную сушку и сушку сублимацией, которые дают порошок активного ингредиента плюс любой дополнительный желательный ингредиент из его предварительно стерильно отфильтрованного раствора. Препараты для инъекций обрабатываются, разливают в контейнеры, такие как ампулы, мешки, бутылки, шприцы или флаконы, и запаивают в асептических условиях в соответствии со способами, известными в данной области техники. Кроме того, препараты могут быть упакованы и проданы в форме набора. Такие промышленные изделия могут иметь этикетки или вкладыши в упаковку, на которых указывается, что соединенные с ними композиции применимы для лечения субъекта, страдающего заболеванием или нарушением или предрасположенного к нему.

Композиции для парентерального введения могут быть однократной болюсной дозой, инфузией или нагрузочной болюсной дозой с последующей поддерживающей дозой. Эти композиции могут вводиться с определенными фиксированными или переменными интервалами времени, например, один раз в день, или по принципу «по требованию».

Некоторые фармацевтические композиции, используемые в этом описании, могут быть введены перорально в приемлемой лекарственной форме, включая, например, капсулы, таблетки, водные суспензии или растворы. Некоторые фармацевтические композиции могут быть также введены с помощью назального аэрозоля или ингаляции. Такие композиции могут быть приготовлены в виде растворов в физиологическом растворе с использованием бензилового спирта или других подходящих консервантов, активаторов абсорбции для повышения биодоступности, и/или других обычных солюбилизаторов или диспергаторов.

Количество анти-SEMA4D связывающей молекулы, например, антитела или его фрагмента, варианта или производного, для объединения с материалами-носителями для получения однократной лекарственной формы будет изменяться в зависимости от подвергаемого лечению хозяина и конкретного способа введения.

Композицию можно вводить в виде однократной дозы, многократных доз или в течение установленного периода времени как часть инфузии. Схемы введения доз также можно регулировать для обеспечения оптимального желаемого ответа (например, терапевтического или профилактического ответа).

В соответствии с объемом настоящего изобретения, антитела против SEMA4D или их антигенсвязывающие фрагменты, варианты или производные могут быть введены человеку или другому животному в соответствии с вышеупомянутыми способами лечения в количестве, достаточном для получения терапевтического эффекта. Антитела против SEMA4D или их антигенсвязывающие фрагменты, варианты или производные могут быть введены такому человеку или другому животному в обычной лекарственной форме, приготовленной путем объединения антитела настоящего изобретения с обычным фармацевтически приемлемым носителем или разбавителем в соответствии с известными методами. Квалифицированному в данной области техники специалисту будет понятно, что форма и характер фармацевтически приемлемого носителя или разбавителя диктуется количеством активного ингредиента, с которым он должен быть объединен, путем введения и другими хорошо известными переменными. Квалифицированным в данной области техники специалистам будет также понятно, что может использоваться смесь, включающая один или более видов анти-SEMA4D связывающих молекул, например, антител или их антигенсвязывающих фрагментов, варианты или производных настоящего изобретения.

Под термином «терапевтически эффективная доза или количество» или «эффективное количество» подразумевается количество анти-SEMA4D связывающей молекулы, например, антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, варианта или производного, которое при введении приводит к положительному терапевтическому ответу в отношении лечения пациента с заболеванием, подвергаемым лечению. В случае нейродегенеративного нарушения, положительный терапевтический ответ может облегчить симптомы нарушения; снизить, уменьшить, замедлить или прекратить частоту симптомов; снизить, уменьшить, отсрочить тяжесть симптомов; ингибировать, например, подавить,

отсрочить, предотвратить, остановить или обратить вспять проявление симптомов; облегчить в некоторой степени один или более симптомов, сопровождающих нарушение; снизить заболеваемость и смертность; улучшить качество жизни или вызвать комбинацию таких эффектов.

Терапевтически эффективные дозы композиций настоящего изобретения для снижения частоты возникновения симптомов варьируются в зависимости от многих различных факторов, включая способы введения, сайт-мишень, физиологическое состояние пациента, то, является ли пациент человеком или животным, другие вводимые лекарственные препараты, и то, является ли лечение профилактическим или терапевтическим. В некоторых вариантах осуществления пациент является человеком, но также могут подвергаться лечению не относящиеся к человеку млекопитающие, в том числе трансгенные млекопитающие. Дозировки лечения можно подвергнуть титрованию, используя обычные методы, известные квалифицированным в данной области техники специалистам, с целью оптимизации безопасности и эффективности.

Количество по крайней мере одной анти-SEMA4D связывающей молекулы, например, антитела или его связывающего фрагмента, варианта или производного, которое будет вводиться, легко определяется специалистом со средним уровнем компетентности в данной области техники без излишнего экспериментирования с учетом настоящего описания. Факторы, влияющие на способ введения и соответствующее количество по крайней мере одной анти-SEMA4D связывающей молекулы, например, антитела, антигенсвязывающего фрагмента, варианта или производного, включают, но без ограничения, тяжесть заболевания, историю болезнь, и возраст, рост, вес, состояние здоровья и физическое состояние индивидуума, подвергаемого лечению. Точно так же, количество анти-SEMA4D связывающей молекулы, например, антитела или его фрагмента, варианта или производного, для введения будет зависеть от способа введения и того, будет ли субъект подвергаться однократной дозе или множеству доз этого агента.

Настоящим изобретением также предусматривается применение анти-SEMA4D связывающей молекулы, например, антитела настоящего

изобретения, или его антигенсвязывающего фрагмента, варианта или производного, в производстве лекарственного средства для лечения субъекта с целью лечения нейродегенеративного нарушения, причем лекарственное средство используется для субъекта, который был подвергнут предварительному лечению с использованием по крайней мере одной другой терапии. Под «подвергнутым предварительному лечению» или «предварительным лечением» подразумевается, что субъект получил одну или более других терапий (например, был подвергнут лечению с использованием по крайней мере одной другой антинейродегенеративной терапии) до получения лекарственного средства, включающего анти-SEMA4D связывающую молекулу, например, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, вариант или производное. «Подвергнутый предварительному лечению» или «предварительное лечение» включает субъектов, которые были подвергнуты лечению с использованием по крайней мере одной другой терапии в пределах 2-х лет, в пределах 18 месяцев, в пределах 1 года, в пределах 6 месяцев, в пределах 2-х месяцев, в пределах 6 недель, в пределах 1 месяца, в пределах 4-х недель, в пределах 3-х недель, в пределах 2-х недель, в пределах 1 недели, в пределах 6 дней, в пределах 5 дней, в пределах 4-х дней, в пределах 3-х дней, в пределах 2-х дней или даже в пределах 1 дня до начала лечения лекарственным средством, включающим анти-SEMA4D связывающую молекулу, например, моноклональные антитела VX15/2503, 67 или 76, описанные здесь, или ее антигенсвязывающий фрагмент, вариант или производное. Необязательно, чтобы субъект был пациентом с терапевтическим эффектом на предварительное лечение с использованием предварительной терапии или терапий. Таким образом, субъект, который получает лекарственное средство, включающее анти-SEMA4D связывающую молекулу, например, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, вариант или производное, мог бы ответить, или мог бы не ответить, на предварительное лечение с использованием предварительной терапии, или на одну или более предварительных терапий, если предварительное лечение включало множество терапий.

Для осуществления на практике настоящего изобретения будут использоваться, если не указано иное, обычные методы клеточной биологии, культуры клеток, молекулярной биологии, трансгенной биологии, микробиологии, рекомбинантной ДНК и иммунологии, которые находятся в компетенции специалистов в данной области техники. Такие методы подробно описаны в литературе. Смотрите, например, Sambrook *et al.*, ed. (1989) *Molecular Cloning A Laboratory Manual* (2nd ed.; Cold Spring Harbor Laboratory Press); Sambrook *et al.*, ed. (1992) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, (Cold Springs Harbor Laboratory, NY); D. N. Glover ed., (1985) *DNA Cloning*, Volumes I and II; Gait, ed. (1984) *Oligonucleotide Synthesis*; Mullis *et al.* Патент США с № 4683195; Hames and Higgins, eds. (1984) *Nucleic Acid Hybridization*; Hames and Higgins, eds. (1984) *Transcription And Translation*; Freshney (1987) *Culture Of Animal Cells* (Alan R. Liss, Inc.); *Immobilized Cells And Enzymes* (IRL Press) (1986); Perbal (1984) *A Practical Guide To Molecular Cloning; the treatise, Methods In Enzymology* (Academic Press, Inc., N.Y.); Miller and Calos eds. (1987) *Gene Transfer Vectors For Mammalian Cells*, (Cold Spring Harbor Laboratory); Wu *et al.*, eds., *Methods In Enzymology*, Vols. 154 and 155; Mayer and Walker, eds. (1987) *Immunochemical Methods In Cell And Molecular Biology* (Academic Press, London); Weir and Blackwell, eds., (1986) *Handbook Of Experimental Immunology*, Volumes I-IV; *Manipulating the Mouse Embryo*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., (1986); и Ausubel *et al.* (1989) *Current Protocols in Molecular Biology* (John Wiley and Sons, Baltimore, Md.).

Общие принципы инженерии антител изложены в Borrebaeck, ed. (1995) *Antibody Engineering* (2nd ed.; Oxford Univ. Press). Общие принципы белковой инженерии изложены в Rickwood *et al.*, eds. (1995) *Protein Engineering, A Practical Approach* (IRL Press at Oxford Univ. Press, Oxford, Eng.). Общие принципы антител и связывания антитело-гаптен изложены в: Nisonoff (1984) *Molecular Immunology* (2nd ed.; Sinauer Associates, Sunderland, Mass.); и Steward (1984) *Antibodies, Their*

Structure and Function (Chapman and Hall, New York, N.Y.). Кроме того, обычно следуют стандартным методам в области иммунологии, известным в данной области техники и не описанным конкретно, как в Current Protocols in Immunology, John Wiley & Sons, New York; Stites et al., eds. (1994) Basic and Clinical Immunology (8th ed; Appleton & Lange, Norwalk, Conn.) и Mishell and Shiigi (eds) (1980) Selected Methods in Cellular Immunology (W.H. Freeman and Co., NY).

Стандартные ссылочные работы, в которых излагаются общие принципы иммунологии, включают Current Protocols in Immunology, John Wiley & Sons, New York; Klein (1982) J., Immunology: The Science of Self-Nonself Discrimination (John Wiley & Sons, NY); Kennett et al., eds. (1980) Monoclonal Antibodies, Hybridoma: A New Dimension in Biological Analyses (Plenum Press, NY); Campbell (1984) "Monoclonal Antibody Technology" in Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, ed. Burden et al., (Elsevier, Amsterdam); Goldsby et al., eds. (2000) Kuby Immunology (4th ed.; H. Freeman & Co.); Roitt et al. (2001) Immunology (6th ed.; London: Mosby); Abbas et al. (2005) Cellular and Molecular Immunology (5th ed.; Elsevier Health Sciences Division); Kontermann and Dubel (2001) Antibody Engineering (Springer Verlag); Sambrook and Russell (2001) Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Press); Lewin (2003) Genes VIII (Prentice Hall 2003); Harlow and Lane (1988) Antibodies: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Press); Dieffenbach and Dveksler (2003) PCR Primer (Cold Spring Harbor Press).

Все ссылки, приведенные выше, а также все ссылки, приведенные здесь, включены сюда посредством ссылки во всей их полноте.

Следующие примеры предлагаются в качестве иллюстрации, а не в качестве ограничения.

ПРИМЕРЫ

Пример 1. Проверка эффекта анти-SEMA4D связывающей молекулы, например, антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, варианта или производного, например, VX15/2503, 67

или 76, на болезнь Альцгеймера (AD) в модели на мыши CVN.

План исследования. Модель CVN была использована для исследования эффекта антитела против SEMA4D (например, мАт 67) на патологии и симптомы, связанные с болезнью Альцгеймера. Мышь CVN содержит в себе мутации белка-предшественника A β человека, характерные для наследственной болезни Альцгеймера (AD) в трех независимых линиях, вместе с делецией гена (синтазы-2 оксида азота-2) для активации нейровоспалительных механизмов, связанных с AD (Colton *et al.*, *J Alzheimers Dis.*15:571-587, 2008; Van Nostrand *et al.*, *Stroke* 41:S135-S138, 2010).

План основного исследования представлен на фиг. 1. Подверженные болезни Альцгеймера мыши CVN (полученные от Charles River) были использованы для проверки эффекта анти-SEMA4D связывающей молекулы на AD. В возрасте 10 недель у мышей отбирали кровь для получения исходных серологических уровней. В возрасте 10-12 недель мыши подвергались поведенческому предварительному тестированию, чтобы убедиться, что они были способны участвовать в исследовании. После рандомизации мышей CVN подвергали еженедельно лечению антителом против SEMA4D (мАт-67) или контрольным подобранным по изотипу антителом (мАТ 2В8) (30 мг/кг, внутривенно) с 26 недели по 38, и в это время к ним применяли несколько поведенческих тестов. Поведенческими тестами были тест «открытое поле» и радиальный восьмирукавный водный лабиринт.

Тест «открытое поле» - Исследовательская активность животного изучается в тесте «открытое поле» на возрасте 10 и 38 недель возраста ради возможной вызванной лечением гипо- или гиперактивности (контрольный тест) или другого эффекта. Мышей доставляют в экспериментальную комнату для акклиматизации в течение по крайней мере 30 мин к экспериментальным комнатным условиям перед тестированием. Камеры для проверки активности (Med Associates Inc, St Albans, VT; 27×27×20,3 см) оснащены ИК лучами. Мышей помещают в центр камеры, и их поведение регистрируется в течение 30 мин с 5-минутными интервалами. Проводится количественный анализ следующих пяти зависимых

показателей: общей локомоции, локомоции в центре открытого поля, скорости подъема на задние лапки в центре, общей частоты подъема на задние лапки и его скорости. Животных испытывают в ненапряженных условиях, когда свет уменьшают до приблизительно 10-30 люкс красного света.

Радиальный шестирукавный водный лабиринт – В возрасте 11 и 39 недель мышей доставляют в экспериментальную комнату для акклиматизации в течение по крайней мере 30 мин к экспериментальным комнатным условиям перед тестированием. Двухдневный радиальный шестирукавный водный лабиринт был подробно описан ранее (Alamed et al. 2006). Вкратце, шестирукавный лабиринт погружают в бассейн с водой, и платформу размещают в конце одного рукава. Мышь подвергают 15 испытаниям в день в течение 2 дней, и каждое испытание запускается в отличном рукаве, в то время как рукав, содержащий платформу, остается тем же самым для каждой мыши. Местоположение платформы остается неизменным в течение 2 дней для каждой мыши в конкретном возрасте, но это местоположение изменяется для каждой мыши в момент тестирования в возрасте между 11 и 40 неделями. Используя визуальные подсказки вокруг комнаты, мышь узнает местоположение платформы для спасения. Первые 10 испытаний считаются обучением и чередуются между видимой платформой и скрытой платформе. В завершающих испытаниях в день 1 и во всех испытаниях в день 2 используется скрытая платформа. Количество ошибок (неправильных вхождений в рукав) подсчитывали в течение 1-минутного периода. Ошибки являются усредненными на протяжении трех испытаний, что приводит к 10 блокам за 2-дневный период.

После завершения поведенческих тестов мышей умерщвляли, и ткани головного мозга обрабатывали для иммуногистохимии с использованием фиксированных формалином, залитых парафином (FFPE) препаратов. В связи с сообщениями о роли SEMA4D в индукции тормозных ГАМКергических синапсов (Kuzirian et al., *J Neuroscience*, 33:8961-8973-8961, 2013) определяли плотность везикул и интенсивность экспрессии везикулярного транспортера ГАМК (VGAT) в зубчатой извилине подвергнутых лечению мышей CVN.

Зубчатая извилина является одним из немногих крупных центров непрерывного нейрогенеза в ЦНС взрослого субъекта и, как полагают, играет определенную роль в формировании памяти и сохранении в памяти. В случае всех тестов проводили статистический анализ, используя 2-факторный дисперсионный анализ (ANOVA).

Антитело против SEMA4D уменьшает подобное страху поведение. Исследовательскую активность изучали в группах из 12 подверженных AD мышей CVN, подвергнутых лечению антителом против SEMA4D или подобранным по изотипу антителом в качестве контроля. Тест «открытое поле» назначали в 38-недельном возрасте ради возможных индуцированных лечением эффектов на двигательную активность и подобное страху поведение. Мышей помещали в центр освещенной камеры, и их поведение регистрировали в течение 30 мин с шестью 5-минутными интервалами. Проводили количественный анализ общей локомоции (фиг. 2A) и локомоции в центре открытого поля (фиг. 2B), что, как известно в данной области техники, является показателем подобного страху поведения.

Результаты показали, что подверженные AD мыши CVN, подвергнутые еженедельно лечению антителом против SEMA4D, проявляют исследование в «открытом поле» в большей степени, а подобное страху поведение в меньшей степени (вторжений в центр поля), чем мыши, подвергнутые лечению контрольным мАт 2B8. Эти результаты показаны на фиг. 2.

Антитело против SEMA4D улучшает пространственную память. В 39-недельном возрасте мышей CVN, подвергнутых лечению антителом против SEMA4D или контрольным подобранным по изотипу антителом 2B8 (n=9-13/группу), проверяли на протяжении 2-х дней в радиальном шестирукавном водном лабиринте (Alamed et al. 2006, как показано на фиг. 3A). Вкратце, каждая мышь подвергалась 15 испытаниям в день (3 испытания на блок) в каждый из следующих друг за другом дней. Каждое испытание начинали с отличного рукава, в то время как рукав, содержащий платформу, оставался тем же для каждого испытания. Блоки испытаний в день 1 чередовались между видимой платформой и скрытой платформой с

целью обучения. Все испытания в день 2 были выполнены с использованием скрытой платформы для оценки пространственной памяти. День 1 был периодом обучения/освоения, а в день 2 регистрировали латентность до нахождения платформы.

Результаты показали, что введение антитела против SEMA4D (мАт 67) приводит к ощутимому снижению латентности, что говорит об улучшении пространственной памяти по сравнению с контрольной (подвергнутой лечению мАт 2B8) группой. Результаты показаны на фиг. 3B.

Антитело против SEMA4D уменьшает ГАМКергические синапсы.

Срезы ткани головного мозга FFPE от подвергнутых лечению мАт-67 или мАт-2B8 мышей CVN и WT (n=9-13/группу) окрашивали антителом против VGAT для выявления ГАМКергических синаптических везикул. Проценты VGAT-позитивных везикулярных сигналов и интенсивности VGAT-сигналов на везикулу количественно оценивали в зубчатой извилине всех животных и нормализовали к отсканированной общей площади зубчатой извилины.

Результаты показали, что лечение антителом против SEMA4D мышей CVN с AD приводит к тенденции снижения плотности VGAT-позитивных везикул (фиг. 4A) и статистически значимому снижению уровня интенсивности VGAT-окрашивания на везикулу (фиг. 4B), обнаружение, которое предполагает роль SEMA4D в модуляции ГАМКергической передачи сигналов *in vivo* и может обеспечить механистическое представление о поведенческих эффектах, наблюдаемых у подвергнутых лечению мАт 67 мышей CVN. ГАМКергическая передача сигналов связана с гетерогенным классом тормозных нейронов. Как показано на фиг. 15 примера 6 ниже, более значимые эффекты лечения с использованием антитела против SEMA4D на плотность тормозных нейронов наблюдаются, когда анализ сфокусирован на подмножестве соматостатин-, NPY- или NPY2R-позитивных нейронов.

Пример 2. Проверка эффекта анти-SEMA4D связывающей молекулы, например, антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, варианта или производного, например, VX15/2503, 67 или 76, на болезнь Хантингтона (HD) в модели на мыши YAC128.

План эксперимента. Второй эксперимент с использованием *in*

vivo модели YAC128 был выполнен с целью изучения эффекта антитела против SEMA4D на патологии и симптомы, связанные с HD. План основного эксперимента был аналогичен тому, который продемонстрирован в примере 1 и на фиг. 1 выше, но введение дозы мАт (антитела) в этом случае проводили еженедельно с недели 6 по неделю 47 с использованием между 13 и 22 мышей YAC128 или WT в каждой группе. Мышей YAC128 разводили и поддерживали в University of British Columbia, Centre for Molecular Medicine and Therapeutics.

Антитело против SEMA4D уменьшает подобное страху поведение в модели на мышши YAC128. Для оценки страха во время исследования в «открытом поле», подвергнутых лечению мАт мышей помещали в нижний левый угол 50x50 см открытой серой акриловой коробки со стенками высокой 20 см в комнате, ярко освещенной флуоресцентными потолочными светильниками. Активность в «открытом поле» регистрировали в течение 10 мин с помощью установленной на потолке видеокамеры. Вторжения в центр поля (фиг. 5А) и время, проведенное в центре поля, (фиг. 5В) оценивали в качестве показателя подобного страху поведения.

В отличие от подвергнутых лечению контрольным Ат животных, в случае которых мышши YAC128 проявляют большую степень подобного страху поведения при исследовании в «открытом поле», чем мышши дикого типа (WT), нет никакой разницы между мышами WT и YAC128, подвергнутыми лечению антителом против SEMA4D (мАт 67), что указывает на то, что мАт-67 уменьшает подобное страху поведение у мышшей YAC128. Эти результаты представлены на фиг. 5.

Антитело против SEMA4D улучшает пространственную память в модели на мышши YAC128. Для оценки предпочтения в отношении известного объекта в новом месте, два различных новых объекта помещали в верхние левый и правый углы коробки «открытое поле». Подвергнутых лечению антителом против SEMA4D мышшей помещали в коробку в нижний левый угол и регистрировали с помощью установленной на потолке видеокамеры в течение 5 минут (мин), во время которого оценивали количество исследований двух новых объектов (испытание 1, фиг. 6А). Затем мышшей удаляли из коробки

на 5 мин, и объект в правом верхнем углу коробки перемещали в правый нижний угол коробки. Мышей вновь помещали в коробку и регистрировали в течение еще 5 мин (испытание 2, фиг. 6B). Вычисляли процент исследований, или тыканий носом, в отношении целевого объекта (один в новом месте) по отношению ко всем тыканьям носом.

В отличие от животных дикого типа (WT), подвергнутых лечению контрольным Ат или мАт 67, которые преимущественно исследуют объект в новом месте в испытании 2, подвергнутые лечению контрольным Ат мыши YAC128 не распознают или не демонстрируют предпочтение в отношении объекта в новом месте. Лечение антителом против SEMA4D восстанавливает нормальное предпочтение объекта в новом месте у мышей YAC128 ($p < 0,01$). Это говорит о том, что пространственная память у мышей YAC128 улучшалась в результате лечения мАт-67, так что они осознавали, что объект находится в новом месте. Результаты представлены на фиг. 6.

Антитело против SEMA4D предотвращает дегенерацию коры головного мозга и мозолистого тела у мышей YAC128. Свободноплавающие срезы ткани головного мозга от 12-месячных мышей YAC128 и WT, подвергнутых лечению мАт ($n=13-21$ /группу), окрашивали антителом против NeuN. Объемы коры головного мозга (фиг. 7A) и мозолистого тела (фиг. 7B) определяли путем прослеживания по периметру определенной структуры в серийных срезах с использованием программного обеспечения Stereoinvestigator (Microbrightfield), и объемы определили, используя принцип Кавальери.

Результаты показывают, что лечение антителом против SEMA4D подавляет обычное, связанное с заболеванием уменьшение объема коры головного мозга и мозолистого тела у мышей YAC128 в возрасте 12 месяцев. Результаты представлены на фиг. 7.

мАт 67 предотвращает дегенерацию яичек у мышей YAC128. Дегенерация яичек наблюдается у пациентов мужского пола с HD и повторяется у самцов мышей YAC128. Как показано на фиг. 8, лечение антителом против SEMA4D предотвращает дегенерацию яичек у мышей YAC128 возрастом 12 месяцев. Вполне возможно, что

эффекты заболевания и антитела против SEMA4D и на головной мозг, и на семенники отражают общую зависимость от внутриклеточных актин-зависимых транспортных механизмов в нормальном функционировании этих тканей.

Пример 3: Исследование профилей экспрессии SEMA4D, плексина-В1, плексина-В2 и CD72 в ЦНС крысы

Для обнаружения типов клеток в ЦНС, которые экспрессируют SEMA4D и его рецепторы плексин-В1, В2-плексин и CD72, совместный иммуногистохимический анализ был выполнен на коронарных срезах спинного мозга от неиспользовавшихся ранее в опытах крыс (фиг. 9А-Р). Соокрашивание на маркер клеток-предшественников олигодендроцитов, Nkx2.2, и SEMA4D (фиг. 9А-С), плексин-В1 и маркер астроцитов, GFAP (фиг. 9Е-Г), плексин-В1 и CD72 (фиг. 9I -К), и плексин-В1 и маркер микроглии, Iba1 (фиг. 9М-О), был выполнен на срезах спинного мозга от неиспользовавшихся ранее в опытах крыс. Кроме того, все срезы окрашивали DAPI для визуализации клеточных ядер (фиг. 9D, H, L, и P). Слайды были обследованы с 60х увеличением с помощью битовой камеры EXi-Aqua-14, соединенной с микроскопом Olympus Ix50.

Результаты, представленные на фиг. 9, показывают, что нормальной ЦНС SEMA4D является сильно экспрессируемым в Nkx2.2-положительных клетках-предшественниках олигодендроцитов, в то время как его рецепторы, плексин-В1, плексин-В2 (не представленные данные), и CD72 экспрессируются во множестве типов и особенно заметны в положительных по глиальному фибриллярному кислому белку (GFAP) астроцитах.

Пример 4. Определение характеристик профилей экспрессии рецепторов плексина-В1 и плексина-В2 в модели болезни Альцгеймера на мыши CVN

Гомозиготные бигенные мыши CVN с AD демонстрируют классическую амилоидную патологию и активацию глиальных клеток в подлежащей ткани по сравнению с подобранными по возрасту мышами дикого типа. Профили экспрессии плексина-В1 исследовали в модели болезни Альцгеймера на мыши CVN. Бигенные мыши CVN (также известные как APPSwDI/NOS2-/-) несут Swedish-Dutch-Iowa

мутантный трансген белка-предшественника амилоида (APPswDI) и целевую «нулевую» мутацию в локусе синтазы 2 окиси азота (Nos2 или индуцируемой NOS, iNOS). В 41-недельном возрасте мышей CVN и контрольных мышей дикого типа умерщвляли и обрабатывали ради иммуногистохимического анализа с DAB-окрашиванием. Результаты представлены на фиг. 10, при этом срезы от мышей дикого типа представлены в верхних панелях, а срезы от мышей CVN в нижних панелях). Срезы окрашивали отдельно на бета-амилоидный пептид 1-42 (верхняя и нижняя панели слева), маркер микроглии Iba1 (верхняя и нижняя центральные панели) или маркер астроцитов GFAP (верхняя и нижняя панели справа). Слайды были обследованы с 20x увеличением, используя битовую камеру QICAM-12, соединенную с микроскопом Olympus Ix50.

Результаты, представленные на фиг. 10, показывают, что у гомозиготных бигенных мышей CVN (APPswDI/NOS2-/-) развивается классическая амилоидная патология, активация микроглии и астроглиоз (нижние панели).

Активированные астроциты у мышей CVN с AD демонстрируют увеличенную экспрессию плексина-B1 по сравнению с подобранными по возрасту мышами дикого типа. В 41-недельном возрасте мышей CVN и контрольных мышей дикого типа умерщвляли и обрабатывали ради флуоресцентного совместного иммуногистохимического анализа (фиг. 11A). Срезы окрашивали отдельно на рецептор для SEMA4D плексин-B1 и маркер астроцитов GFAP, и DAPI для визуализации клеточных ядер. Составные изображения представлены в самых левых панелях. Слайды были обследованы с 60x увеличением с помощью битовой камеры EXi-Aqua-14, соединенной с микроскопом Olympus Ix50.

Как показано на фиг. 11A, совместный иммуногистохимический анализ плексин-B1- (вторые панели слева) и GFAP-позитивных астроцитов (третьи панели слева) в пределах головного мозга мышей CVN и подобранных по возрасту мышей дикого типа показывает, что активация астроцитов, о чем свидетельствует увеличение окрашивания на маркер GFAP, положительно коррелирует с увеличенной совместно регистрируемой экспрессией плексина-B1, предлагая, что передача сигнала от SEMA4D/плексина участвует в

процессе активации астроцитов.

Ингибирование передачи сигнала от SEMA4D у мышей CVN с AD восстанавливает экспрессию плексина-B2 по сравнению с подобранными по возрасту мышами дикого типа. Чтобы определить, будет ли блокирование передачи сигналов от SEMA4D у мышей CVN с AD оказывать влияние на экспрессию плексина-B1 и/или альтернативного ему родственного рецептора, плексина-B2, в областях головного мозга, затронутых рано патогенезом AD, 26-недельным мышам CVN и контрольным мышам дикого типа вводили еженедельно 30 мг/кг моноклонального антитела против SEMA4D (67-2) или контрольного IgG (2B8) внутривенно в течение 13 недель. В 41-недельном возрасте мышей умерщвляли, и срезы ткани головного мозга от подвергнутых лечению мАт мышей окрашивали антителом против плексина-B1 или антителом против плексина-B2 для обнаружения, изменяло ли лечение антителом против SEMA4D экспрессию соответствующего ему рецептора в условиях продолжающегося связанного с AD патогенеза. Процент плексин-B1- и B2-лексин-позитивных сигналов определяли количественно в подлежащей ткани всех животных и нормализовали к общей отсканированной площади подлежащей ткани.

Как показано на фиг. 11B, лечение антителом против SEMA4D мышей CVN с AD приводит к восстановлению уровней интенсивности окрашивания плексина-B2 (правый график) относительно тех, которые были количественно определены у контрольных мышей WT, но к никакому существенному изменению уровней плексина-B1 (левый график) относительно подобранных по возрасту контрольных мышей CVN с AD. Эти результаты свидетельствуют о том, что антителоопосредуемое ингибирование SEMA4D избирательно приводит к дестабилизации плексина-B2 и/или препятствует SEMA4D-управляемому «упреждающему» механизму, который избирательно стимулирует экспрессию плексина-B2.

Пример 5. Характеристика профилей экспрессии рецептора плексиан-B2 в модели болезни Хантингтона на мышши YAC128

Мыши YAC128 экспрессируют полноразмерный мутантный ген хантингтина человека (mHTT) и точно повторяют многие из признаков и симптомов HD (смотри также пример 2).

Активированные астроциты у мышей с болезнью Хантингтона YAC128 демонстрируют увеличенную экспрессию плексина-B2 по сравнению с подобранными по возрасту мышами дикого типа. В возрасте 12 месяцев, мышей YAC128 и контрольных мышей дикого типа умерщвляли и обрабатывали ради флуоресцентного совместного иммуногистохимического анализа (фиг. 12). Срезы окрашивали на плексин-B1 (плексин-B2, третьи панели слева), маркер астроцитов GFAP (вторые панели слева) и DAPI для визуализации клеточных ядер. Составные изображения представлены в самых левых панелях. Слайды были обследованы с 60x увеличением с помощью битовой камеры EXi-Aqua-14, соединенной с микроскопом Olympus Ix50.

Как показано на фиг. 12, совместный иммуногистохимический анализ плексин-B2- и GFAP-позитивных астроцитов в пределах головного мозга мышей YAC128 и мышей дикого типа показывает, что активация астроцитов, о чем свидетельствует увеличение окрашивания на маркер GFAP, положительно коррелирует с совместно регистрируемой экспрессией рецептора SEMA4D. Плексин-B2, лучше всего охарактеризованным лигандом которого является SEMA4C, также имеет промежуточное сродство к SEMA4D (Azzarelli R, et al. An antagonistic interaction between PlexinB2 and Rnd3 controls RhoA activity and cortical neuron migration. *Nature Commun.* 2014; DOI:10.1038/ncomms4405).

Пример 6. Изучение механизмов, с помощью которых передача сигналов от SEMA4D может модулировать функционирование астроцитов.

Корреляция между увеличенной экспрессией рецептора SEMA4D и активацией астроцитов в случае нейродегенеративных заболеваний и AD, и HD предполагает, что передача сигнала от SEMA4D играет определенную роль в функционировании астроцитов и/или их дисфункционировании. Не желая быть ограниченными какой-либо теорией, этот пример свидетельствует о том, что передача сигнала от SEMA4D может участвовать в регуляции функционирования астроцитов во время реакций на повреждения ЦНС, как от острых, так и от хронических стимулов. Схематическая модель, которую поддерживают данные, изображена на фиг. 13, на которой представлены три механизма, с помощью

которых передача сигналов от SEMA4D может потенциально модулировать функционирование астроцитов. Эти три механизма обсуждаются ниже.

Роль астроцитов в поддержании OPC. Плексин+ астроцитарные отростки переплетаются между SEMA4D+ Nkx2.2+ клетками-предшественниками олигодендроцитов (OPC) и обеспечивают трофическую поддержку. В случае заболевания ЦНС, активированные астроциты увеличивают экспрессию плексина и ретрактируют отростки через передачу сигналов от SEMA4D. Локально, эта утрата соседства астроцитов:OPC может привести к уменьшению трофической поддержки и увеличению инициируемого хемотаксисом перемещения OPC в сторону зон повреждения, в то время как отсутствие астроцитарной поддержки в участке повреждения может препятствовать дифференциации OPC и ремиелинизации.

Для проверки этой гипотезы контрольных крыс дикого типа умерщвляли, и спинной мозг обрабатывали для флуоресцентного совместного иммуногистохимического анализа (фиг. 14). Срезы окрашивали совместно на SEMA4D (вторая панель слева), маркер астроцитов GFAP (третья панель слева) и DAPI для визуализации клеточных ядер (правая панель). Составные изображения представлены в самых левых панелях, и пунктирный модуль изображает увеличенную в 1,67 раз врезку ниже. Слайды были обследованы с 60х увеличением, используя битовую камеру EXi-Aqua-14, соединенную с микроскопом Olympus Ix50.

Как показано на фиг. 14, SEMA4D-экспрессирующие OPC располагаются в непосредственной близости с GFAP+ астроцитарными отростками. С учетом той роли, которую астроциты играют в способствовании выживанию и функционированию OPC, непосредственное соседство SEMA4D-экспрессирующих OPC и экспрессирующих рецепторы SEMA4D астроцитов предполагает, что связанная с заболеванием активация астроцитов с сопутствующим увеличением экспрессии рецепторов плексина-В и передачи сигнала от SEMA4D может оказывать влияние на функционирование OPC.

Роль астроцитов в поддержании нейронов. В случае заболевания ЦНС, активация астроцитов приводит к увеличению экспрессии плексина, увеличению передачи сигналов от SEMA4D и

ретракции отростков, что приводит к утрате наведения аксонов нейронов, уменьшению трофической поддержки и/или дисрегуляции поглощения/выброса глутамата. В конечном счете, в зависимости от тяжести воздействия заболевания может произойти потеря синапсов и последующая эксайтотоксичная гибель нейронов.

Чтобы определить, будет ли блокирование передачи сигналов от SEMA4D у мышей CVN с AD оказывать влияние на экспрессию синаптических маркеров в областях головного мозга, затронутых рано патогенезом AD, 26-недельным мышам CVN и контрольным мышам дикого типа вводили еженедельно 30 мг/кг моноклонального антитела против SEMA4D (67-2) или контрольного IgG (2B8) внутривенно в течение 13 недель. В 41-недельном возрасте мышей умерщвляли, и срезы ткани головного мозга от подвергнутых лечению мАт мышей окрашивали антителом против соматостатина, антителом против нейропептида-Υ (NPY), антителом против рецептора 1 NPY (NPY1R) или антителом против рецептора 2 NPY (NPY2R) для обнаружения специфических подмножеств тормозных нейронов, которые подвергаются дегенерации на ранней стадии AD. Процент соматостатин-позитивного сигнала определяли количественно в подлежащей ткани, и NPY-, NPY1R- или NPY2R-позитивные сигналы определяли количественно в зубчатой извилине для всех животных и нормализовали, соответственно, к общей отсканированной площади подлежащей ткани или зубчатой извилины. Результаты представлены на фиг. 15 A-D.

Фиг. 15A-15D показывают, что лечение антителом против SEMA4D мышей CVN с AD приводит к восстановлению уровней интенсивности окрашивания на соматостатин (панель A), NPY (панель B) и NPY2R (панель D) до уровней, характерных для мышей дикого типа. Интересно, что агонисты NPY1R в соответствии с сообщением уменьшают стресс и страх, наряду с тем, что антагонисты, специфические в отношении NPY2R, уменьшают стресс и страх (Markus Heilig. The NPY system in stress, anxiety and depression. *Neuropeptides* 38 (2004) 213-224). Как показано на фиг. 2 выше, мыши CVN, подвергнутые лечению антителом против SEMA4D, продемонстрировали уменьшение выраженности страха при испытаниях в «открытом поле», результаты, которые коррелировали

с нормализованными (более низкими) уровнями NPY2R, в то время как уровни NPY1R были неизменными при лечении мАТ против SEMA4D и оставались выше, чем у мышей дикого типа. Следовательно, эти изменения уровней рецепторов NPY согласуются с уменьшением подобного страху поведением, отмечаемым у мышей CVN, подвергнутых лечению антителом против SEMA4D, данные, которые дополнительно подтверждают роль SEMA4D в модуляции нейротрансмиссии *in vivo*. Следует отметить, что уменьшение экспрессии тормозного нейромедиатора NPY, наблюдаемое в модели AD CVN, также описывалось в коре головного мозга пациентов с болезнью Альцгеймера (Beal, et al., *Ann. Neurol.* 20, 282-288 (1986)).

Роль астроцитов в сохранении целостности гематоэнцефалического барьера. Как уже обсуждалось здесь в другом месте, отростки астроцитов со стороны церебральных микрососудов или мягкой мозговой оболочки характеризуются высокой плотностью «водного канала», аквапорина 4 (Aqp4). Астроцитарные отростки напротив синаптических областей богаты переносчиками глутамата, в то время как плотность Aqp4 является сравнительно низкой. Индуцированная заболеванием ЦНС активация астроцитов увеличивают передачу сигналов от SEMA4D через плексин, что приводит к ретракции нижних частей отростков астроцитов, о чем свидетельствует перераспределение аквапорина-4. Это приводит к дисрегуляции и проницаемости ГЭБ, способствуя тем самым воспалению эндотелия и последующему вхождению лейкоцитов в ЦНС. В условиях AD, интенсивности окрашивания на Aqp4 значительно уменьшаются в зонах со значительной массой амилоидных бляшек.

Для определения профилей экспрессии аквапорина-4 у мышей CVN с AD по сравнению с подобранными по возрасту мышами дикого типа, мышей CVN и контрольных мышей дикого типа умерщвляли в 41-недельном возрасте и обрабатывали ради флуоресцентного совместного иммуногистохимического анализа. Результаты представлены на фиг. 16, при этом для мышей дикого типа они представлены в верхних панелей, для мышей CVN - в нижних панелях. Срезы окрашивали совместно на аквапорин-4 (вторые

панели слева), маркер астроцитов GFAP (третьи панели слева) и DAPI (правые панели) для визуализации клеточных ядер. Составные изображения представлены в самых левых панелях. Слайды были обследованы с 60х увеличением, используя битовую камеру EXi-Aqua-14, соединенную с микроскопом Olympus Ix50.

Как показано на фиг. 16, окрашивание на Aqp4 у подобранных по возрасту мышей CVN выявило значительный сдвиг в сторону размытого рисунка. Это отличается от совместных иммуногистохимических анализов Aqp4- и GFAP-позитивных астроцитов в головном мозге мышей дикого типа, которые демонстрируют картину окрашивания на Aqp4 в подлежащей ткани, которая ограничивается районами, близкими к микрососудам. Это изменение распределения Aqp4, или утрата полярности, коррелирует с высокой активацией астроцитов, о чем свидетельствует увеличение интенсивности окрашивания на GFAP. Учитывая прочную корегистрацию окрашивания на плексин-B1 в активированных астроцитах (фиг. 11) и роль передачи сигналов от SEMA4D/плексина-B1 в ретракции клеточных отростков, эти данные указывают на то, что передача сигналов от SEMA4D может играть определенную роль в изменении полярности астроцитов на внутренней поверхности ГЭБ во время болезни.

Для анализа влияния SEMA4D на ГЭБ использовали модель динамического *in vitro* гематоэнцефалического барьера (DIV-BBB). Вкратце, модель состоит из полых полипропиленовых волокон, которые содержат чрескапиллярные поры диаметром от 2 до 4 мкм. Волокна были соединены с пульсирующим насосом, который способствует непрерывному потоку среды, а также экспериментальных соединений через волокна и нормальному стимуляции поток-регулируемых рецепторов эндотелиальных клеток. Эндотелиальные клетки головного мозга человека заседали в люминальный (относящийся к просвету) отсек, и позволяли им прикрепляться к внутренним стенкам волокон и покрывать их, в то время как астроциты человека заседали в аблюминальный отсек, омывающий внешнюю поверхность волокон. Эндотелиальные клетки и астроциты взаимодействуют через мембрану с вызовом образования барьера с плотными соединениями между эндотелиальными клетками.

Целостность этого барьера можно контролировать непрерывно путем измерения трансэндотелиального электрического сопротивления (TEER). Эндотелиальные клетки головного мозга человека заседали в люминальный отсек, и позволяли им прикрепляться к полипропиленовым волокнам, а астроциты человека заседали отдельно на аблюминальную поверхность волокон. В момент максимального TEER (через приблизительно 14 дней *in vitro*), 0,5, 5 и 50 мкг/мл рекомбинантного SEMA4D добавляли последовательно с 12-часовым интервалом. Через 36 часов после первоначального воздействия SEMA4D, 250 мкг/мл контрольного IgG (мАт 2955; 1-DIV-BBB единица) или антитела против SEMA4D (VX15/2503; 2 DIV-BBB единицы) добавляли, и TEER измеряли в течение еще 132 ч. Результаты представлены на фиг. 17. Усы представляют собой среднеквадратическое отклонение. Представленные данные соответствуют трем независимым экспериментам, причем каждый демонстрирует схожие эффекты SEMA4D и антитела на целостность DIV-BBB.

Как показано на фиг. 17, пробой ГЭБ был аннулирован в пределах 24 ч посредством добавления антитела против SEMA4D (VX15/2503). Введение контрольного рекомбинантного белка не приводило к уменьшению TEER (не представленные данные). Кроме того, введение контрольного антитела в виде IgG (мАт 2955) не влияло на SEMA4D-индуцированное нарушение ГЭБ.

Эти данные свидетельствуют о том, что индуцированная заболеванием ЦНС активация астроцитов увеличивает передачу сигналов от SEMA4D через увеличение экспрессии плексина-B1 и/или плексина-B2, что приводит к ретракции нижних частей отростков астроцитов, о чем свидетельствует перераспределение аквапорина-4. Это приводит к дисрегуляции и проницаемости ГЭБ, способствуя тем самым воспалению эндотелия и последующему вхождению лейкоцитов в ЦНС.

Роль передачи сигнала от SEMA4D в стимулировании активации астроцитов. Учитывая связь экспрессии рецепторов SEMA4D и маркера активации астроцитов GFAP, существует вероятность того, что передача сигнала от SEMA4D может усилить активацию астроцитов, тем самым обеспечивая «упреждающий» механизм во

время болезненных состояний. Для изучения эффектов SEMA4D на активацию астроцитов, первичные культуры астроцитов крыс были созданы и обработаны SEMA4D самим по себе или в комбинации с предварительной обработкой тиацетамидом (ТАА), хорошо известным гепатотоксичными и гепатокарциногенным агентом, который, как было установлено, индуцирует экспрессию плексина-В1 *in vivo* (Lim, JS, et al., (2006). Mol. Cell. Tox., 2 (2), 126-133). Крысиные первичные астроциты были предварительно обработаны в течение 4 ч ТАА, а затем растворимым SEMA4D в течение 24 ч. Затем клетки фиксировали и окрашивали на GFAP и сканировали при 20-кратном увеличении. «Усы» обозначают среднеквадратическое отклонение. «*»= $p < 0,05$ в соответствии с однофакторным дисперсионным анализом (ANOVA) с использованием критерия множественного сравнения Бонферрони.

Как показано на фиг. 18А, значительное увеличение GFAP, маркера активации астроцитов, наблюдалось при добавлении SEMA4D к клеткам, предварительно обработанным ТАА, предполагая, что передача сигналов от SEMA4D усиливает активацию астроцитов.

Во второй серии исследований *in vitro*, первичные астроциты крысы культивировали и обрабатывали простагландином D2 или без него, известным фактором активации, продуцируемым микроглией в ЦНС, с последующим подвергав в течение 8 или 24 ч воздействию рекомбинантного белка SEMA4D. Клетки фиксировали, обрабатывали для гистохимии с использованием фаллоидина (F-актина) и ДНКазы (G-актина), и рассчитывали соотношения площадей F-актин/G-актин для каждого условия обработки. «Усы» представляют собой среднеквадратическое отклонение. «*»= $p < 0,01$ в соответствии с 2-факторным дисперсионным анализом (ANOVA) с использованием критерия множественного сравнения Бонферрони.

Как показано на фиг. 18В, актиновый цитоскелет PGD2-активированных астроцитов, подвергнутых воздействию рекомбинантного SEMA4D, подвергается переходу от глобулярного состояния к филаментному, что свидетельствует о SEMA4D/плексин-опосредуемой передаче сигналов и состоянии повышенной активации астроцитов.

Множество модификаций и другие варианты осуществления

настоящего изобретения, изложенные здесь, будут приходить на ум квалифицированному в данной области техники специалисту, к которой относятся эти раскрытия, извлекающему пользу от учений, представленных в вышеприведенных описаниях и соотнесенных чертежах. По этой причине следует понимать, что раскрытия не должны ограничиваться конкретными раскрытыми вариантами осуществления, и что модификации и другие варианты осуществления, как предполагается, включены в объем прилагаемой формулы изобретения и перечень вариантов осуществления, раскрытых здесь. Хотя здесь используются конкретные термины, они используются только в общем и описательном смысле, а не с целью ограничения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ лечения субъекта, который имеет, у которого установлено наличие болезни Альцгеймера (AD), включающий введение субъекту эффективного количества выделенного антитела или антиген-связывающего фрагмента, который специфически связывается с Semaphorin-4D (SEMA4D), где связывание с SEMA4D действует для облегчения симптомов, связанных с AD.

2. Способ по п.1, в котором AD является AD на ранней стадии.

3. Способ по п.1 или 2, в котором связывающая молекула восстанавливает количество соматостатин-позитивных нейронов, NYP-позитивных нейронов или обоих у субъекта.

4. Способ по любому из пп.1-3, в котором связывающая молекула ингибирует связывание SEMA4D с его рецептором или частью его рецептора.

5. Способ по п.4, в котором рецептор представляет собой плексин-B1, плексин-B2 или CD72.

6. Способ по п.5, в котором связывающая молекула ингибирует связывание SEMA4D с трансдукцией сигнала плексин-B1.

7. Способ по любому из пп.1-6, в котором выделенные связывающие молекулы конкурентно ингибируют эталонное моноклональное антитело, содержащее аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4 вариабельной области тяжелой цепи (VH) и аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10 вариабельной области легкой цепи (VL) от связывания с SEMA4D.

8. Способ по любому из пп.1-7, в котором выделенная молекула специфически связывается с тем же эпитопом SEMA4D в качестве эталонного моноклонального антитела, включающего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9 вариабельной области тяжелой цепи (VH) и аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10 вариабельной области легкой цепи (VL).

9. Способ по любому из пп.1-8, в котором выделенная связывающая молекула содержит антитело, антиген-связывающий фрагмент.

10. Способ по п.9, в котором антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельную область тяжелой цепи (VH), содержащую VHCDR 1-3, содержащие SEQ ID NO:

6, 7 и 8 соответственно, и переменную область легкой цепи (VL), содержащую VLCDR 1-3, содержащие SEQ ID NO: 14, 15 и 16 соответственно.

11. Способ по п.10, в котором VH и VL содержат соответственно SEQ ID NO: 9 и SEQ ID NO: 17 или SEQ ID NO: 10 и SEQ ID NO: 18.

12. Способ по любому из пп.1-11, в котором введение выделенной связывающей молекулы сочетают с, по меньшей мере, одним или более из лечений AD и, где другое лечение вводят до, во время или после введения связывающей молекулы субъекту.

13. Способ по любому из пп.1 и 2, в котором симптомы выбирают из группы, состоящей из психоневрологических симптомов, когнитивных симптомов, двигательной дисфункции и любой их комбинации.

14. Способ по п.13, в котором психоневрологические симптомы выбирают из группы, состоящей из уменьшения подобного страху поведения, улучшения пространственной памяти, увеличения локомоции и любого их сочетания.

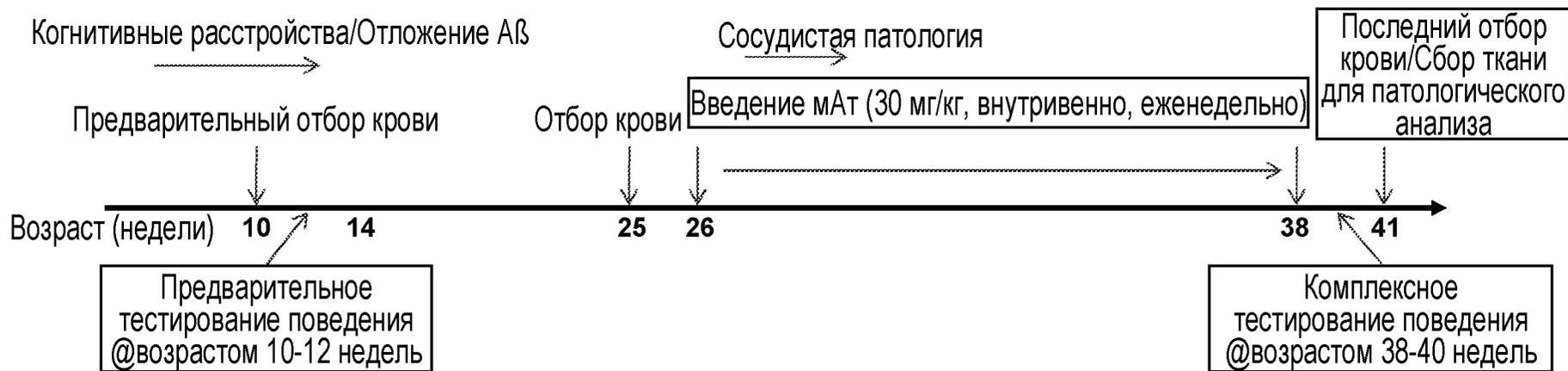
15. Способ по любому из пп.1-14, в котором субъектом является человек.

16. Способ по любому из предыдущих пунктов с 1 по 15, в котором связывающая молекула снижает скорость гибели нейрональных клеток у субъекта.

17. Способ по любому из предыдущих пунктов с 1 по 16, в котором связывающая молекула модулирует опосредованное астроцитами поддержание целостности гематоэнцефалического барьера у субъекта.

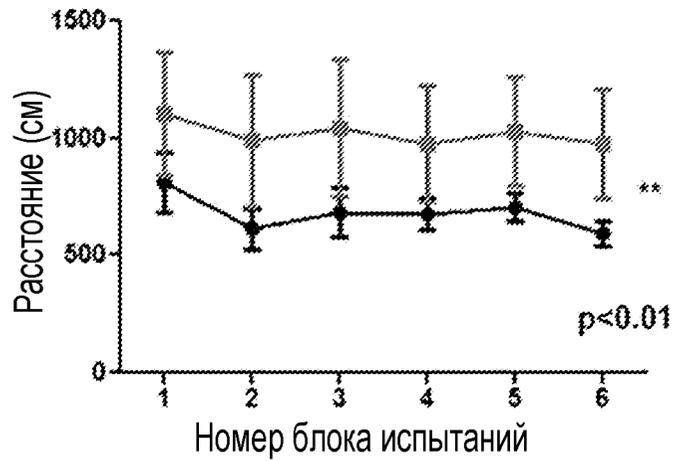
18. Способ по любому из пп.1-17, в котором связывающая молекула модулирует опосредованную астроцитами синаптическую активность.

По доверенности



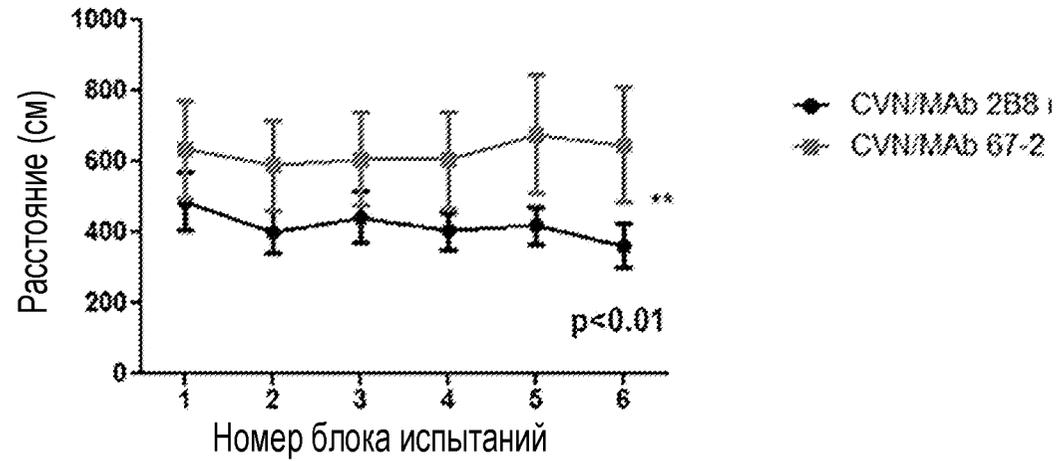
ФИГ. 1

Расстояние перемещения в тесте «открытое поле»
(CVN МАТ 2В8 в сравнение с CVN МАТ 67-2)

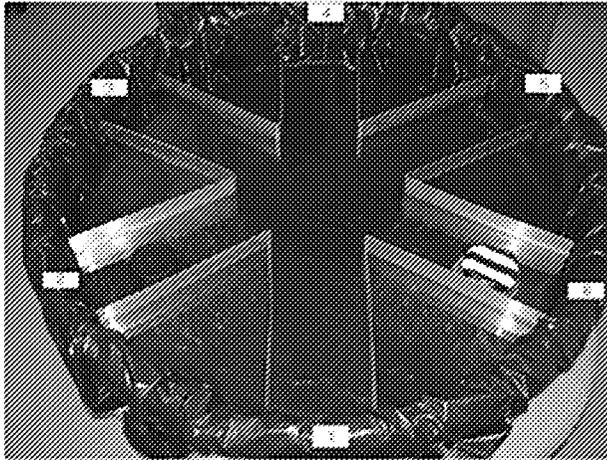


ФИГ. 2А

Расстояние перемещения в центре
в тесте «открытое поле»
(CVN МАТ 2В8 в сравнение с CVN МАТ 67-2)



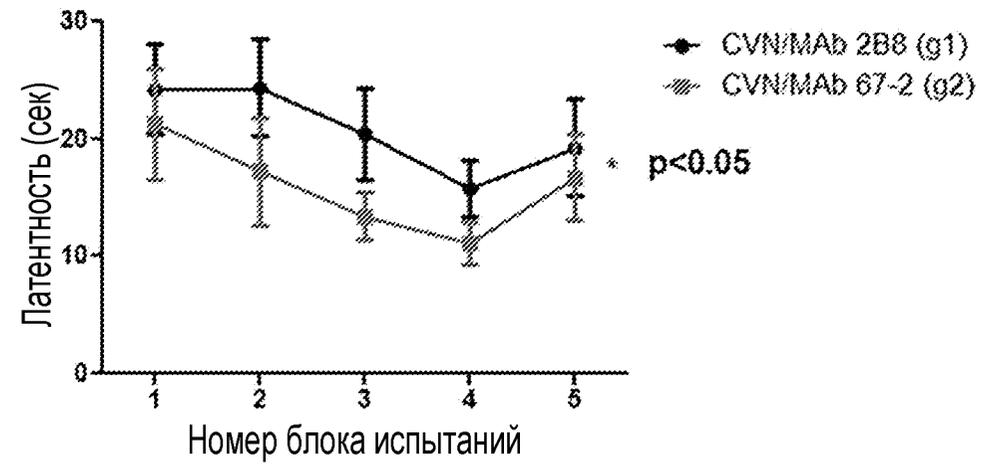
ФИГ. 2В



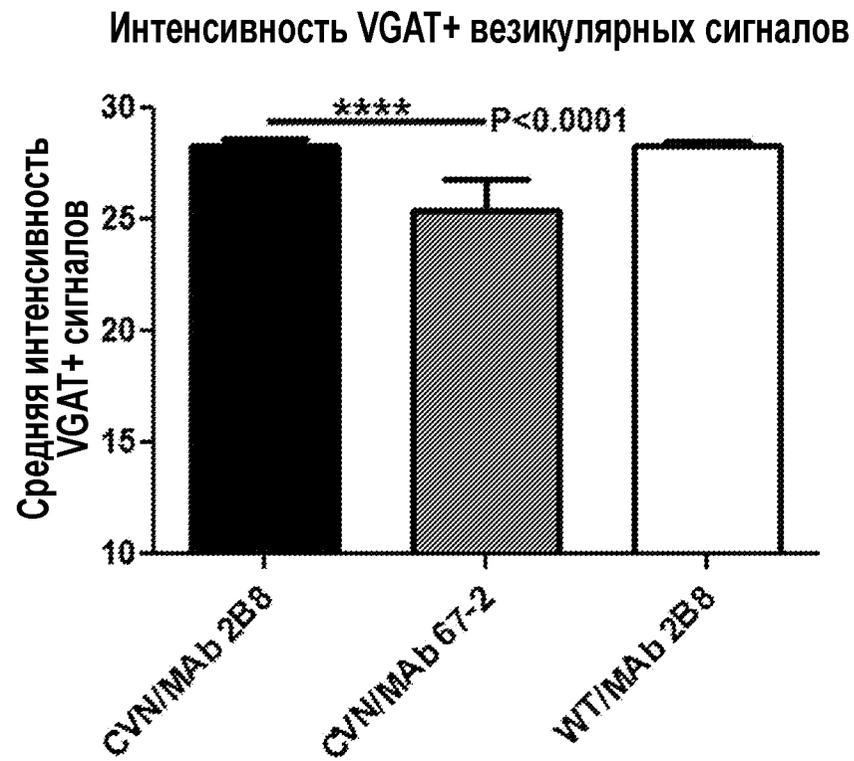
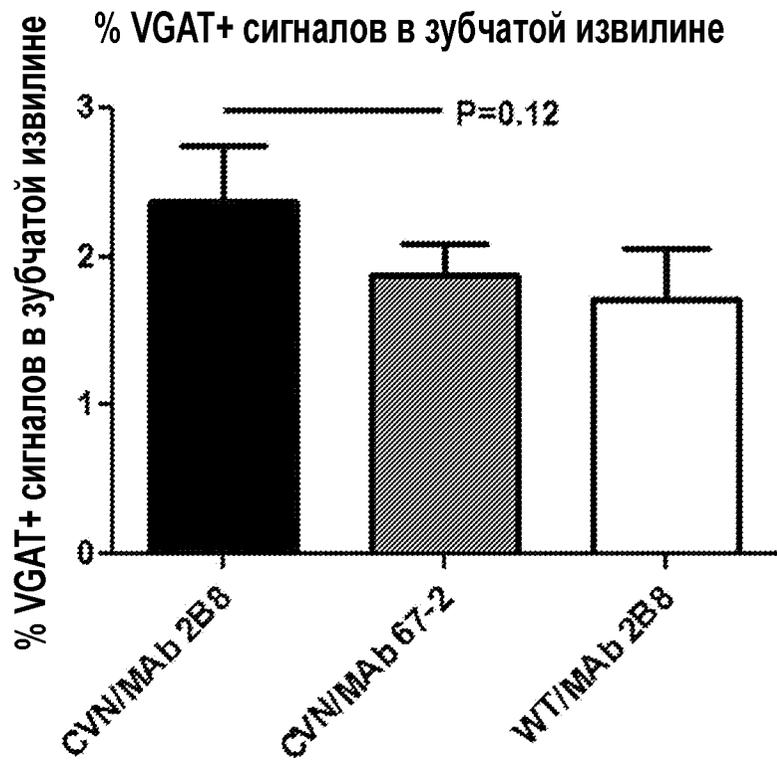
Alamed et al. *Nat. Protocols*, 2006

ФИГ. 3А

Латентность в день 2 при использовании радиального шестирукавного водного лабиринта (CVN МАТ 2В8 в сравнение с CVN МАТ 67-2)

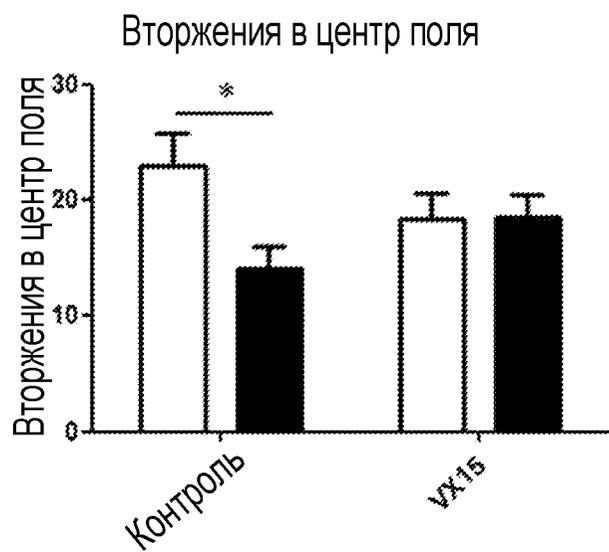


ФИГ. 3В

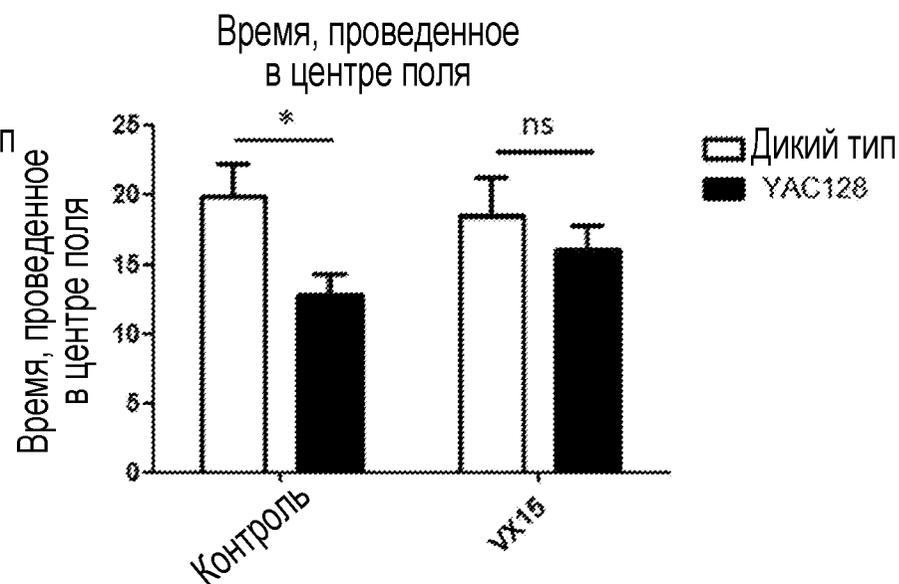


ФИГ. 4

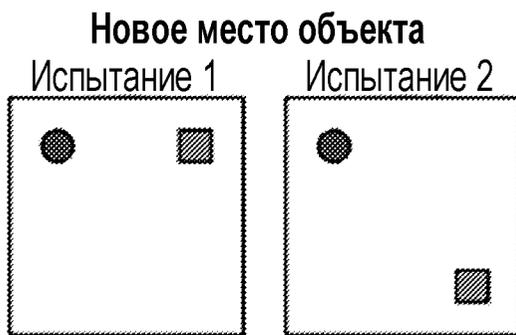
Тест «открытое поле»



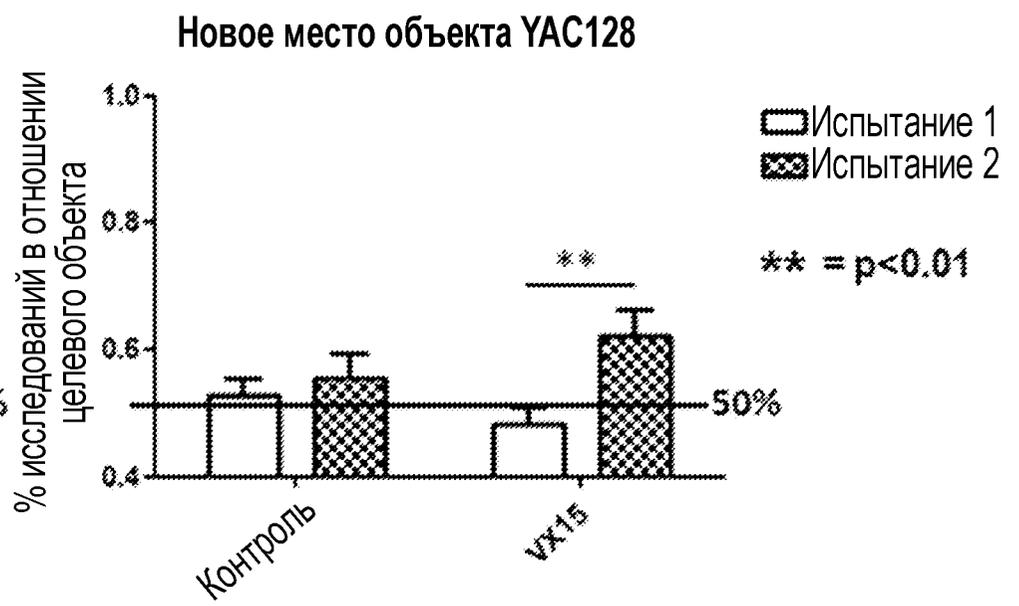
ФИГ. 5А



ФИГ. 5В



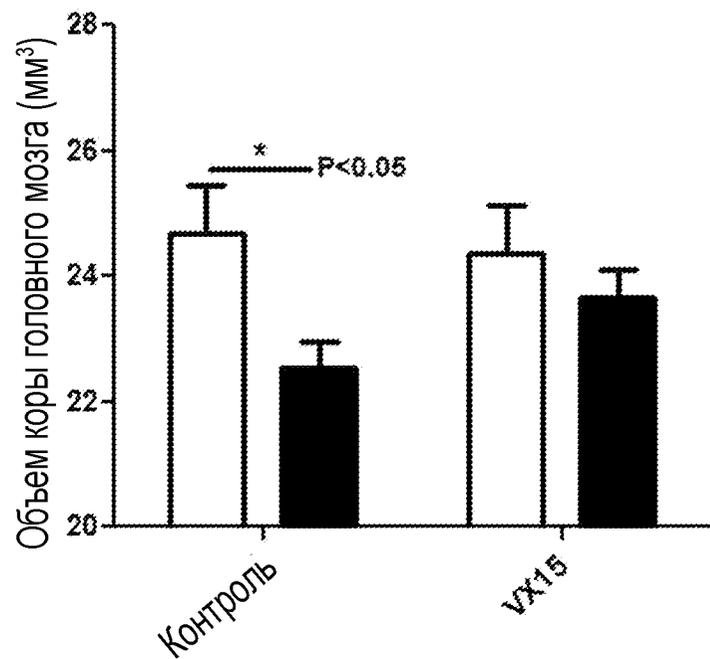
ФИГ. 6А



ФИГ. 6В

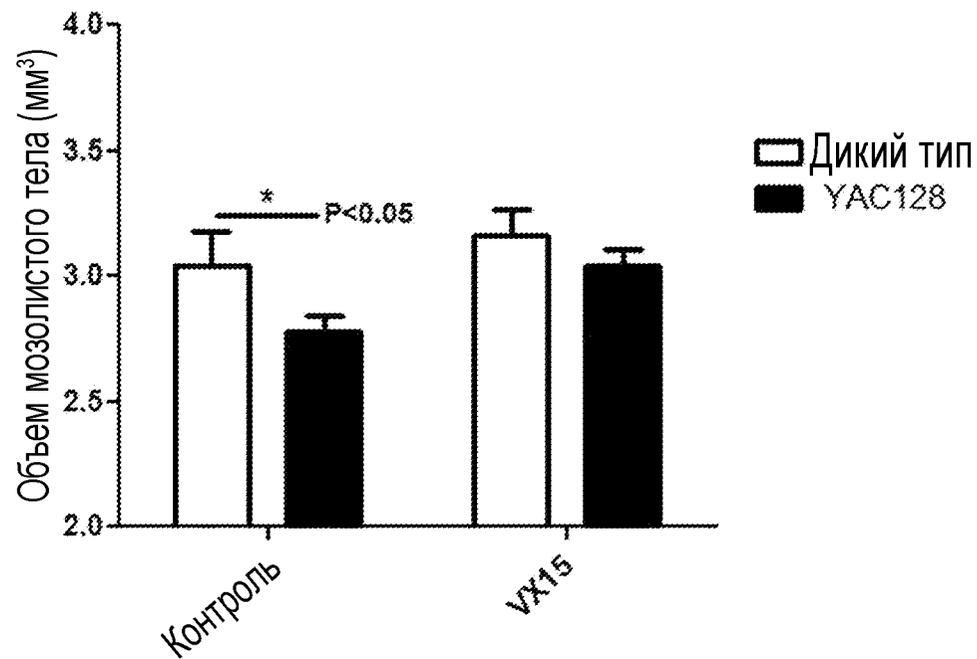
Испытание 1
 Испытание 2
**** = p < 0.01**

Кора головного мозга

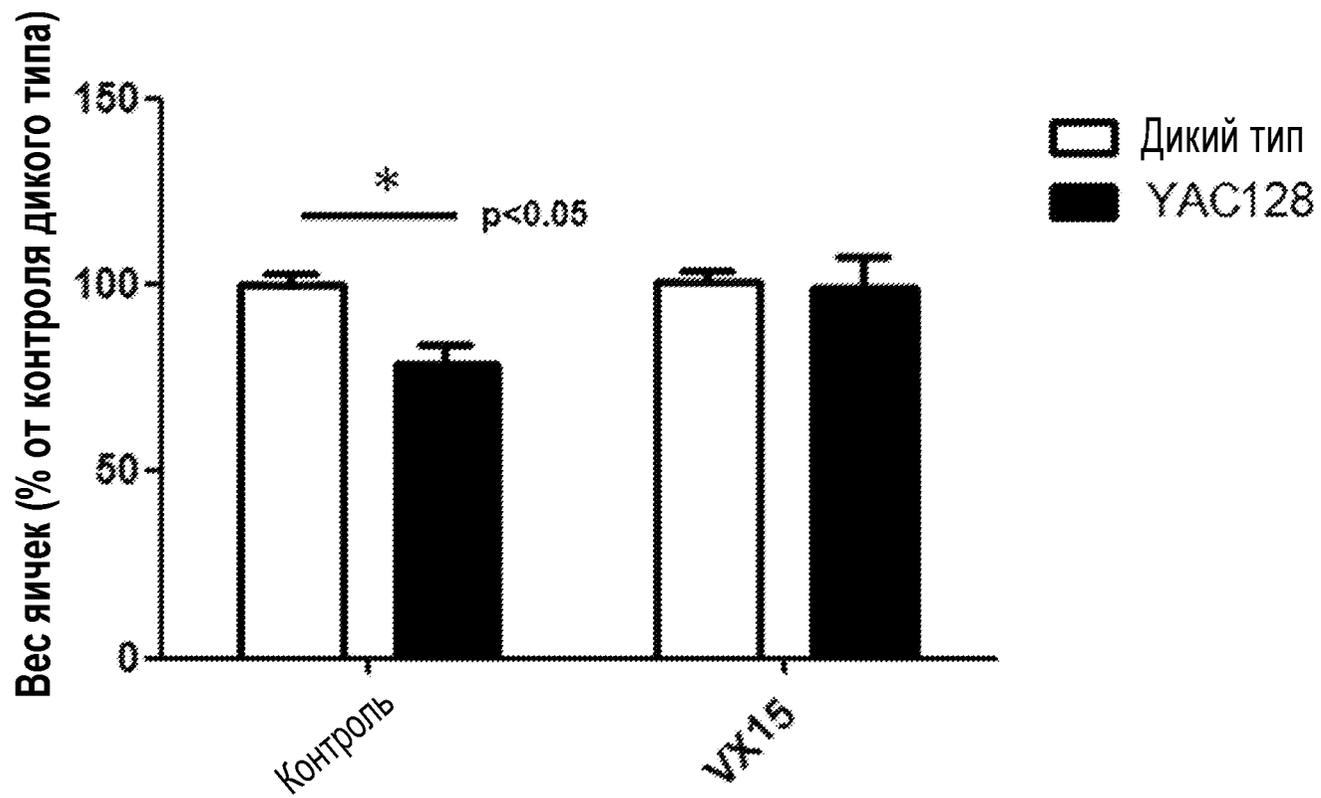


ФИГ. 7А

Мозолистое тело

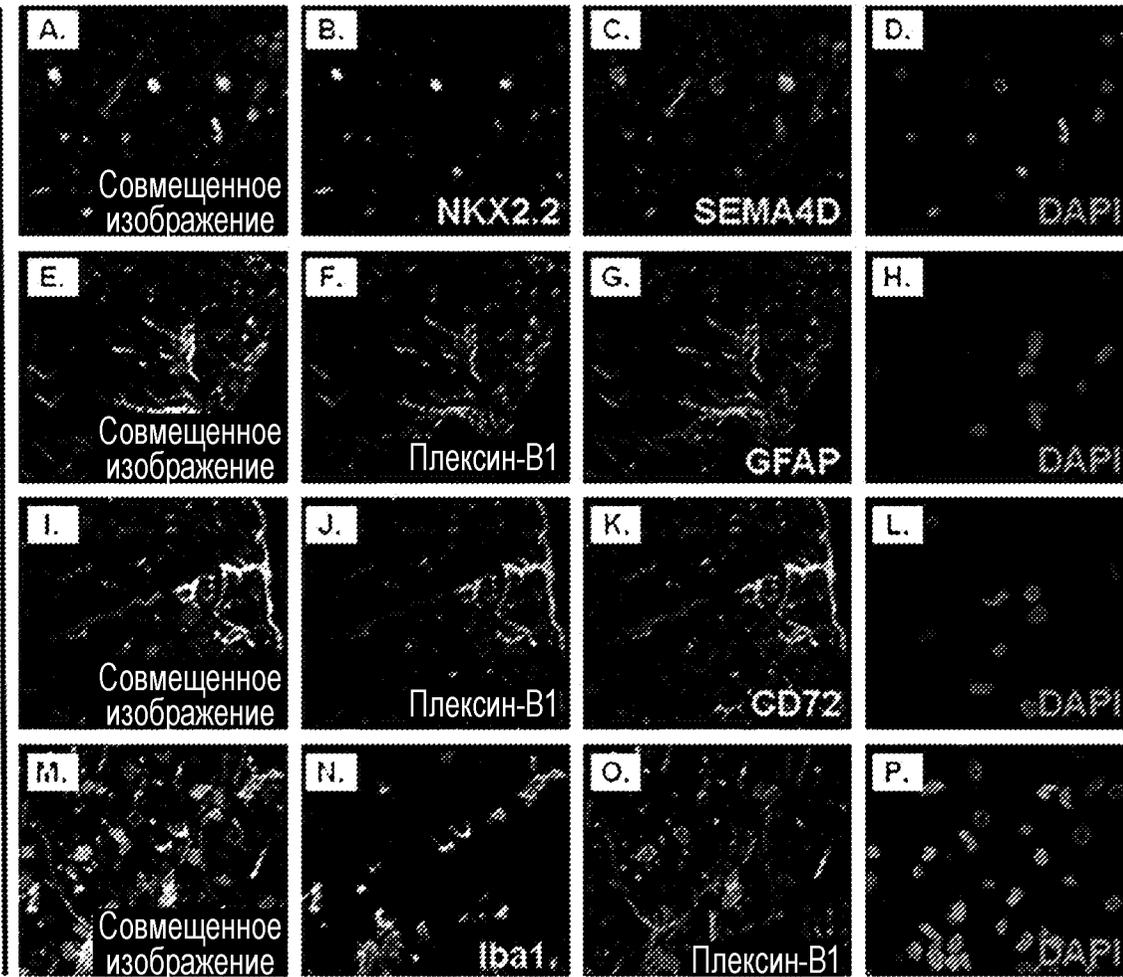


ФИГ. 7В



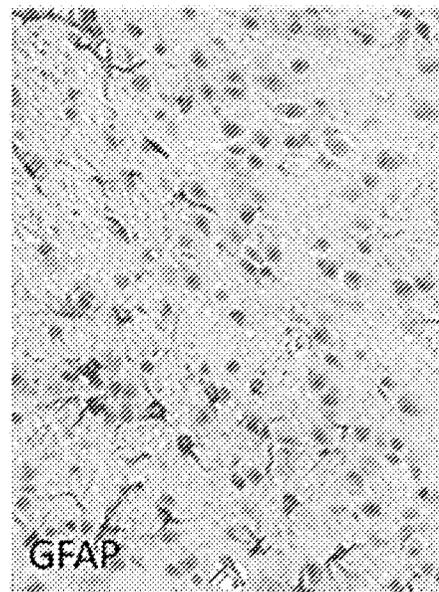
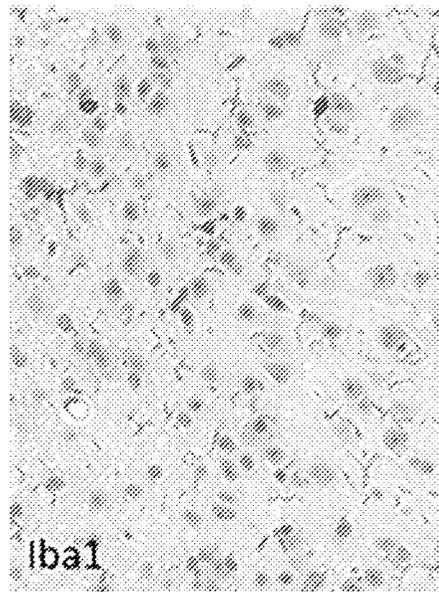
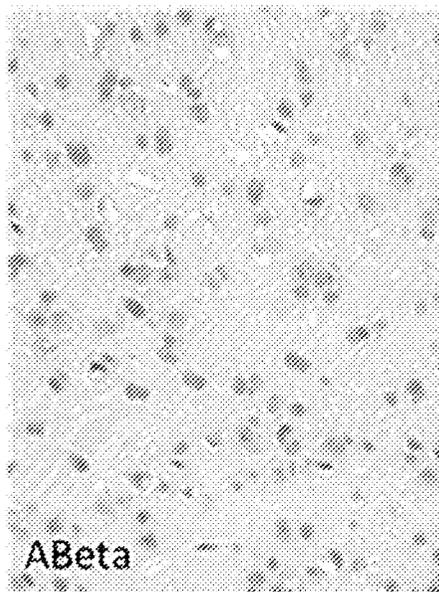
ФИГ. 8

Спинальный мозг неиспользовавшейся ранее в опытах крысы

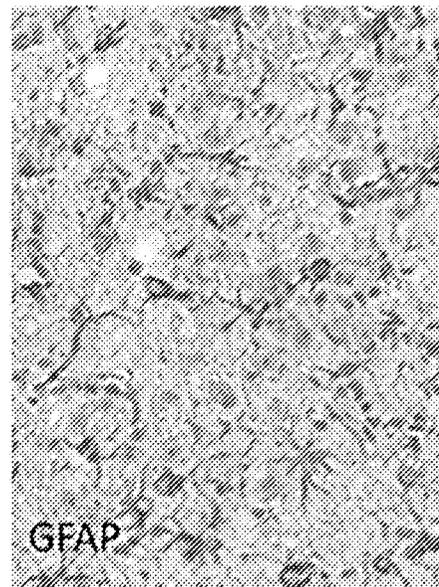
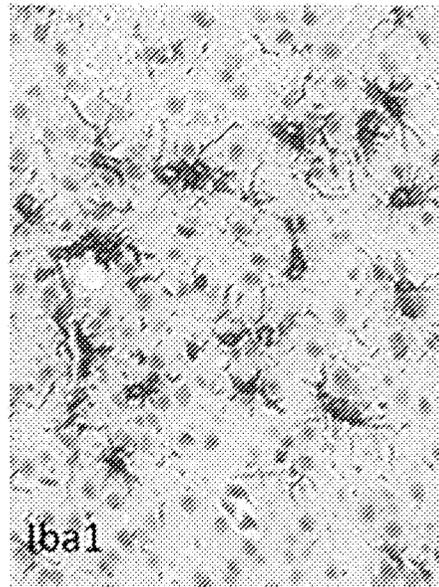
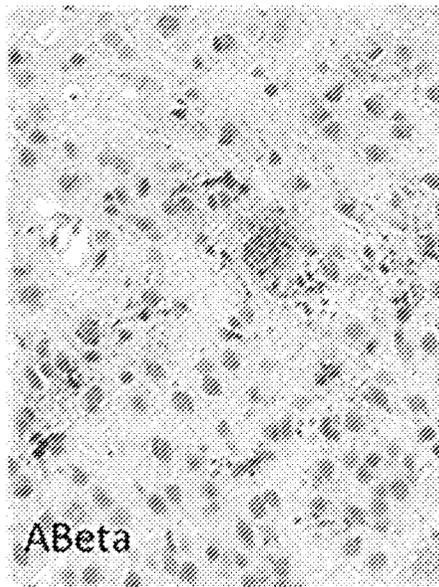


ФИГ. 9А,В,С,Д,Е,Ф,Г,Н,И,Ј,К,Л,М,Н,О,Р

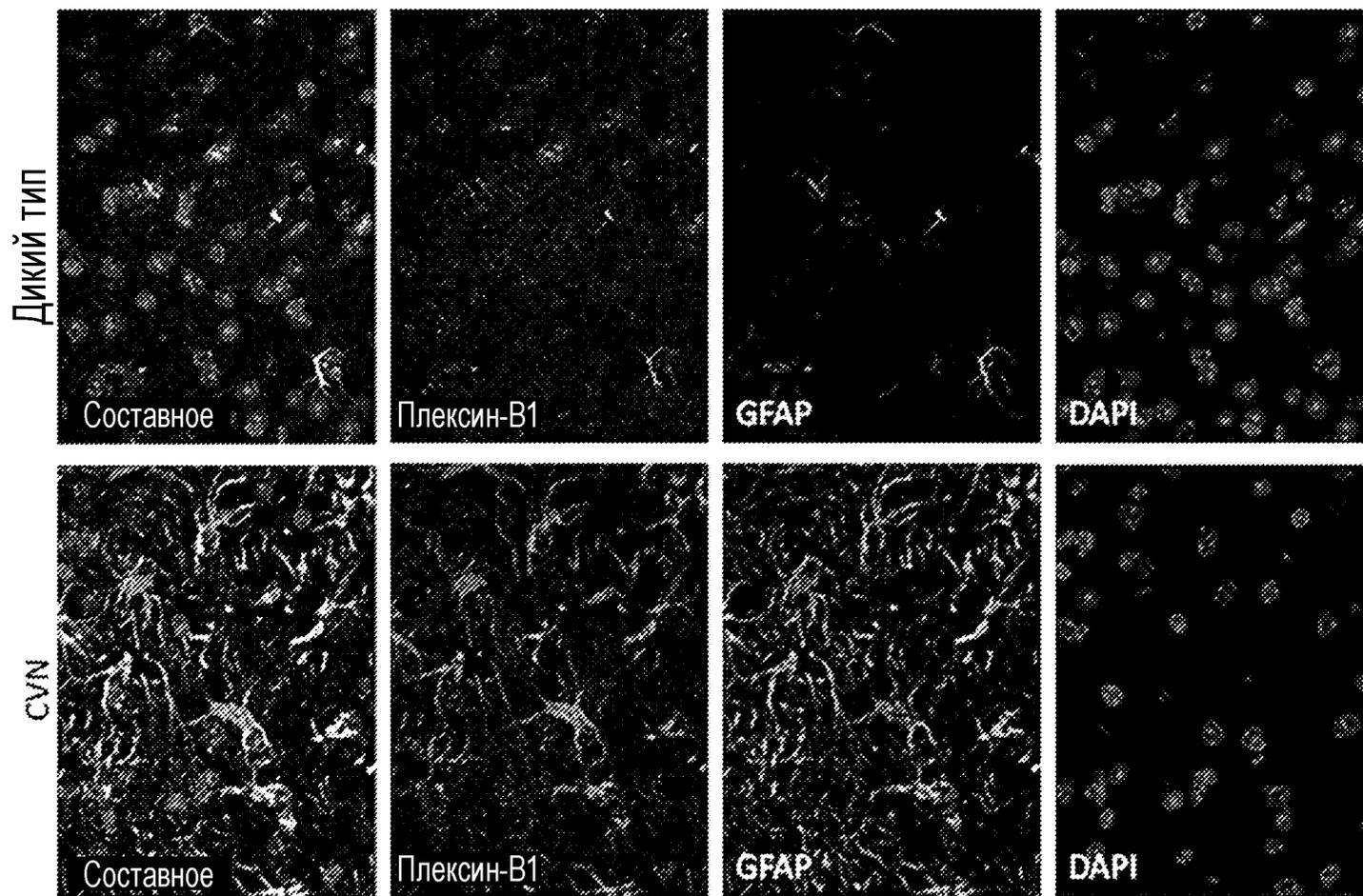
ДИКИЙ ТИП



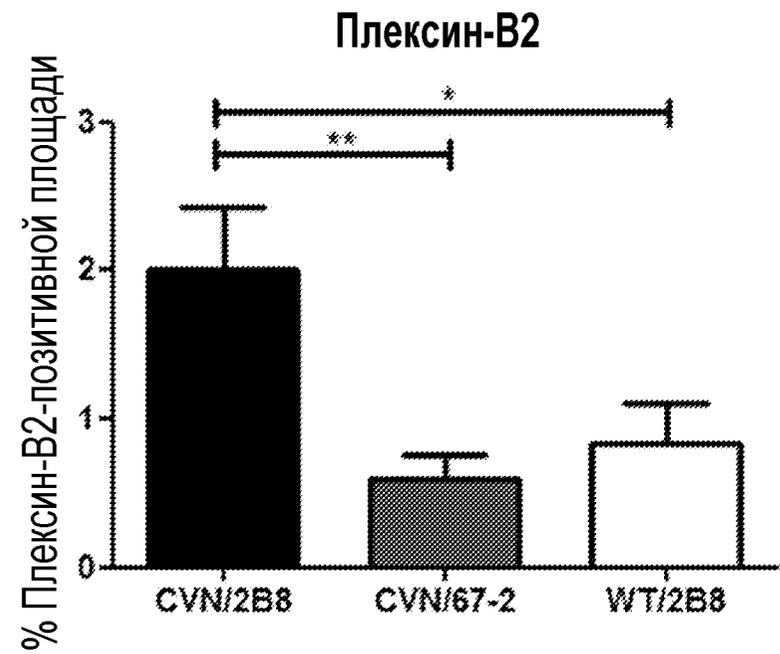
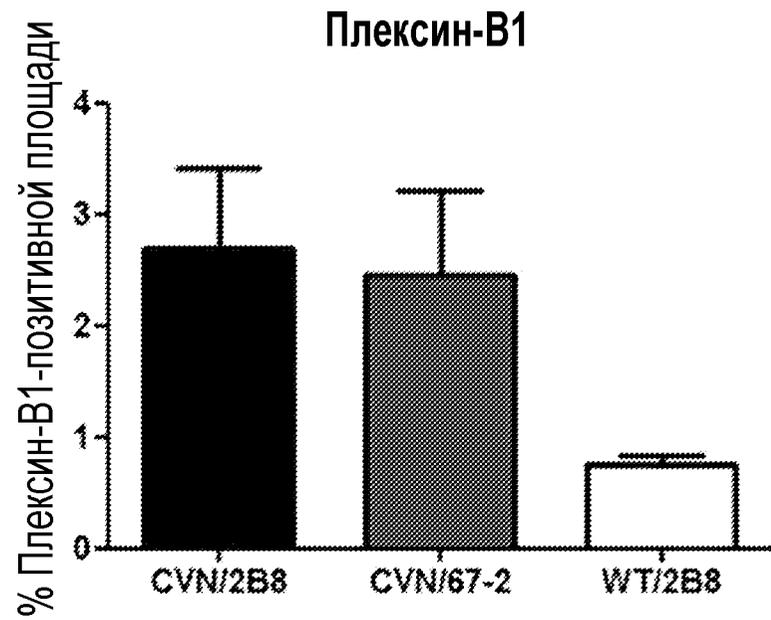
CVN



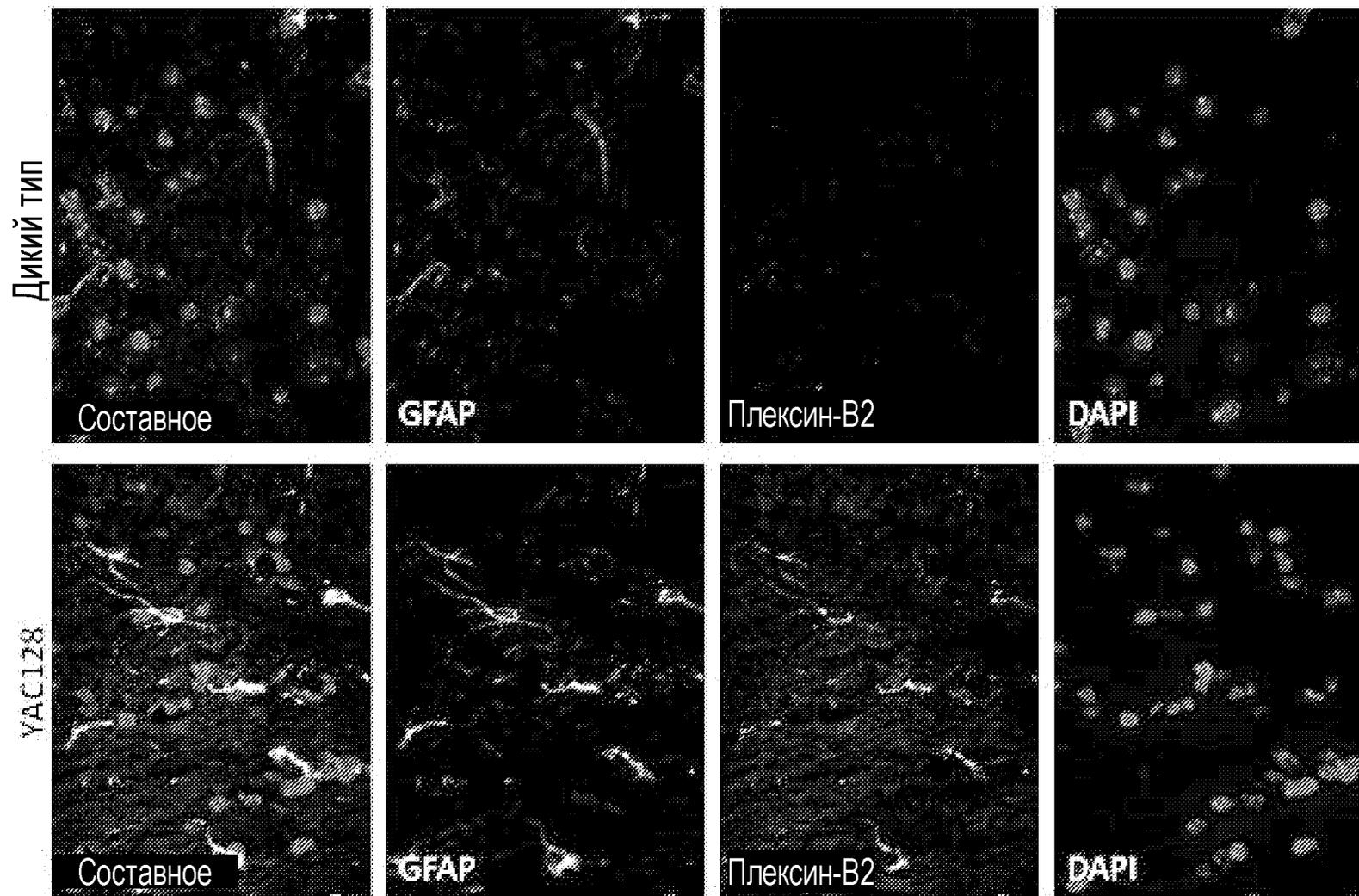
ФИГ. 10



ФИГ. 11А

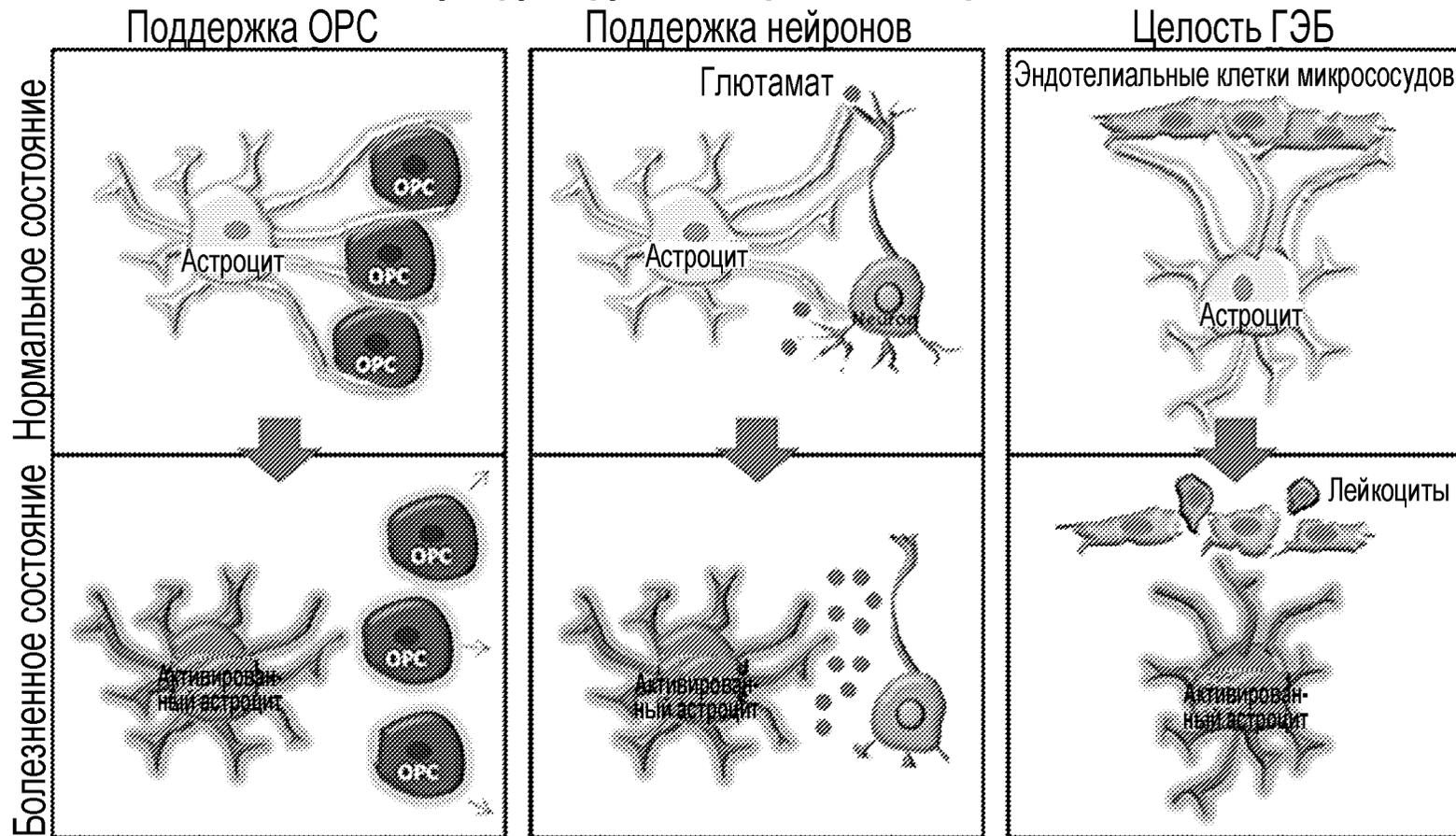


ФИГ. 11В

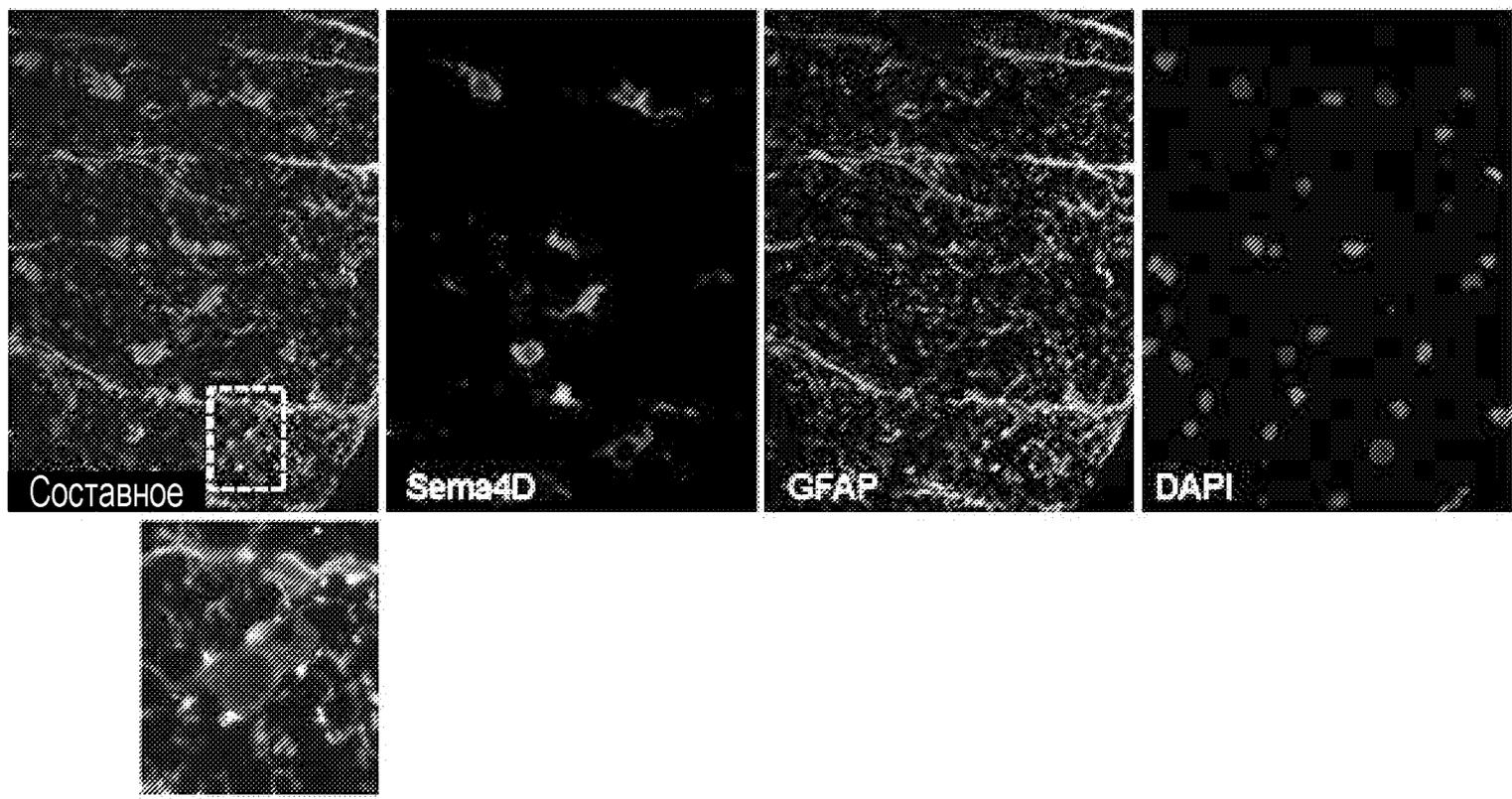


ФИГ. 12

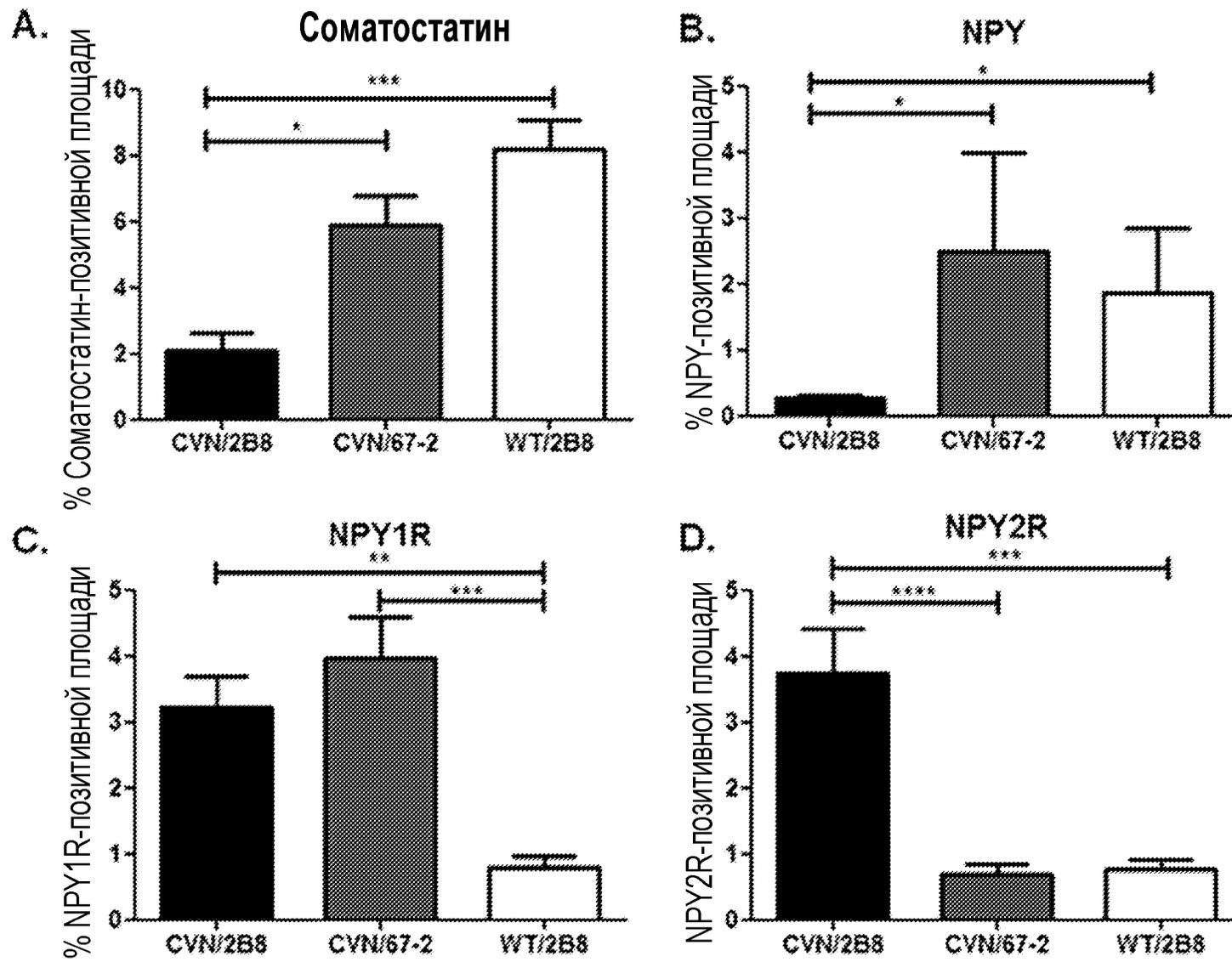
Механизмы, с помощью которых передача сигналов от SEMA4D модулирует функционирование астроцитов



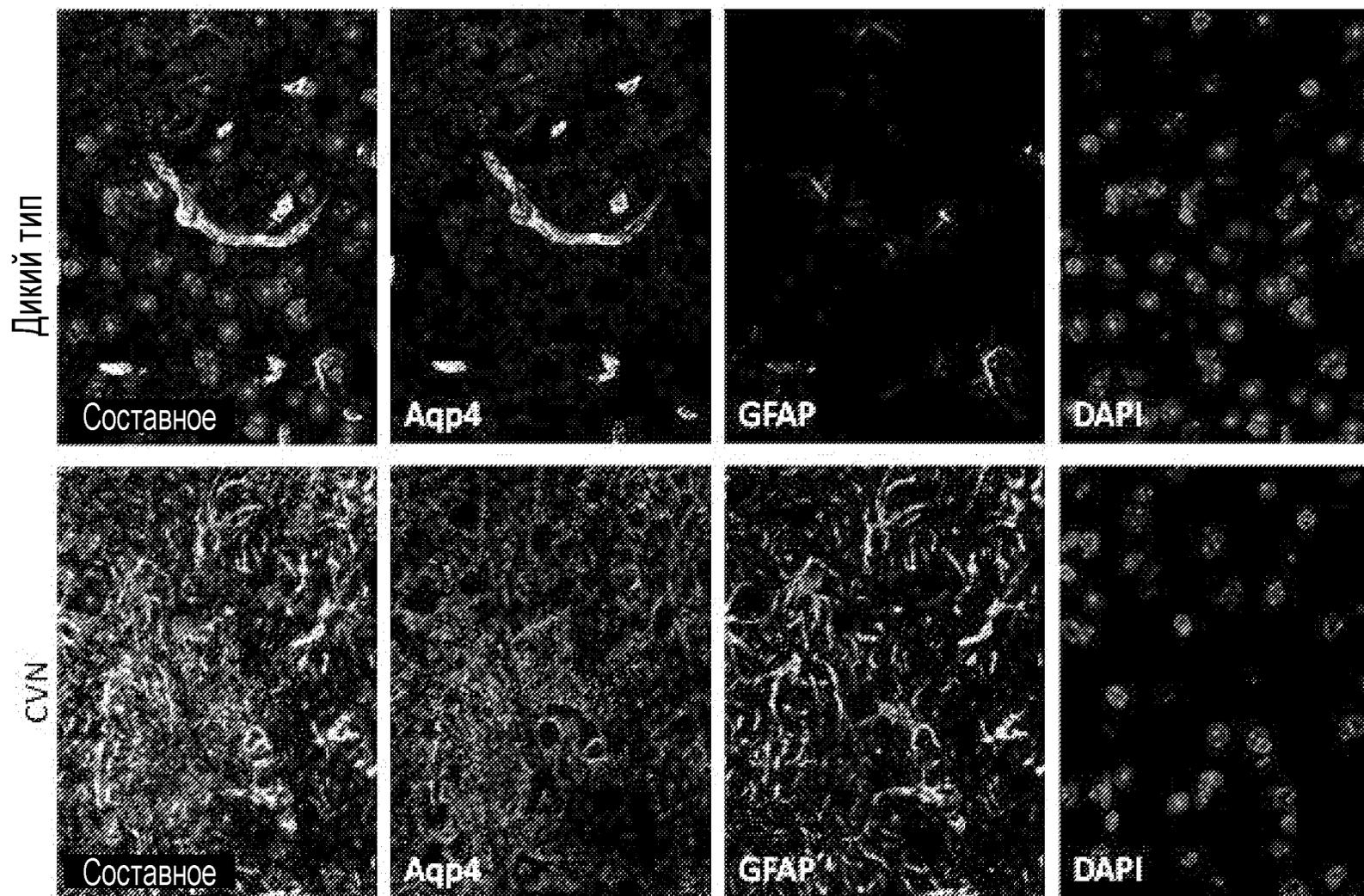
ФИГ. 13



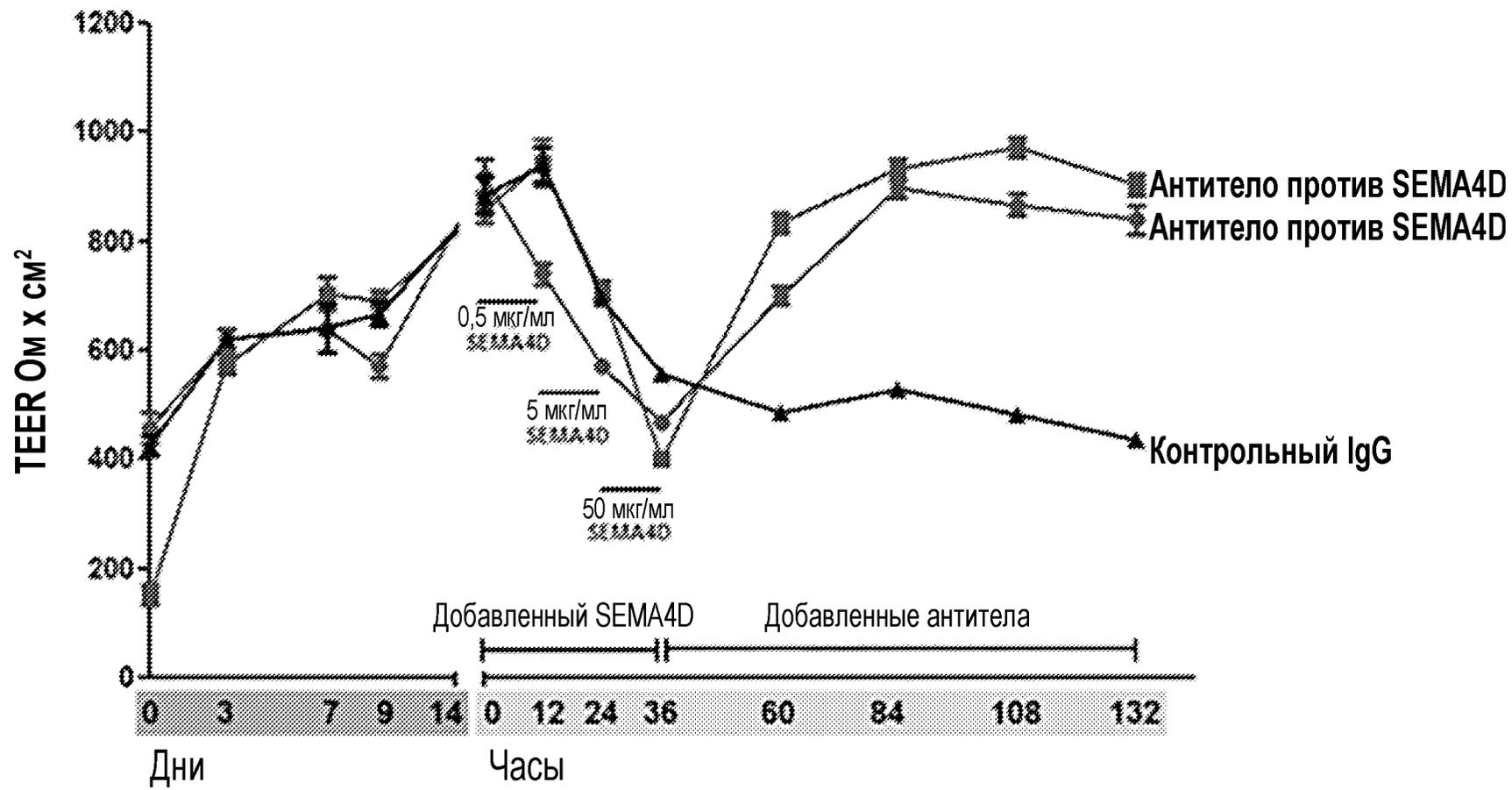
ФИГ. 14



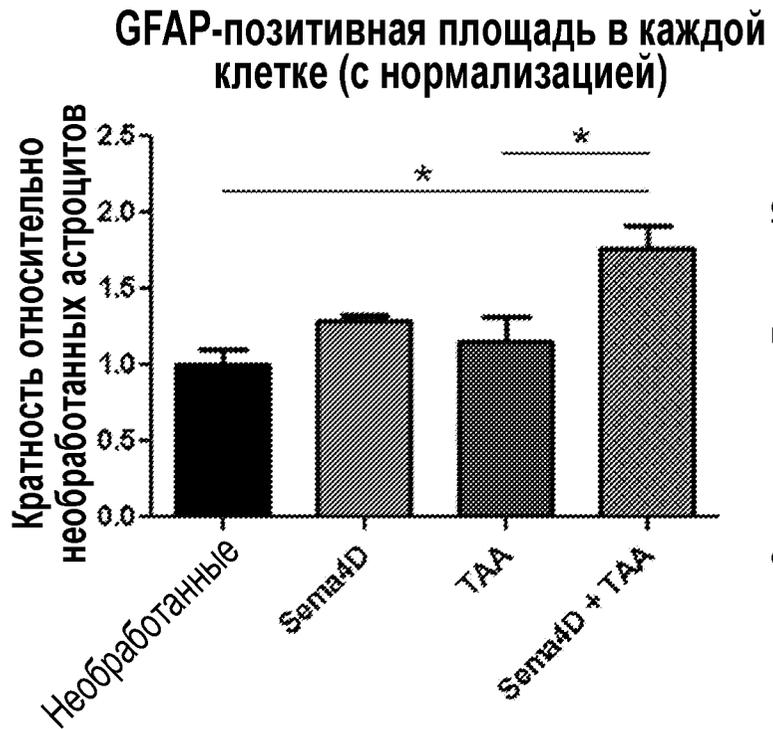
ФИГ. 15А,В,С, D



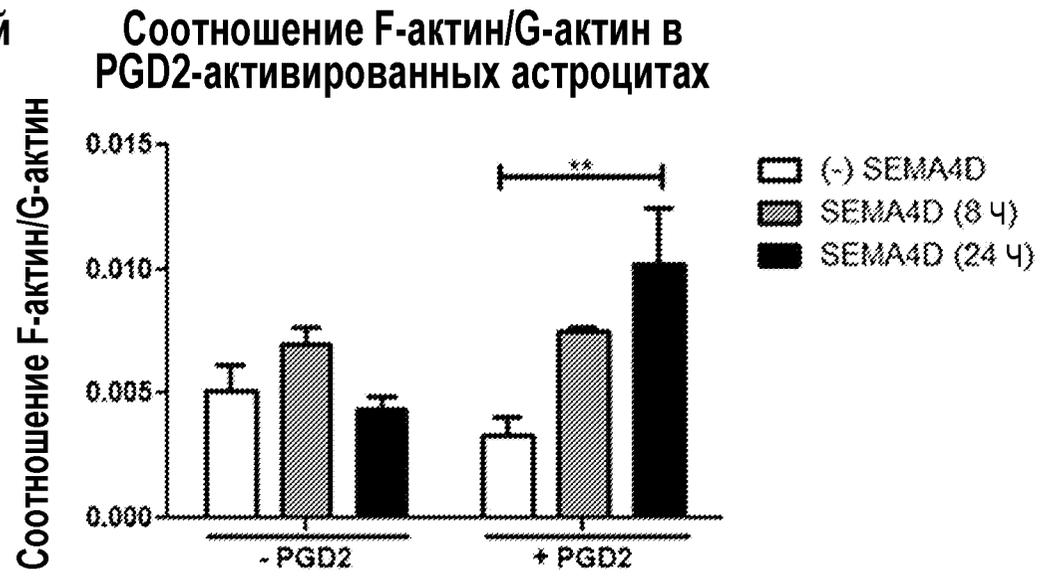
ФИГ. 16



ФИГ. 17



ФИГ. 18А



ФИГ. 18В