



**(19) 대한민국특허청(KR)**  
**(12) 등록특허공보(B1)**

(45) 공고일자 2019년07월12일  
 (11) 등록번호 10-1999872  
 (24) 등록일자 2019년07월08일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
*A61K 39/395* (2006.01) *A61K 38/00* (2006.01)  
*A61P 25/00* (2006.01) *A61P 29/00* (2006.01)
- (21) 출원번호 10-2014-7012547
- (22) 출원일자(국제) 2012년10월11일  
 심사청구일자 2017년10월11일
- (85) 번역문제출일자 2014년05월09일
- (65) 공개번호 10-2014-0076616
- (43) 공개일자 2014년06월20일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2012/059757
- (87) 국제공개번호 WO 2013/055922  
 국제공개일자 2013년04월18일
- (30) 우선권주장  
 61/545,809 2011년10월11일 미국(US)  
 (뒷면에 계속)
- (56) 선행기술조사문헌  
 W02010129917 A2\*  
 \*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

- (73) 특허권자  
**백시넥스 인코포레이티드**  
 미국 뉴욕 로체스터 마운트 호프 애브뉴 1895 (우: 14620)
- (72) 발명자  
**스미스 어니스트 에스.**  
 미국 14519 뉴욕주 온타리오 보스턴 로드 328  
**자우더러 모리스**  
 미국 14534 뉴욕주 피츠퍼드 우드랜드 로드 44
- (74) 대리인  
**김진희**

전체 청구항 수 : 총 11 항

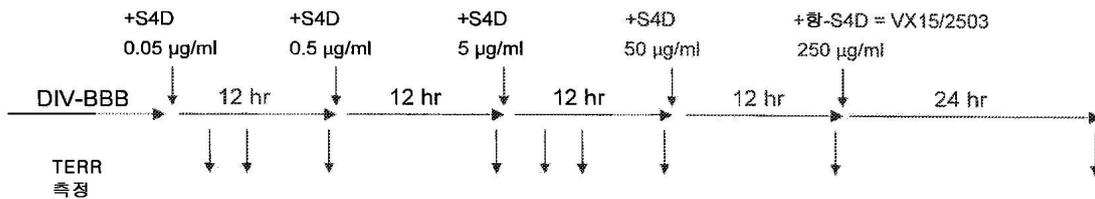
심사관 : 김영수

(54) 발명의 명칭 **혈뇌 장벽 투과성의 조정에 있어서의 세마포린-4D 결합 분자의 용도**

**(57) 요약**

신경염증성 장애를 갖는 대상체에 있어서 혈뇌 장벽 투과성을 감소시키는 방법이 본원에서 제공되며, 본 방법은 세마포린-4D(SEMA4D) 또는 그의 고 친화성 플렉신-B1 수용체에 특이적으로 결합하는 단리된 결합 분자의 유효량을 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다.

**대표도**



(30) 우선권주장

61/555,726 2011년11월04일 미국(US)

61/593,641 2012년02월01일 미국(US)

---

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

혈뇌 장벽(BBB; blood brain barrier) 투과성이 증가된, 신경염증성 장애를 갖는 대상체의 치료에 사용하기 위한, 세마포린(semaphorin) 4D(SEMA4D)에 특이적으로 결합하는 단리된 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 유효량을 포함하는 약학 조성물로서, 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 SEMA4D의 SEMA4D 수용체, 플렉신(Plexin) B1과의 상호작용을 특이적으로 저해하고, 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 대상체에서 BBB 투과성을 감소시키며, 상기 신경염증성 장애는 간질, 알츠하이머병, 파킨슨병, 수막염, 뇌 부종, 또는 뇌 외상인 약학 조성물.

#### 청구항 2

제1항에 있어서, 대상체는 포유류인 약학 조성물.

#### 청구항 3

제2항에 있어서, 포유류는 인간인 약학 조성물.

#### 청구항 4

제1항에 있어서, 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 1) 서열 번호 9의 가변 중쇄(VH) 아미노산 서열 및 서열 번호 17의 가변 경쇄(VL) 아미노산 서열 또는 2) 서열 번호 10의 VH 아미노산 서열 및 서열 번호 18의 VL 아미노산 서열을 포함하는 기준 단일 클론 항체를 경쟁적으로 저해하는 것인 약학 조성물.

#### 청구항 5

제1항에 있어서, 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 1) 서열 번호 9의 VH 아미노산 서열 및 서열 번호 17의 VL 아미노산 서열 또는 2) 서열 번호 10의 VH 아미노산 서열 및 서열 번호 18의 VL 아미노산 서열을 포함하는 기준 단일 클론 항체와 동일한 SEMA4D 에피토프에 특이적으로 결합하는 것인 약학 조성물.

#### 청구항 6

제1항에 있어서, 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 인간 또는 인간화된 것인 약학 조성물.

#### 청구항 7

제1항에 있어서, 항체 또는 이의 항원 결합 단편은, 각각 서열 번호 6, 7 및 8을 포함한 VHCDR 1-3을 포함하는 VH, 및 각각 서열 번호 14, 15 및 16을 포함한 VLCDR 1-3을 포함하는 VL을 포함하는 것인 약학 조성물.

#### 청구항 8

제7항에 있어서, 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 1) 서열 번호 9의 VH 아미노산 서열 및 서열 번호 17의 VL 아미노산 서열 또는 2) 서열 번호 10의 VH 아미노산 서열 및 서열 번호 18의 VL 아미노산 서열을 포함하는 것인 약학 조성물.

#### 청구항 9

혈뇌 장벽(BBB) 투과성이 증가된, 신경염증성 장애를 갖는 대상체의 치료에 사용하기 위한, 세마포린-4D(SEMA4D)에 특이적으로 결합하는 단리된 항체 또는 이의 항원 결합 단편과 플렉신-B1에 특이적으로 결합하는 단리된 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 유효량을 포함하는 약학 조성물로서, 여기서 항체들 또는 이의 항원 결합 단편들은 BBB 투과성을 감소시킴으로써 대상체를 치료하는 것이고, 상기 신경염증성 장애는 간질, 알츠하이머병, 파킨슨병, 수막염, 뇌 부종, 또는 뇌 외상인 약학 조성물.

#### 청구항 10

제1항 내지 제9항 중 어느 하나의 항에 있어서, 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 유효량이, BBB의 저항성의 증

가, BBB 상에 존재하는 내피 세포의 수, 밀도 또는 농도의 증가, 내피 세포에서 형태 또는 기능의 변화, 내피 세포 또는 정상 세포 간의 상호작용의 변화, BBB를 형성하는 정상 세포와 내피 세포 사이의 상호작용의 변화를 이끌어내는 것인 약학 조성물.

**청구항 11**

제1항 내지 제9항 중 어느 하나의 항에 있어서, 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 신경염증성 장애에 대한 하나 이상의 치료와 병용되고, 항체 또는 이의 항원 결합 단편(들)을 사용하기 이전, 동안 또는 이후에 추가 치료가 실시되는 것인 약학 조성물.

**청구항 12**

삭제

**청구항 13**

삭제

**청구항 14**

삭제

**청구항 15**

삭제

**청구항 16**

삭제

**청구항 17**

삭제

**청구항 18**

삭제

**청구항 19**

삭제

**청구항 20**

삭제

**발명의 설명**

**기술 분야**

[0001] 전자적으로 제출된 서열 목록에 대한 언급

[0002] 본 출원과 함께 출원된, ASCII 텍스트 파일 (파일명: "1843\_068PC03\_SequenceListing\_ascii.txt"; 크기: 33,807 바이트; 및 생성일: 2012년 10월 10일) 형태의 전자적으로 제출된 서열 목록의 내용은 그 전체 내용이 본원에 참고로 포함된다.

**배경 기술**

[0003] CD100으로도 공지된 세마포린 4D(Semaphorin 4D; SEMA4D)는 세마포린 유전자 패밀리에 속하는 막관통 단백질이다(예를 들어, 서열 번호 1(인간); 서열 번호 2(쥐과)). SEMA4D는 세포 표면 상에서 동종이량체(homodimer)로서 발현되지만, 세포 활성화시에 SEMA4D는 단백질 분해적 절단을 통하여 세포 표면으로부터 방출되어 상기 단백질의 가용성 형태인 sSEMA4D를 생성할 수 있는데, 이것도 생물학적 활성을 갖는다. 문헌[Suzuki et al., Nature

Rev. Immunol. 3:159-167 (2003)]; 문헌[Kikutani et al., Nature Immunol. 9: 17-23 (2008)]을 참조한다.

[0004] SEMA4D는 비장, 흉선 및 림프절을 포함하는 림프계 기관, 및 비림프계 기관, 예컨대 뇌, 심장 및 신장에서 고수준으로 발현된다. 림프계 기관에 있어서, SEMA4D는 휴면 T 세포 상에서 풍부하게 발현되지만, 휴면 B 세포 및 항원 제시 세포(APC), 예컨대 수지상 세포(DC) 상에서는 단지 약하게 발현된다. 그러나 그의 발현은 다양한 면역 자극에 의한 활성화 후에는 이들 세포에서 상향조절된다. 면역 세포로부터의 가용성 SEMA4D의 방출이 세포 활성화에 의해 또한 증가된다.

[0005] SEMA4D는 신경 퇴행 질환, 자가면역 질환, 탈수초성 질환, 및 특정한 암의 발병에 연루되었다. 혈관 신생에서의 SEMA4D의, 그의 수용체, 예를 들어, 플렉신(Plexin)-B1을 통한 신호전달의 역할은 잘 인식되어 있지만, 혈뇌 장벽(BBB)에 대한 SEMA4D 신호전달의 영향은 여전히 명확하지 않다. 이는, BBB의 투과성의 변화가 뇌의 조직 및 기능에 심원한 영향을 주기 때문에 중요하다. 따라서, BBB의 파괴의 결과로서 생기는 신경염증성 장애의 치료제, 특히 BBB의 파괴를 저해하거나, 억제하거나, 예방하거나, 역전시키거나 늦추는 치료제가 여전히 필요하다.

**발명의 내용**

[0006] 혈뇌 장벽 투과성을 조정하기 위하여 세마포린-4d 결합 분자를 사용하는 방법이 본원에 개시된다. SEMA4D가 BBB의 완전성(integrity)을 손상시킴으로써 그 투과성을 증가시킬 수 있음을 입증하는 증거가 제시된다. 본원에 예시된 본 발명의 측면에 따르면, 신경염증성 장애를 갖는 대상체에 있어서 혈뇌 장벽 투과성을 감소시키는 방법으로서, 세마포린-4D(SEMA4D)에 특이적으로 결합하는 단리된 결합 분자의 유효량을 대상체에게 투여함으로써 대상체에 있어서 혈뇌 장벽 투과성을 감소시키는 단계를 포함하는 방법이 제공된다.

[0007] 본원에 예시된 측면에 따르면, 신경염증성 장애를 갖는 대상체에 있어서 클라우딘(Claudin)-5 발현을 유지하거나 증가시키는 방법으로서, 세마포린-4D(SEMA4D)에 특이적으로 결합하는 단리된 결합 분자의 유효량을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는 방법이 제공되며, 여기서, 상기 결합 분자는 대상체에 있어서 클라우딘-5 발현을 유지하거나 증가시킨다.

[0008] 본원에 예시된 측면에 따르면, 신경염증성 장애를 갖는 대상체에 있어서 혈뇌 장벽 투과성을 감소시키는 방법으로서, 세마포린 4D(SEMA4D)와 SEMA4D 수용체와의 상호작용을 특이적으로 저해하는 단리된 결합 분자의 유효량을 대상체에게 투여함으로써 대상체에 있어서 혈뇌 장벽 투과성을 감소시키는 단계를 포함하는 방법이 제공된다.

[0009] 본원에 예시된 측면에 따르면, 신경염증성 장애를 갖는 대상체를 치료하는 방법으로서, 세마포린 4D(SEMA4D)와 SEMA4D 수용체와의 상호작용을 특이적으로 저해하는 단리된 결합 분자의 유효량을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는 방법이 제공되며, 여기서, 상기 결합 분자는 혈뇌 장벽 투과성을 감소시킴으로써 대상체를 치료한다.

[0010] 본원에 예시된 측면에 따르면, 신경염증성 장애를 갖는 대상체에 있어서 혈뇌 장벽 투과성을 감소시키는 방법으로서, SEMA4D에 특이적으로 결합하는 단리된 결합 분자의 유효량을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는 방법이 제공되며, 여기서, 상기 결합 분자는 VX 15/2503 또는 67로 이루어진 군으로부터 선택되는 기준 단클론 항체가 SEMA4D에 특이적으로 결합하는 것을 경쟁적으로 저해한다.

[0011] 본원에 예시된 측면에 따르면, 신경염증성 장애를 갖는 대상체를 치료하는 방법으로서, 세마포린-4D(SEMA4D)에 특이적으로 결합하는 단리된 결합 분자 및 플렉신-B1에 특이적으로 결합하는 단리된 결합 분자의 유효량을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는 방법이 제공되며, 여기서, SEMA4D 결합 분자 및 플렉신-B1 결합 분자는 혈뇌 장벽의 투과성을 감소시킴으로써 대상체를 치료한다.

[0012] 본원에 예시된 측면에 따르면, 신경염증성 장애를 갖는 대상체를 치료하는 방법으로서, 세마포린 4D(SEMA4D)와 SEMA4D 수용체와의 상호작용의 저해제의 유효량을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는 방법이 제공되며, 여기서, 상기 저해제는 혈뇌 장벽 투과성을 감소시킴으로써 대상체를 치료한다.

**도면의 간단한 설명**

- [0013] 도 1: 실시예에 기술된 동력학적 시험관내 BBB("DIV-BBB") 실험 프로토콜의 개략도.
- 도 2: 재조합 SEMA4D(0.05, 0.5, 5 또는 50 µg/mL) 및 VX15/2503 항체("VX15")의 존재 하에서 경내피세포 전기저항(TEER)에 반영되는 바와 같이, BBB 완전성의 측정을 나타내는 시험관내 DIV-BBB 모델.
- 도 3: BBB의 형성, 재조합 SEMA4D(0.5, 5 또는 50 µg/mL)의 존재 하에서의 BBB의 파괴, 및 VX15/2503 항체

("VX15")의 존재 하에서의(그러나, 이소타입 대조구("Iso")는 아님) BBB의 복구 동안 경내피세포 전기 저항(TEER)에 반영되는 바와 같이, BBB 완전성의 측정을 나타내는 시험관내 DIV-BBB 모델.

도 4: BBB의 형성, 0.25, 2.5, 또는 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 대조 C35 항원("CTRL") 또는 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 재조합 SEMA4D의 존재 하에서의 BBB의 파괴 및 VX15/2503 항체("VX15")의 존재 하에서의 BBB의 복구 동안 경내피세포 전기 저항(TEER)에 반영되는 바와 같이, BBB 완전성의 측정을 나타내는 시험관내 DIV-BBB 모델.

도 5: BBB의 형성, 재조합 SEMA4D(50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )의 존재 하에서의 BBB의 파괴 및 VX15/2503 항체("VX15"), 항-플렉신-B1 항체("항-PLXNB1")의 존재 하에서의(그러나, 이소타입 대조구("Iso")는 아님) BBB의 복구 동안 경내피세포 전기 저항(TEER)에 반영되는 바와 같이, BBB 완전성의 측정을 나타내는 시험관내 DIV-BBB 모델.

도 6: BBB의 형성, 활성화된 PBMC( $10^6$  개/ml) 및 유동 중단의 존재 하에서의 BBB의 파괴, 및 VX15/2503 항체 또는 이소타입 대조 IgG의 존재 하에서의 BBB의 복구 동안 경내피세포 전기 저항(TEER)에 반영되는 바와 같이, BBB 완전성의 측정을 나타내는 시험관내 DIV-BBB 모델.

도 7a 내지 도 7c: VX15/2503 항체("항-SEMA4D") 또는 이소타입 대조구("대조 IgG")로 처리한 후 적색 염색에 의해 검출되는 바와 같이 클라우딘-5("CLN5+") 발현(도 7a, 우측 패널; 및 도 7c에서의 정량화), 및 뇌조직 내로의 피브리노겐("Fib.+") 투과(도 7a, 좌측 패널; 및 도 7b에서의 정량화)의 면역염색에 의해 반영되는 바와 같이 BBB의 완전성 또는 이의 손실을 나타내는 생체내 EAE 모델로부터의 결과.

도 8: 일차 마우스 중추 신경계(CNS) 내피 배양물에서 VEGF-A 양성 대조구와 비교하여 핵심 내피 밀착 결합부 단백질 클라우딘-5("CLN-5")의 발현에 대한 증가하는 농도의 재조합 SEMA4D(1 ng/ml, 10 ng/ml 및 100 ng/ml)의 영향을 나타내는 면역블롯(immunoblot) 결과.

**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

- [0014] I. 정의
- [0015] 단수형("a" 또는 "an") 엔티티(entity)의 용어는 하나 이상의 그 엔티티를 나타냄이 주지되어야 하며, 예를 들어, "항-SEMA4D 항체"는 하나 이상의 항-SEMA4D 항체를 나타내는 것으로 이해된다. 이와 같이, "하나", "하나 이상" 및 "적어도 하나"라는 용어는 본원에서 상호교환가능하게 사용될 수 있다.
- [0016] "혈뇌 장벽" 및 "BBB"라는 용어는 상호교환가능하게 사용됨이 주지되어야 한다.
- [0017] 본원에서 사용될 때, "혈뇌 장벽 파괴", "혈뇌 장벽 붕괴", "혈뇌 장벽의 파괴" 또는 "혈뇌 장벽의 붕괴"와 같이, BBB와 관련된 "파괴" 또는 "붕괴"라는 용어는 혈뇌 장벽 투과성의 증가를 나타내거나, BBB의 인간화된 동력학적 시험관내 모델인 "DIV-BBB"의 경우, 경내피세포 전기 저항(TEER)의 감소를 나타낸다. 문헌[McCallister et al., Brain Res. 904:20-30 (2001)]; 문헌[Santaguida et al., Brain Res. 1109: 1-13 (2006)]; 및 문헌[Cucullo et al., Epilepsia 48:505-16 (2007)]은 TEER과 DIV-BBB 투과성 사이에 직접적인 (역의) 관계가 있음을 보여주었다. 게다가, 혈뇌 장벽의 투과성의 증가 또는 전기 저항의 감소는 BBB 상에 존재하는 내피 세포의 수, 밀도 및/또는 농도의 감소; 또는 BBB를 형성하는 정상 세포와 내피 세포 사이의 또는 내피 세포들간의 또는 정상세포들간의 상호작용 또는 형태의 변화의 결과일 수 있다.
- [0018] 본원에서 사용될 때, "혈뇌 장벽 복구" 또는 "혈뇌 장벽의 복구"와 같은 BBB와 관련된 "복구"라는 용어는 혈뇌 장벽의 투과성의 감소, 또는 BBB의 인간화된 동력학적 시험관내 모델인 DIV-BBB의 경우 경내피세포 전기 저항의 증가를 나타낸다.
- [0019] 본원에서 사용될 때, "신경염증성 장애"라는 용어는 중추 신경계(CNS) 염증성 장애, 신경퇴행성 장애, 중추 신경계의 자가면역 장애, 마이엘린 장애 또는 올리고덴드로사이트(oligodendrocyte)에 영향을 주는 질환, 또는 중추 신경계의 외상 후 마이엘린 장애를 나타낸다. 신경염증성 장애는 흔히 신경퇴행성 장애이기도 함이 주지되어야 한다. 그러나, 명확한 신경염증의 부재 하에서 신경퇴행성 장애가 존재하는 것이 가능하다. 이는, 예를 들어 후기 이차적 진행성 다발성 경화증에서 그러하다.
- [0020] "치료적 유효량"이라는 용어는 대상체 또는 포유류에서 질환 또는 장애를 "치료"하기에 유효한 항체, 폴리펩티드, 폴리뉴클레오티드, 작은 유기 분자, 또는 다른 약물의 양을 나타낸다. 신경염증성 장애의 경우에, 치료적 유효량의 약물은 BBB의 투과성을 감소시키거나; BBB 투과성의 증가를 감소시키거나, 지연시키거나 증지시키거나; BBB의 투과성 증가를 저해하거나, 예를 들어, 억제하거나, 지연시키거나, 방지하거나, 증지시키거나, 역전시키거나; BBB 상에 존재하는 내피 세포의 수, 밀도 및/또는 농도를 증가시키거나; 내피 세포의 형태

또는 기능을 변화시키거나; BBB를 형성하는 성상 세포와 내피 세포 사이의 또는 내피 세포들간의 또는 성상 세포들간의 상호작용을 변화시키거나; BBB 투과성 증가와 결부된 증상들 중 하나 이상, 예를 들어 신경염증성 장애를 어느 정도 경감시키고/시키거나; 이환율 및 사망률을 감소시키거나; 생활의 질을 개선시킬 수 있거나; 또는 이러한 효과들의 조합일 수 있다.

[0021] "치료하는" 또는 "치료" 또는 "치료하기 위한" 또는 "완화시키는" 또는 "완화시키기 위한"과 같은 용어는 1) 진단된 병리학적 병태 또는 장애의 증상을 치유하고/하거나, 늦추고/늦추거나, 감소시키고/시키거나, 진단된 병리학적 병태 또는 장애의 진행을 역전시키고/역전시키거나 정지시키는 치료적 조치 및 2) 표적화된 병리학적 병태 또는 장애의 발병을 예방하고/하거나 늦추는 예방적 또는 방지적 조치 둘 모두를 나타낸다. 따라서, 치료를 필요로 하는 이들은 이미 그 장애를 앓고 있는 이들; 그 장애에 걸리기 쉬운 이들; 및 그 장애가 예방될 이들을 포함한다. 유의한 또는 요망되는 임상 결과는, 검출가능하든지 검출가능하지 않든지 간에, 증상의 완화, 질환 정도의 축소, 안정화된(즉, 악화되지 않는) 상태의 질환, 질환 진행의 지연 또는 늦춤, 질환 상태의 개선 또는 경감, 및 관해(부분적이든지 전적이든지 간에)를 포함하지만, 이로 한정되는 것은 아니다. 또한 "치료"는, 치료를 받지 않을 경우의 예상되는 생존성과 비교하여 연장된 생존성을 의미할 수 있다. 치료를 필요로 하는 이들은 이미 그 병태 또는 장애에 걸린 이들과, 이외에도 그 병태 또는 장애에 걸리기 쉬운 이들 또는 그 병태 또는 장애가 예방되어야 할 이들을 포함한다.

[0022] "대상체" 또는 "개체" 또는 "동물" 또는 "환자" 또는 "포유류"는 진단, 예단 또는 치료법이 요망되는 임의의 대상체, 특히 포유류 대상체를 의미한다. 포유류 대상체는 인간, 가축, 농장 동물, 및 동물원, 스포츠 또는 애완 동물, 예컨대, 개, 고양이, 기니피그, 토끼, 래트, 마우스, 말, 축우, 암소, 곰 등을 포함한다.

[0023] 본원에서 사용될 때, "항-SEMA4D 항체 투여의 이득을 보는 대상체" 및 "치료를 필요로 하는 동물"과 같은 어구는 예를 들어 SEMA4D 폴리펩티드의 검출(예를 들어, 진단 절차를 위한 것임)에 사용되는 항-SEMA4D 항체 또는 다른 SEMA4D 결합 분자의 투여 및/또는 항-SEMA4D 항체 또는 다른 SEMA4D 결합 분자를 이용한 질환의 치료, 즉, 질환의 경감 또는 예방에서 이득을 보는 대상체, 예컨대 포유류 대상체를 포함한다.

[0024] 본 발명의 "결합 분자" 또는 "항원 결합 분자"는 그의 가장 넓은 의미에서, 항원 결정기에 특이적으로 결합하는 분자를 나타낸다. 일 실시 양태에서, 결합 분자는 SEMA4D, 예를 들어, 약 150 kDa의 막관통 SEMA4D 폴리펩티드 또는 약 120 kDa의 가용성 SEMA4D 폴리펩티드(일반적으로 sSEMA4D로 지칭됨)에 특이적으로 결합된다. 또 다른 실시 양태에서, 본 발명의 결합 분자는 항체 또는 이의 항원 결합 단편이다. 또 다른 실시 양태에서, 본 발명의 결합 분자는 항체 분자의 적어도 하나의 중쇄 또는 경쇄 CDR을 포함한다. 또 다른 실시 양태에서, 본 발명의 결합 분자는 하나 이상의 항체 분자로부터의 2개 이상의 CDR을 포함한다. 또 다른 실시 양태에서, 본 발명의 결합 분자는 하나 이상의 항체 분자로부터의 3개 이상의 CDR을 포함한다. 또 다른 실시 양태에서, 본 발명의 결합 분자는 하나 이상의 항체 분자로부터의 4개 이상의 CDR을 포함한다. 또 다른 실시 양태에서, 본 발명의 결합 분자는 하나 이상의 항체 분자로부터의 5개 이상의 CDR을 포함한다. 또 다른 실시 양태에서, 본 발명의 결합 분자는 하나 이상의 항체 분자로부터의 6개 이상의 CDR을 포함한다.

[0025] 본 출원은 신경염증성 장애(예를 들어, 다발성 경화증, 근위축성 측삭 경화증, 간질, 알츠하이머병, 파킨슨병, 수막염, 뇌 부종, 뇌 외상, 및 뇌졸중)를 갖는 대상체에 있어서 혈뇌 장벽 투과성을 감소시키는 방법으로서, 대상체에게 항-SEMA4D 결합 분자, 항-플렉신B1 결합 분자 또는 이들의 조합을 투여하는 단계를 포함하는 방법에 관한 것이다.

[0026] 본원에서 사용될 때, "항-SEMA4D 결합 분자" 또는 "항-플렉신B1 결합 분자"는 항체, 또는 이의 항원 결합 단편, 변이체 또는 유도체를 나타낸다. 자연 발생 항체와 같은 전장 항체를 특정적으로 나타내지 않으면, "항-SEMA4D 항체" 또는 "항-플렉신B1 항체"라는 용어는 전장 항체와, 이외에도 그러한 항체의 항원 결합 단편, 변이체, 유사체 또는 유도체, 예를 들어, 자연 발생 항체 또는 면역글로불린 분자 또는 엔지니어링된 항체 분자 또는 단편(이는 항원을 유사한 방식으로 항체 분자에 결합시킴)을 포함한다.

[0027] 본원에서 사용될 때, "SEMA4D와 SEMA4D 수용체와의 상호작용의 저해제"는 "항-SEMA4D 결합 분자", "항-플렉신B1 결합 분자"와, 이외에도 SEMA4D 또는 SEMA4D 수용체의 소분자형 저해제를 나타낸다.

[0028] 본원에서 사용될 때, "인간" 또는 "완전 인간" 항체는 인간 면역글로불린의 아미노산 서열을 갖는 항체를 포함하며, 인간 면역글로불린 라이브러리로부터 또는 하나 이상의 인간 면역글로불린에 대하여 트랜스제닉(transgenic)인 동물로부터 단리된 그리고 내인성 면역글로불린을 발현하지 않는 항체를 포함하는데, 이는 아래에 그리고 예를 들어 쿠체르라파티(Kucherlapati) 등의 미국 특허 제5,939,598호에 기술된 바와 같다. 또한 "인

간" 또는 "완전 인간" 항체는 적어도 중쇄의 가변 도메인, 또는 적어도 중쇄의 가변 도메인 및 경쇄의 가변 도메인을 포함하는 항체를 포함하며, 여기서, 가변 도메인(들)은 인간 면역글로불린 가변 도메인(들)의 아미노산 서열을 갖는다.

[0029] 또한 인간" 또는 "완전 인간" 항체는, 상기에 기술된 바와 같이, 본원에 기술된 항체 분자(예를 들어, VH 영역 및/또는 VL 영역)의 변이체(유도체를 포함함)를 포함하거나, 상기 변이체로 본질적으로 이루어지거나, 상기 변이체로 이루어진 "인간" 또는 "완전 인간" 항체를 포함하며, 이 항체 또는 이의 단편은 SEMA4D 폴리펩티드 또는 이의 단편 또는 변이체에 면역특이적으로 결합된다. 당업계의 숙련자에게 공지된 표준 기술을 이용하여 인간 항-SEMA4D 항체를 코딩하는 뉴클레오티드 서열 내에 돌연변이를 도입할 수 있는데, 상기 기술은 부위 지정 돌연변이 유발 및 PCR 매개된 돌연변이 유발을 포함하지만 이로 한정되는 것은 아니며, 상기 돌연변이 유발들은 아미노산 치환을 생성한다. 바람직하게는, 변이체(유도체를 포함함)는 기준이 되는 VH 영역, VHCDR1, VHCDR2, VHCDR3, VL 영역, VLCDR1, VLCDR2, 또는 VLCDR3과 관련하여 50개 미만의 아미노산 치환, 40개 미만의 아미노산 치환, 30개 미만의 아미노산 치환, 25개 미만의 아미노산 치환, 20개 미만의 아미노산 치환, 15개 미만의 아미노산 치환, 10개 미만의 아미노산 치환, 5개 미만의 아미노산 치환, 4개 미만의 아미노산 치환, 3개 미만의 아미노산 치환, 또는 2개 미만의 아미노산 치환을 코딩한다.

[0030] 특정 실시 양태에서, 아미노산 치환은 보존적 아미노산 치환이며, 이는 하기에 추가로 논의된다. 대안적으로, 돌연변이는 코딩 서열의 전부 또는 일부를 따라서 랜덤하게, 예컨대 포화 돌연변이 유발에 의해 도입될 수 있으며, 생성된 돌연변이체를 생물학적 활성에 대하여 스크리닝하여 활성(예를 들어, SEMA4D 폴리펩티드, 예를 들어, 인간 SEMA4D, 쥐과 SEMA4D, 또는 인간 및 쥐과 둘 모두의 SEMA4D에 결합하는 능력)을 유지하는 돌연변이체를 동정할 수 있다. "인간" 또는 "완전 인간" 항체의 그러한 변이체(또는 이의 유도체)는 또한 "최적화된" 또는 "항원 결합에 대하여 최적화된" 그리고 항원에 대하여 개선된 친화성을 갖는 항체를 포함하는 인간 또는 완전 인간 항체로서 지칭될 수 있다.

[0031] "항체" 및 "면역글로불린"이라는 용어는 본원에서 상호교환가능하게 사용된다. 항체 또는 면역글로불린은 적어도 중쇄의 가변 도메인을 포함하며, 보통, 적어도 중쇄의 가변 도메인 및 경쇄의 가변 도메인을 포함한다. 척추동물 시스템에 있어서의 기본적인 면역글로불린 구조는 비교적 잘 이해되어 있다. 예를 들어, 문헌[Harlow et al. (1988) Antibodies: A Laboratory Manual (2nd ed.; Cold Spring Harbor Laboratory Press)]을 참조한다.

[0032] 본원에서 사용될 때, "면역글로불린"이라는 용어는 생화학적으로 구별될 수 있는 다양한 광범위한 클래스의 폴리펩티드를 포함한다. 당업계의 숙련자라면 중쇄가 감마, 뮤, 알파, 델타, 또는 엡실론, ( $\gamma$ ,  $\mu$ ,  $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ )으로 분류되며, 이때 이들 사이에는 일부 하위 클래스(subclass)(예를 들어,  $\gamma 1-\gamma 4$ )가 있음을 안다. 항체의 "클래스"를 각각 IgG, IgM, IgA IgG, 또는 IgE로 결정하는 것이 이 사슬의 성질이다. 면역글로불린 하위 클래스(이소타입), 예를 들어, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 등은 잘 특성화되어 있으며, 기능 분화를 부여하는 것으로 공지되어 있다. 이들 클래스 및 이소타입 각각의 변형된 버전은 본 발명의 개시 내용을 고려하면 숙련자가 쉽게 분간할 수 있으며, 따라서 본 발명의 범주 이내이다. 모든 면역글로불린 클래스는 명확하게 본 발명의 범주 이내이며, 하기 논의는 일반적으로 IgG 클래스의 면역글로불린 분자에 관한 것이다. IgG와 관련하여, 표준 면역글로불린 분자는 대략 23,000 달톤의 분자량의 2개의 동일한 경쇄 폴리펩티드, 및 53,000-70,000의 분자량의 2개의 동일한 중쇄 폴리펩티드를 포함한다. 상기 4개의 사슬은 전형적으로 "Y"의 배열로 디설피드 결합에 의해 연결되며, 여기서, 경쇄는 "Y"의 마우스(mouth)에서 출발하는 중쇄를 브래킷(bracket)한다.

[0033] 경쇄는 카파 또는 람다( $\kappa$ ,  $\lambda$ ) 중 어느 하나로 분류된다. 각각의 중쇄 클래스는 카파 또는 람다 경쇄 중 어느 하나와 결합될 수 있다. 일반적으로, 경쇄 및 중쇄는 서로에게 공유 결합되며, 2개의 중쇄들의 "테일(tail)" 부분은 면역글로불린이 하이브리도마(hybridoma), B 세포 또는 유전자 엔지니어링된 숙주 세포 중 어느 하나에 의해 생성될 때 공유적 디설피드 결합 또는 비공유적 결합에 의해 서로에게 결합된다. 중쇄에 있어서, 그 아미노산 서열은 Y 배열의 포크형(forked) 말단의 N 말단으로부터 각각의 사슬의 기저부의 C 말단으로 러닝한다(run).

[0034] 경쇄 및 중쇄 둘 모두는 구조적 및 기능적 상동의 영역으로 나눈다. "불변" 및 "가변"이라는 용어는 기능적으로 사용된다. 이와 관련하여, 경쇄(VL 또는 VK) 및 중쇄(VH) 부분의 가변 도메인이 항원의 인식 및 특이성을 결정함이 인정된다. 역으로, 경쇄(CL) 및 중쇄(CH1, CH2 또는 CH3)의 불변 도메인은 중요한 생물학적 특성, 예컨대 분비성, 경태반적 이동성, Fc 수용체 결합성, 보체 결합성 등을 부여한다. 통상적으로, 불변 영역 도메인들의 넘버링은 이들이 항체의 항원 결합 부위 또는 아미노 말단으로부터 더욱 원위로 됨에 따라 증가한다. N 말단 부분은 가변 영역이며, C 말단 부분에는 불변 영역이 있고; CH3 및 CL 도메인은 실제로 각각 중쇄 및 경쇄의 카르복시 말단을 포함한다.

[0035] 상기에 나타낸 바와 같이, 가변 영역은 항체가 항원 상의 에피토프를 선택적으로 인식하여 상기 에피토프에 특이적으로 결합하게 한다. 즉, 항체의 VL 도메인 및 VH 도메인, 또는 이들 가변 도메인 내의 상보성 결정 영역(CDR)의 하위 세트는 조합되어 3차원 항원 결합 부위를 규정하는 가변 영역을 형성한다. 이러한 4원 항체 구조체는 Y의 각각의 아암(arm)의 말단에 존재하는 항원 결합 부위를 형성한다. 더 구체적으로, 항원 결합 부위는 VH 및 VL 사슬 각각에서의 3개의 CDR에 의해 규정된다. 몇몇 예에서, 예를 들어, 낙타과 종으로부터 유래된 특정한 면역글로불린 분자 또는 전 면역글로불린 분자인 낙타과 면역글로불린을 기반으로 하여 엔지니어링된 것은 경쇄를 포함하지 않고서 단지 중쇄로 이루어질 수 있다. 예를 들어, 문헌[Hamers-Casterman et al., Nature 363:446-448 (1993)]을 참조한다.

[0036] 자연 발생 항체에 있어서, 각각의 항원 결합 도메인에 존재하는 6개의 "상보성 결정 영역" 또는 "CDR"은 항체가 수성 환경에서 그의 3차원 배열을 취함에 따라 항원 결합 도메인이 형성되도록 특이적으로 위치화된 아미노산들의 짧은 비연접 서열이다. "프레임워크" 영역으로 칭해지는, 항원 결합 도메인 내의 아미노산들의 나머지는 더욱 적은 분자간 가변성을 나타낸다. 프레임워크 영역들은 대부분 β-시트 배좌를 채용하며, CDR은 상기 β-시트 구조를 연결하는, 그리고 몇몇 경우에는 상기 β-시트 구조의 일부를 형성하는 루프를 형성한다. 따라서, 프레임워크 영역은 사슬간의 비공유적 상호작용에 의해 올바른 배향으로 CDR들을 위치화하는 스캐폴드를 형성하는 작용을 한다. 위치화된 CDR들에 의해 형성된 항원 결합 도메인은 면역반응성 항원 상의 에피토프에 대하여 상보적인 표면을 규정한다. 이러한 상보성 표면은 항체가 그의 동족(cognate) 에피토프에 비공유적으로 결합하는 것을 촉진한다. 각각 CDR 및 프레임워크 영역을 포함하는 아미노산은 당업계의 숙련자에 의해 임의의 주어진 중쇄 및 경쇄 가변 도메인에 대하여 쉽게 동정될 수 있으며, 그 이유는 상기 아미노산이 정확하게 규정되었기 때문이다(하기 참조).

[0037] 당업계에서 사용되고/되거나 허용되는 용어의 2가지 이상의 정의가 있는 경우, 본원에서 사용되는 용어의 정의는, 명백하게 반대로 진술되지 않으면, 모든 그러한 의미를 포함하는 것으로 의도된다. 특정한 예로는 둘 모두의 중쇄 및 경쇄 폴리펩티드의 가변 영역 내에서 발견되는 비연접 항원 조합 부위를 기술하기 위한 "상보성 결정 영역"("CDR")이라는 용어의 사용이 있다. 이 특정 영역은 본원에 참고로 포함된 문헌[Kabat et al. (1983) U.S. Dept. of Health and Human Services, "Sequences of Proteins of Immunological Interest" and by Chothia and Lesk, J Mol. Biol. 196:901-917 (1987)]에 기술되어 있는데, 여기서, 정의는 서로에 대하여 비교될 때 중첩 아미노산 잔기들 또는 아미노산 잔기들의 하위 세트를 포함한다. 그럼에도 불구하고, 항체의 CDR 또는 이의 변이체를 칭하기 위한 어느 하나의 정의의 적용은 본원에서 정의되고 사용되는 용어의 범주 이내인 것으로 의도된다. 상기에 인용된 참고 문헌들 각각에 의해 정의된 CDR을 포함하는 적절한 아미노산 잔기는 비교로서 하기 표 1에 개시되어 있다. 특정 CDR을 포함하는 정확한 잔기의 번호들은 CDR의 서열 및 크기에 따라 달라진다. 당업계의 숙련자라면 항체의 가변 영역 아미노산 서열이 주어질 경우 어느 잔기들이 특정 CDR에 포함되는지를 일상적으로 결정할 수 있다.

**표 1**

**CDR 정의<sup>1</sup>**

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

<sup>1</sup> 표 1 내의 모든 CDR 정의의 넘버링은 카바트 등에 의해 개시된 넘버링 협약에 따른 것임(하기 참조)

[0038]

[0039] 카바트 등은 또한 임의의 항체에 적용가능한 가변 도메인 서열의 넘버링 시스템을 정의하였다. 당업계의 숙련자는 이러한 "카바트 넘버링" 시스템을 임의의 가변 도메인 서열에 분명히 할당할 수 있으며, 이 때 상기 서열 그 자체를 넘어서는 임의의 실험 데이터에의 의존은 없다. 본원에서 사용될 때, "카바트 넘버링"은 문헌[Kabat et al. (1983) U.S. Dept. of Health and Human Services, "Sequence of Proteins of Immunological Interest"]에 개시된 넘버링 시스템을 나타낸다. 달리 특정되지 않으면, 본 발명의 항-SEMA4D 항체 또는 이의 항원 결합

단편, 변이체 또는 유도체에서의 특정 아미노산 잔기 위치의 넘버링에 대한 언급은 카바트 넘버링 시스템에 따른 것이다.

[0040] 본 발명의 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 변이체 또는 유도체는 다클론 항체, 단클론 항체, 하나 이상의 아암이 SEMA4D에 대하여 특이적인 다중특이성 및 2특이성 항체, 인간, 인간화, 영장류화, 또는 키메라 항체, 단쇄 항체, 에피토프 결합 단편, 예를 들어, Fab, Fab' 및 F(ab')<sub>2</sub>, Fd, Fvs, 단쇄 Fvs(scFv), 디술퍼드 결합된 Fvs(sdFv), VL 또는 VH 도메인 중 어느 하나를 포함하는 단편, Fab 발현 라이브러리에 의해 생성된 단편, 및 항-이디오타입(idiotypic)(항-Id) 항체(예를 들어, 본원에 개시된 항-SEMA4D 항체에 대한 항-Id 항체를 포함함)를 포함하지만, 이로 한정되는 것은 아니다. ScFv 분자는 당업계에서 공지되어 있으며, 예를 들어 미국 특허 제 5,892,019호에 기술되어 있다. 본 발명의 면역글로불린 또는 항체 분자는 임의의 타입(예를 들어, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA, 및 IgY), 클래스(예를 들어, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, 및 IgA2 등) 또는 면역글로불린 분자의 하위 클래스일 수 있다.

[0041] 본원에서 사용될 때, "중쇄 부분"이라는 용어는 면역글로불린 중쇄로부터 유래된 아미노산 서열을 포함한다. 특정 실시 양태에서, 중쇄 부분을 포함하는 폴리펩티드는 VH 도메인, CH1 도메인, 힌지(hinge)(예를 들어, 상부, 중간 및/또는 하부 힌지 영역) 도메인, CH2 도메인, CH3 도메인, 또는 이들의 변이체 또는 단편 중 하나 이상을 포함한다. 예를 들어, 본 발명에서 사용하기 위한 결합 폴리펩티드는 CH1 도메인을 포함하는 폴리펩티드 사슬; CH1 도메인, 적어도 일부분의 힌지 도메인, 및 CH2 도메인을 포함하는 폴리펩티드 사슬; CH1 도메인 및 CH3 도메인을 포함하는 폴리펩티드 사슬; CH1 도메인, 적어도 일부분의 힌지 도메인, 및 CH3 도메인을 포함하는 폴리펩티드 사슬; 또는 CH1 도메인, 적어도 일부분의 힌지 도메인, CH2 도메인, 및 CH3 도메인을 포함하는 폴리펩티드 사슬을 포함할 수 있다. 또 다른 실시 양태에서, 본 발명의 폴리펩티드는 CH3 도메인을 포함하는 폴리펩티드 사슬을 포함한다. 또한, 본 발명에서 사용하기 위한 결합 폴리펩티드에는 CH2 도메인의 적어도 일부분(예를 들어, 전부의 또는 일부의 CH2 도메인)이 결합될 수 있다. 상기에 개시된 바와 같이, 당업계의 숙련자라면 이들 도메인(예를 들어, 중쇄 부분)이 자연 발생 면역글로불린 분자로부터 아미노산 서열 면에서 달라지도록 변형될 수 있음을 이해한다.

[0042] 본원에 개시된 특정한 항-SEMA4D 항체, 또는 이의 항원 결합 단편, 변이체, 또는 유도체에서, 다량체의 하나의 폴리펩티드 사슬의 중쇄 부분들은 다량체의 제2 폴리펩티드 사슬 상의 것과 동일하다. 대안적으로, 본 발명의 중쇄 부분 함유 단량체들은 동일하지 않다. 예를 들어, 각각의 단량체는 예를 들어 2특이성 항체를 형성하는 상이한 표적 결합 부위를 포함할 수 있다.

[0043] 본원에 개시된 방법에서 사용하기 위한 결합 분자의 중쇄 부분들은 상이한 면역글로불린 분자들로부터 유래될 수 있다. 예를 들어, 폴리펩티드의 중쇄 부분은 IgG1 분자로부터 유래된 CH1 도메인 및 IgG3 분자로부터 유래된 힌지 영역을 포함할 수 있다. 또 다른 예에서, 중쇄 부분은 부분적으로 IgG1 분자로부터 그리고 부분적으로 IgG3 분자로부터 유래된 힌지 영역을 포함할 수 있다. 또 다른 예에서, 중쇄 부분은 부분적으로 IgG1 분자로부터 그리고 부분적으로 IgG4 분자로부터 유래된 키메라 힌지를 포함할 수 있다.

[0044] 본원에서 사용될 때, "경쇄 부분"이라는 용어는 면역글로불린 경쇄, 예를 들어 카파 또는 람다 경쇄로부터 유래된 아미노산 서열을 포함한다. 바람직하게는, 경쇄 부분은 VL 또는 CL 도메인 중 하나 이상을 포함한다.

[0045] 본원에 개시된 항-SEMA4D 항체, 또는 이의 항원 결합 단편, 변이체, 또는 유도체는 이들이 인식하거나 특이적으로 결합하는 항원, 예를 들어 본원에 개시된 표적 폴리펩티드(예를 들어, SEMA4D)의 부분(들) 또는 에피토프(들) 면에서 기술되거나 특정될 수 있다. 항체의 항원 결합 도메인과 특이적으로 상호작용하는 표적 폴리펩티드의 부분은 "에피토프" 또는 "항원 결정기"이다. 표적 폴리펩티드는 단일 에피토프를 포함할 수 있지만, 전형적으로 2개 이상의 에피토프를 포함하며, 항원의 크기, 배좌, 및 타입에 따라 다수의 에피토프를 포함할 수 있다. 더욱이, "표적 폴리펩티드 상의 에피토프"는 비폴리펩티드 요소일 수 있거나 비폴리펩티드 요소를 포함할 수 있으며, 예를 들어 에피토프는 탄수화물 측쇄를 포함할 수 있음이 주지되어야 한다.

[0046] 항체에 있어서의 펩티드 또는 폴리펩티드 에피토프의 최소 크기는 약 4 내지 5개 아미노산인 것으로 생각된다. 펩티드 또는 폴리펩티드 에피토프는 바람직하게는 7개 이상, 더 바람직하게는 9개 이상, 가장 바람직하게는 적어도 약 15 내지 약 30개 아미노산을 함유한다. CDR은 3차 형태의 항원성 펩티드 또는 폴리펩티드를 인식할 수 있기 때문에, 에피토프를 포함하는 아미노산들은 연결될 필요는 없으며, 몇몇 경우에, 심지어 동일 펩티드 사슬 상에 존재하지 않을 수 있다. 본 발명의 항-SEMA4D 항체에 의해 인식되는 펩티드 또는 폴리펩티드 에피토프는 적어도 4개, 적어도 5개, 적어도 6개, 적어도 7개, 더 바람직하게는 적어도 8개, 적어도 9개, 적어도 10개, 적어도 15개, 적어도 20개, 적어도 25개, 또는 약 15 내지 약 30개의 연결 또는 비연접 아미노산의 SEMA4D의 서열

을 함유할 수 있다.

- [0047] "특이적으로 결합하다"라는 것은 일반적으로 항체가 그의 항원 결합 도메인을 통하여 에피토프에 결합하며 상기 결합은 항원 결합 도메인과 에피토프 사이의 일부 상보성을 수반함을 의미한다. 이 정의에 따르면, 항체는 그의 항원 결합 도메인을 통하여, 상기 항체가 관련없는 랜덤 에피토프에 결합하는 것보다 더 쉽게 그 에피토프에 결합할 때 에피토프에 "특이적으로 결합한다"고 한다. "특이성"이라는 용어는 본원에서 특정한 항체가 특정한 에피토프에 결합하는 상대적인 친화성을 정성화하기 위하여 사용된다. 예를 들어, 항체 "A"는 항체 "B"보다 주어진 에피토프에 대하여 더욱 높은 특이성을 갖는 것으로 생각될 수 있거나, 항체 "A"는 이것이 관련 에피토프 "D"에 대하여 갖는 것보다 더욱 높은 특이성으로 에피토프 "C"에 결합한다고 할 수 있다.
- [0048] "우선적으로 결합하다"라는 것은 항체가 관련 에피토프, 유사한 에피토프, 상동성 에피토프 또는 비슷한 에피토프에 결합하는 것보다 더 쉽게 소정 에피토프에 특이적으로 결합함을 의미한다. 따라서, 주어진 에피토프에 "우선적으로 결합하는" 항체는 그러한 항체가 관련 에피토프와 교차 반응할 수 있음에도 불구하고, 관련 에피토프에 결합하는 것보다 그 에피토프에 결합할 가능성이 더 크다.
- [0049] 비제한적 예로서, 항체는 이것이 제2 에피토프에 대한 항체의 해리 상수( $K_D$ )보다 더 작은 해리 상수( $K_D$ )로 제1 에피토프에 결합할 경우 제1 에피토프에 우선적으로 결합하는 것으로 간주될 수 있다. 또 다른 비제한적 예에서, 항체는 이것이 제2 에피토프에 대한 항체  $K_D$ 보다 1배 이상의 크기인 친화도로 제1 에피토프에 결합할 경우 제1 항원에 우선적으로 결합하는 것으로 간주될 수 있다. 또 다른 비제한적 예에서, 항체는 이것이 제2 에피토프에 대한 항체  $K_D$ 보다 2배 이상의 크기인 친화도로 제1 에피토프에 결합할 경우 제1 에피토프에 우선적으로 결합하는 것으로 간주될 수 있다.
- [0050] 또 다른 비제한적 예에서, 항체는 이것이 제2 에피토프에 대한 항체 오프 속도( $k(off)$ )보다 더 작은 오프 속도( $k(off)$ )로 제1 에피토프에 결합할 경우 제1 에피토프에 우선적으로 결합하는 것으로 간주될 수 있다. 또 다른 비제한적 예에서, 항체는 이것이 제2 에피토프에 대한 항체  $k(off)$ 보다 1배 이상 더 작은 크기인 친화도로 제1 에피토프에 결합할 경우 제1 에피토프에 우선적으로 결합하는 것으로 간주될 수 있다. 또 다른 비제한적 예에서, 항체는 이것이 제2 에피토프에 대한 항체  $k(off)$ 보다 2배 이상 더 작은 크기인 친화도로 제1 에피토프에 결합할 경우 제1 에피토프에 우선적으로 결합하는 것으로 간주될 수 있다. 본원에 개시된 항체 또는 항원 결합 단편, 변이체 또는 유도체는 본원에 개시된 표적 폴리펩티드(예를 들어, SEMA4D, 예를 들어, 인간 SEMA4D, 쥐과 SEMA4D, 또는 인간 및 쥐과 둘 모두의 SEMA4D) 또는 이의 단편 또는 변이체에  $5 \times 10^{-2} \text{ sec}^{-1}$ ,  $10^{-2} \text{ sec}^{-1}$ ,  $5 \times 10^{-3} \text{ sec}^{-1}$  또는  $10^{-3} \text{ sec}^{-1}$  이하의 오프 속도( $k(off)$ )로 결합한다고 할 수 있다. 더 바람직하게는, 본 발명의 항체는 본원에 개시된 표적 폴리펩티드(예를 들어, SEMA4D, 예를 들어, 인간 SEMA4D, 쥐과 SEMA4D, 또는 인간 및 쥐과 둘 모두의 SEMA4D) 또는 이의 단편 또는 변이체에  $5 \times 10^{-4} \text{ sec}^{-1}$ ,  $10^{-4} \text{ sec}^{-1}$ ,  $5 \times 10^{-5} \text{ sec}^{-1}$ , 또는  $10^{-5} \text{ sec}^{-1}$ ,  $5 \times 10^{-6} \text{ sec}^{-1}$ ,  $10^{-6} \text{ sec}^{-1}$ ,  $5 \times 10^{-7} \text{ sec}^{-1}$  또는  $10^{-7} \text{ sec}^{-1}$  이하의 오프 속도( $k(off)$ )로 결합한다고 할 수 있다.
- [0051] 본원에 개시된 항체 또는 항원 결합 단편, 변이체 또는 유도체는 본원에 개시된 표적 폴리펩티드(예를 들어, SEMA4D, 예를 들어, 인간 SEMA4D, 쥐과 SEMA4D, 또는 인간 및 쥐과 둘 모두의 SEMA4D) 또는 이의 단편 또는 변이체에  $10^3 \text{ M}^{-1} \text{ sec}^{-1}$ ,  $5 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ sec}^{-1}$ ,  $10^4 \text{ M}^{-1} \text{ sec}^{-1}$  또는  $5 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ sec}^{-1}$  이상의 온 속도( $k(on)$ )로 결합한다고 할 수 있다. 더 바람직하게는, 본 발명의 항체는 본원에 개시된 표적 폴리펩티드(예를 들어, SEMA4D, 예를 들어, 인간 SEMA4D, 쥐과 SEMA4D, 또는 인간 및 쥐과 둘 모두의 SEMA4D) 또는 이의 단편 또는 변이체에  $10^5 \text{ M}^{-1} \text{ sec}^{-1}$ ,  $5 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ sec}^{-1}$ ,  $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ sec}^{-1}$ , 또는  $5 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ sec}^{-1}$  또는  $10^7 \text{ M}^{-1} \text{ sec}^{-1}$  이상의 온 속도( $k(on)$ )로 결합한다고 할 수 있다.
- [0052] 항체는, 기준 항체가 주어진 에피토프에 결합하는 것을 이것이 어느 정도 차단하는 정도까지 주어진 에피토프에 우선적으로 결합할 경우 상기 주어진 에피토프에의 기준 항체의 결합을 경쟁적으로 저해한다고 한다. 경쟁적 저해는 당업계에 공지된 임의의 방법, 예를 들어 경쟁 ELISA 분석법에 의해 결정될 수 있다. 항체는 주어진 에피토프에의 기준 항체의 결합을 90% 이상, 80% 이상, 70% 이상, 60% 이상, 또는 50% 이상만큼 경쟁적으로 저해한다고 할 수 있다.
- [0053] 본원에서 사용될 때, "친화도"라는 용어는 개별 에피토프와 면역글로불린 분자의 CDR의 결합의 강도의 척도를 나타낸다. 예를 들어, 문헌[Harlow et al. (1988) Antibodies: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor

Laboratory Press, 2nd ed.) pages 27-28]을 참조한다. 본원에서 사용될 때, "친화력"이라는 용어는 번역글로 불린 집단과 항원 사이의 복합체의 전체 안정성, 즉, 번역글로불린 혼합물과 항원의 기능적인 조합 강도를 나타낸다. 예를 들어, 문헌[Harlow at pages 29-34]를 참조한다. 친화력은 집단 중 개별 번역글로불린 분자와 특정 에피토프와의 친화도, 및 또한 번역글로불린과 항원의 결합가(valency) 둘 모두에 관련된다. 예를 들어, 2가 단클론 항체와, 중합체와 같이 고도로 반복하는 에피토프의 구조를 갖는 항원 사이의 상호작용은 높은 친화력의 것이다.

[0054] 본 발명의 항-SEMA4D 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 변이체, 또는 유도체는 또한 그의 교차 반응성 면에서 기술되거나 특정될 수 있다. 본원에서 사용될 때, "교차 반응성"이라는 용어는 하나의 항원에 대하여 특이적인 항체가 제2 항원과 반응하는 능력으로서, 2가지의 상이한 항원성 물질들 사이의 관련성의 척도를 나타낸다. 따라서, 항체는 이것이 그의 형성을 유도한 것 이외의 에피토프에 결합할 경우 교차 반응성이다. 일반적으로 교차 반응성 에피토프는 유도 에피토프와 동일한 상보성 구조 특징부들 중 다수를 함유하며, 몇몇 경우에, 실제로 원래의 것보다 더 우수하게 피팅(fit)될 수 있다.

[0055] 예를 들어, 특정 항체는 이것이 관련된, 그러나 동일하지 않은 에피토프들, 예를 들어, (당업계에 공지된 그리고 본원에 기술된 방법을 사용하여 계산할 때) 기준 에피토프에 대하여 동일성이 95% 이상, 90% 이상, 85% 이상, 80% 이상, 75% 이상, 70% 이상, 65% 이상, 60% 이상, 55% 이상, 및 50% 이상인 에피토프들에 결합한다는 면에서 어느 정도의 교차 반응성을 갖는다. 항체는 (당업계에 공지된 그리고 본원에 기술된 방법을 사용하여 계산할 때) 95% 미만, 90% 미만, 85% 미만, 80% 미만, 75% 미만, 70% 미만, 65% 미만, 60% 미만, 55% 미만, 및 50% 미만인 에피토프들에 이것이 결합하지 않을 경우 교차 반응성이 거의 없거나 전혀 없다고 할 수 있다. 항체는 이것이 특정 에피토프의 임의의 다른 유사체, 오르토로그(ortholog) 또는 상동체에 결합하지 않을 경우, 그 에피토프에 대하여 "고도로 특이적인" 것으로 생각될 수 있다.

[0056] 또한, 본 발명의 항-SEMA4D 결합 분자, 예를 들어, 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 변이체 또는 유도체는, 본 발명의 폴리펩티드, 예를 들어 SEMA4D, 예를 들어, 인간 SEMA4D, 쥐과 SEMA4D, 또는 인간 및 쥐과 둘 모두의 SEMA4D에 대한 그의 결합 친화도 면에서 기술되거나 특정될 수 있다. 바람직한 결합 친화도는 해리 상수 또는 Kd가  $5 \times 10^{-2}$  M,  $10^{-2}$  M,  $5 \times 10^{-3}$  M,  $10^{-3}$  M,  $5 \times 10^{-4}$  M,  $10^{-4}$  M,  $5 \times 10^{-5}$  M,  $10^{-5}$  M,  $5 \times 10^{-6}$  M,  $10^{-6}$  M,  $5 \times 10^{-7}$  M,  $10^{-7}$  M,  $5 \times 10^{-8}$  M,  $10^{-8}$  M,  $5 \times 10^{-9}$  M,  $10^{-9}$  M,  $5 \times 10^{-10}$  M,  $10^{-10}$  M,  $5 \times 10^{-11}$  M,  $10^{-11}$  M,  $5 \times 10^{-12}$  M,  $10^{-12}$  M,  $5 \times 10^{-13}$  M,  $10^{-13}$  M,  $5 \times 10^{-14}$  M,  $10^{-14}$  M,  $5 \times 10^{-15}$  M, 또는  $10^{-15}$  M 미만인 것을 포함한다. 특정 실시 양태에서, 본 발명의 항-SEMA4D 결합 분자, 예를 들어, 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 인간 SEMA4D에 약  $5 \times 10^{-9}$  내지 약  $6 \times 10^{-9}$ 의 Kd로 결합한다. 또 다른 실시 양태에서, 본 발명의 항-SEMA4D 결합 분자, 예를 들어, 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 쥐과 SEMA4D에 약  $1 \times 10^{-9}$  내지 약  $2 \times 10^{-9}$ 의 Kd로 결합한다.

[0057] 본원에서 사용될 때, "키메라 항체"라는 용어는 면역반응성 영역 또는 부위가 제1 종으로부터 획득되거나 유래되며 불변 영역(이는 본 발명에 따르면 온전하거나, 부분적이거나 변형될 수 있음)이 제2 종으로부터 획득되는 임의의 항체를 의미하는 것으로 여겨진다. 바람직한 실시 양태에서, 표적 결합 영역 또는 부위는 비인간 소스(예를 들어, 마우스 또는 영장류)로부터의 것이며, 불변 영역은 인간 불변 영역이다.

[0058] 본원에서 사용될 때, "엔지니어링된 항체"라는 용어는 중쇄 또는 경쇄 중 어느 하나 또는 이들 둘 모두에서의 가변 도메인이 공지된 특이성의 항체로부터의 하나 이상의 CDR의 적어도 부분적인 대체에 의해, 그리고 필요할 경우 부분적 프레임워크 영역 대체 및 서열 변화에 의해 변경된 항체를 나타낸다. 프레임워크 영역이 유래되는 항체와 동일한 클래스 또는 심지어 하위 클래스의 항체로부터 CDR들이 유래될 수 있지만, CDR들은 상이한 클래스의 항체로부터 그리고 바람직하게는 상이한 종으로부터의 항체로부터 유래됨이 예견된다. 공지된 특이성의 비인간 항체로부터의 하나 이상의 "공여체" CDR들이 인간 중쇄 또는 경쇄 프레임워크 영역 내에 그래프팅된(grafted) 엔지니어링된 항체는 본원에서 "인간화 항체"로 칭해진다. CDR들 전부를 공여체 가변 도메인으로부터의 전 CDR들로 대체하여 하나의 가변 도메인의 항원 결합 능력을 또 다른 것으로 이전시키는 것이 필요하지 않을 수 있다. 오히려, 표적 결합 부위의 활성을 유지하는 데 필요한 잔기들을 이전시키는 것만이 필요할 수 있다.

[0059] 인간화 항체의 중쇄 또는 경쇄 또는 이들 둘 모두에서의 가변 도메인 내의 프레임워크 영역들은 오직 인간 기원의 잔기를 포함할 수 있음이 또한 인식되는데, 이 경우, 인간화 항체의 이들 프레임워크 영역은 "완전 인간 프레임워크 영역"으로 칭해진다(예를 들어, 그 전체가 본원에 참고로 포함된 미국 특허 공개 제2010/0285036 A1호

에 Mab 2503으로 개시된 Mab VX15/2503). 대안적으로, 공여체 가변 도메인의 프레임워크 영역(들)의 하나 이상의 잔기는 필요할 경우 인간화 항체의 중쇄 또는 경쇄 또는 이들 둘 모두에서의 가변 도메인의 인간 프레임워크 영역(들)의 상응하는 위치 내에서 엔지니어링되어 SEMA4D 항원에의 적당한 결합성을 유지하거나 또는 SEMA4D 항원에의 결합성을 향상시킬 수 있다. 따라서 이러한 방식으로 엔지니어링된 인간 프레임워크 영역은 인간 및 공여체 프레임워크 잔기의 혼합물을 포함하며, 본원에서 "부분적 인간 프레임워크 영역"으로 칭해진다.

[0060] 예를 들어, 본질적으로 항-SEMA4D 항체의 인간화는 윈터(Winter) 및 동료의 방법에 따라, 설치류 또는 돌연변이 설치류 CDR 또는 CDR 서열을 인간 항-SEMA4D 항체의 상응하는 서열로 치환함으로써 수행될 수 있다(문헌[Jones et al., Nature 527:522-525 (1986)]; 문헌[Riechmann et al., Nature 532:323-327 (1988)]; 문헌[Verhoeyen et al., Science 25 :1534-1536 (1988)]). 또한, 본원에 참고로 포함된 미국 특허 제5,225,539호; 미국 특허 제5,585,089호; 미국 특허 제5,693,761호; 미국 특허 제5,693,762호; 미국 특허 제5,859,205호를 참조한다. 생성된 인간화 항-SEMA4D 항체는 인간화 항체의 중쇄 및/또는 경쇄의 가변 도메인의 완전 인간 프레임워크 영역 내에 적어도 하나의 설치류 또는 돌연변이 설치류 CDR을 포함한다. 몇몇 예에서, 인간화 항-SEMA4D 항체의 하나 이상의 가변 도메인의 프레임워크 영역 내의 잔기는 상응하는 비인간(예를 들어, 설치류) 잔기로 대체되며(예를 들어, 미국 특허 제5,585,089호; 미국 특허 제5,693,761호; 미국 특허 제5,693,762호; 및 미국 특허 제 6,180,370호 참조), 이 경우, 생성된 인간화 항-SEMA4D 항체는 중쇄 및/또는 경쇄의 가변 도메인 내에 부분적 인간 프레임워크 영역을 포함한다.

[0061] 더욱이, 인간화 항체는 수용체 항체에서 또는 공여체 항체에서 발견되지 않는 잔기를 포함할 수 있다. 이들 변형은 (예를 들어, 요망되는 친화도를 수득하기 위하여) 추가로 항체 성능을 개량하기 위하여 이루어진다. 일반적으로, 인간화 항체는 실질적으로 적어도 1개, 그리고 전형적으로 2개의 가변 도메인 전부를 포함하며, 여기서, 전부의 또는 실질적으로 전부의 CDR은 비인간 면역글로불린의 것에 상응하며, 전부의 또는 실질적으로 전부의 프레임워크 영역은 인간 면역글로불린 서열의 것이다. 또한 인간화 항체는 임의로 적어도 일부분의 면역글로불린 불변 영역(Fc), 전형적으로 인간 면역글로불린의 것을 포함한다. 추가의 상세 사항에 대해서는 본원에 참고로 포함된 문헌[Jones et al., Nature 357:522-525 (1986)]; 문헌[Riechmann et al., Nature 552:323-329 (1988)]; 및 문헌[Presta, Curr. Op. Struct. Biol. 2:593- 596 (1992)]을 참조한다. 따라서, 그러한 "인간화" 항체는 온전한 것보다 실질적으로 더 적은 인간 가변 도메인이 비인간 종으로부터의 상응하는 서열로 치환된 항체를 포함할 수 있다. 실제로, 인간화 항체는 전형적으로 일부 CDR 잔기와, 가능하게는 일부 프레임워크 잔기가 설치류 항체에서의 유사한 부위로부터의 잔기로 치환된 인간 항체이다. 예를 들어, 미국 특허 제5,225,539호; 미국 특허 제5,585,089호; 미국 특허 제5,693,761호; 미국 특허 제5,693,762호; 미국 특허 제5,859,205호를 참조한다. 또한, 미국 특허 제6,180,370호 및 국제 특허 공개 제WO 01/27160호를 참조하는데, 여기서, 소정의 항원에 대한 친화도가 개선된 인간화 항체 및 인간화 항체의 제조 기술이 개시되어 있다.

[0062] II. 혈뇌 장벽("BBB")

[0063] 혈뇌 장벽(BBB)은 순환 혈액과 중추 신경계(CNS) 사이의 활성 계면이다. BBB는 상이한 물질들이 상기 두 구획 사이에서 자유롭게 이동하는 것을 제한하며, CNS의 항상성의 유지에 있어서 결정적인 역할을 한다. BBB는 장벽 기능 및 캐리어 기능 둘 모두를 갖는다. 장벽으로서, BBB는 세포와, 잠재적으로 독성인 또는 유해한 물질이 혈액으로부터 뇌로 이동하는 것을 제한한다. 반면에, 캐리어로서, BBB는 영양소를 뇌로 수송하고 대사 산물을 제거하는 데 책임이 있다.

[0064] BBB는 주로 하기의 3가지 성분으로 구성된다: 내피 세포, 정상 세포 및 주피 세포(pericyte). 내피 세포는 뇌 내의 혈관 및 모세관의 내표면을 덮는 연속 시트를 형성한다. (문헌[Ransohoff et al., "Three or More Routes for Leukocyte Migration Into the Central Nervous System," Nature Rev. Immun. 3:569-581 (2003)]). 내피 세포는 제IV형 콜라겐, 피브로넥틴, 라미닌 및 프로테오글리칸으로 주로 이루어진 기저막에 인접하여 위치하며, 내피 세포의 정단(apical) 영역에서 벨트 유사 구조체를 형성하는 밀착 접합부에 의해 상호연결된다. 내피 세포는, 작은 소수성 분자(O<sub>2</sub>, 호르몬, CO<sub>2</sub>)가 확산되게 하면서 미시적 물체(예를 들어, 박테리아) 및 큰 분자 또는 친수성 분자가 뇌 실질 및 뇌척수액(CSF) 내로 확산되는 것을 제한한다. 상기 장벽의 세포는 대사 산물, 예컨대 글루코스를 특정 단백질을 이용하여 상기 장벽을 가로질러서 능동적으로 수송한다.

[0065] 뇌 모세관을 형성하는 내피 세포는 체내의 다른 조직에서 발견되는 것과는 상이하다. 뇌 모세관 내피 세포는 분자가 혈액으로부터 뇌 및 CNS의 다른 부분(뇌척수액, CSF를 포함함)으로 수동적으로 확산되는 것에 대항하여 연속 벽을 형성하는 밀착 세포간 접합부에 의해 함께 연결된다. 또한 이들 세포는 다른 조직에서 모세관 벽을 가로질러서 다소 비선택적인 수송을 허용하는 포음 소포(pinocytic vesicle)를 거의 갖지 않는다는 점에서 상이하

다. 또한 결여된 것은 비제한된 통과를 허용하는, 세포들 사이에서 러닝하는 연속 갭 또는 채널이다.

- [0066] 내피 세포에 더하여, BBB는 또한 주피 세포 및 성상 세포로 구성된다. 주피 세포는 기저막 내에 위치하며, 내피 세포와 상호작용하며, 내피 증식, 혈관 신생 및 염증 과정의 조절에 있어서 중요한 역할을 한다. 성상 세포는 뇌 및 척수 내의 특징적인 별모양 아교 세포이며, 가장 풍부한 인간 뇌 세포이다. 성상 세포는 혈뇌 장벽을 형성하는 내피 세포의 생화학적 지지, 영양소의 신경 조직으로의 제공, 세포외 이온 균형의 유지, 및 외상성 상해 후 뇌 및 척수의 회복 및 반흔 과정에서의 역할을 비롯한 많은 기능을 수행한다.
- [0067] 혈뇌 장벽은 뇌 환경이 일정하게 제어되는 것을 보장하는 기능을 한다. 혈중의 다양한 물질, 예컨대 호르몬, 아미노산 및 이온의 수준은 섭식 및 운동과 같은 활동에 야기될 수 있는 빈번한 작은 변동을 겪는다(문헌 [Goldstein et al., "The Blood-Brain Barrier", *Scientific American* 255:74-83 (1986)]; 문헌[Pardridge, "Receptor-Mediated Peptide Transport Through the Blood-Brain Barrier", *Endocrin. Rev.* 7:314-330 (1986)]). 뇌가 혈뇌 장벽에 의해 혈청 조성의 이들 변화로부터 보호되지 않을 경우, 그 결과는 비제어된 신경 활동일 수 있다.
- [0068] 뇌를 혈류로부터 격리시키는 것은 완전하지 않다. 이것이 그러하다면, 뇌는 영양소 결여로 인하여 그리고 화학 물질을 신체의 나머지와 교환해야 되는 필요성 때문에 적당하게 기능하는 것이 불가능하다. 모세관 내피 세포 내의 특정 수송 시스템의 존재는 뇌가 제어된 방식으로, 정상 성장 및 기능에 요구되는 화합물들 전부를 받는 것을 보증한다. 많은 경우에, 이들 수송 시스템은 막 결부 단백질로 이루어지는데, 상기 단백질은 장벽 막을 가로질러서 선택적으로 특정 분자에 결합하여 상기 분자를 수송한다. 이들 수송 단백질은 용질 캐리어 수송체로서 공지되어 있다.
- [0069] BBB는 외래 또는 외부 분자 및 세포에 의한 손상으로부터 뇌 및 중추 신경계를 보호하는 역할을 하지만, 외래 또는 외부 분자 및 세포는 흔히 BBB를 가로지를 수 있으며, 한정된 수로, 심지어 CNS의 면역 감시와 같은 것에 유익할 수 있다. 그러나, 예를 들어 B 세포, T 세포, 백혈구 및 대식 세포와 같은 고도 활성 세포가 과도하게 BBB를 가로질러서 뇌에 도달할 때, 상기 고도 활성 세포는 뇌에 대하여 손상을 야기할 수 있다. 예를 들어, 부종, 뇌 외상, 뇌졸중 및 다발성 경화증을 앓고 있는 환자는 BBB의 파괴를 나타낸다.
- [0070] 다양한 신경염증성 장애에 대한 BBB의 영향이 연구되었다. (문헌[Zlokovic BV, "The Blood-Brain Barrier in Health and Chronic Neurodegenerative Disorders", *Neuron* 57: 178-201 (2008)]; 문헌[Zhong Z et al., "ALS-causing SOD1 mutants generate vascular changes prior to motor neuron degeneration," *Nature Neuroscience* 11(4): 420-422 (2008)]; 문헌[Hawkins BT et al., "The Blood-Brain Barrier/neurovascular Unit in Health and Disease," *Pharmacological Rev* 57 (2): 173-185 (2005)]; 문헌[Oby E et al., "The Blood-Brain Barrier and Epilepsy," *Epilepsia* 47(11): 1761-1774 (2006)]). 게다가, 염증 및 혈뇌 장벽 (BBB)(문헌[Banks and Erickson, 2010; Lochhead et al., 2010])이 수막염 (문헌[van der et al., 2004]), 뇌 부종 (문헌[Stamatovic et al., 2006]), 알츠하이머병 (문헌[Kalaria, 1992]), 파킨슨병 (문헌[Westin, J.E., et. al., "Endothelial Proliferation and Increased Blood-Brain Barrier Permeability in the Basal Ganglia in a Rat Model of 3,4-Dihydroxyphenyl-L-Alanine-Induced Dyskinesia," *The Journal of Neuroscience* 26(37): 9448-9461 (2006)]) 및 다발성 경화증 (문헌[Minagar and Alexander, 2003])과 같은 신경계 질환의 병인에 연루되어 있다는 증거가 증가하고 있다.
- [0071] 예를 들어, 다발성 경화증의 경우에, 사람이 MS "공격"을 겪고 있을 때, BBB는 척수 또는 뇌의 소정 섹션에서 파괴되어 T 림프구가 미엘린을 넘어서 미엘린을 공격하게 함이 자기 공명 영상("MRI")을 이용하여 밝혀졌는데, 상기 미엘린은 뇌 및 척수 둘 모두에 있어서 중추 신경계의 뉴런을 보호하고 절연시킨다. (문헌[Zlokovic 2008]; 문헌[Waubant E., "Biomarkers indicative of blood-brain barrier disruption in multiple sclerosis". *Disease Markers* 22 (4): 235-44 (2006)]).
- [0072] 반면에, 수막염은 뇌 및 척수를 둘러싸고 있는 막(이들 막은 수막으로 공지됨)의 염증이 있을 때 일어난다. 수막에 염증이 일어난 때, 혈뇌 장벽은 붕괴되어 염증성 세포 및 다양한 물질(독소 또는 항생제 중 어느 하나를 포함함) 둘 모두가 뇌에 들어가게 할 수 있다. (문헌[Beam, TR Jr., et al. (December 1977). "Blood, brain, and cerebrospinal fluid concentrations of several antibiotics in rabbits with intact and inflamed meninges". *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 12 (6): 710-6]).
- [0073] 이와 유사하게, 파킨슨병(PD)의 경우에, 추정 PD 독소의 흡수 또는 대사, 및 섭취된 독성 친지성 대사 산물의 신속한 제거를 매개하는 ATP 의존성 유출 펌프인수송체 P-당단백질(P-gp)의 낮은 활성으로 인한 BBB를 가로지르

는 상기 독소의 잘못된 제거는 PD의 병인에서 그 역할을 할 수 있음이 제안되었다(문헌[Kortekaas, R., Leenders, K.L., van Oostrom, J.C., Vaalburg, W., Bart, J., Willemsen, A.T., and Hendrikse, N.H. Blood-brain barrier dysfunction in parkinsonian midbrain in vivo. *Ann. Neurol.* 57, 176-179, 2005]). 신경염증은 또한 PD 환자 및 PD의 실험 모델에서 편재적으로 발견되는 것으로 보인다. 식세포 활성화, 전염증성 사이토카인의 합성 및 방출의 증가, 보체 활성화, 소교세포의 활성화 및 반응성 산소 화학종(ROS)의 방출이 기술되었다(문헌[Whitton, P.S. Inflammation as a causative factor in the aetiology of Parkinson's disease. *Br. J. Pharmacol.* 150, 963-976, 2007]).

[0074] 간질에 있어서, 연구에 의하면 일반적인 혈액 단백질, 알부민과 정상 세포 사이의 특정한 상호작용으로 인한 만성 또는 급성 발작의 트리거링(triggering)에 있어서의 혈뇌 장벽 기능의 부전(failure)이 포함되었다. 이들 발견은 급성 발작이 인공적 기작 또는 염증 기작 중 어느 하나에 의한 BBB의 붕괴의 결과임을 시사한다. (문헌 [Oby, E; et al. (2006). "The Blood-Brain Barrier and Epilepsy" (PDF). *Epilepsia* 47 (11): 1761-1774]).

[0075] 알츠하이머병(AD)에 걸린 환자에 있어서, 증거는 BBB를 가로지르는 아밀로이드 베타(A $\beta$ )의 주요 유입 수송체인 RAGE를 통하여 A $\beta$ 를 함유하는 혈장이 뇌에 들어가게 하는 데 있어서의 혈뇌 장벽의 붕괴를 가리킨다. 연구에 의하면, A $\beta$ /RAGE 상호작용에 의해 순환 A $\beta$ 가 BBB를 가로질러서 뇌 실질 내로 트랜스사이토시스(transcytosis)하여 이것이 뉴런에 결합되고, NF- $\kappa$ B 매개된 내피 활성화가 되어서 전염증성 사이토카인이 분비되고, 유착 분자가 발현되고, 뇌혈류(CBF)를 억제하는 엔도텔린-1이 생성됨이 밝혀졌다. 게다가, A $\beta$ /RAGE 상호작용은 RAGE 발현 뉴런에 대하여 산화적 손상을 생성함으로써 그리고 소교세포를 활성화시킴으로써 뉴런 사멸에 기여함이 밝혀졌다. (문헌[Zlokovic, B.V. The Blood-Brain Barrier in Health and Chronic Neurodegenerative Disorders. *Neuron* 57, 178-201, 2008]). A $\beta$ 가 BBB를 통하여 뇌 실질에서 나와서 미세혈관계 내로 잘못 유출되는 것이 AD 병인의 세팅에서 또한 발견되었으며, 이는 부분적으로는 손상된 저밀도 리포단백질 수용체 관련 단백질 1(LRP1) 기능에 기여하였다. LRP1은 A $\beta$ 의 상이한 구조적 배좌 이성체들에 결합하여 이를 수송하는, 관강에서 먼 쪽의(abluminal) BBB 막 단백질이다(문헌[Deane et al., "LRP/amyloid beta-peptide interaction mediates differential brain efflux of Abeta isoforms." *Neuron* 43, 333-344, 2004]). A $\beta$  노출은 미세혈관 내피 세포 상에서의, 클라우딘-5 및 ZO-2를 비롯한 밀착 결합부 단백질의 세포 표면 발현 패턴을 세포질 쪽으로 옮기며(문헌[Marco et al., "Amyloid  $\beta$ -peptide 1-42 alters tight junction protein distribution and expression in brain micro vessel endothelial cells." *Neurosci. Lett.* 401, 219-224, 2006]), 이들 세포의 단층의 경내피세포 전기 저항(TEER)을 심하게 손상시킨다(문헌[Gonzalez-Velasquez et al., "Soluble aggregates of the amyloid-beta protein selectively stimulate permeability in human brain microvascular endothelial monolayers." *J. Neurochem.* 107, 466-477, 2008]).

[0076] 근위축성 측삭 경화증(ALS)에 있어서, 연구는 BBB 파괴가 운동 뉴런과 상호작용하는 혈청 단백질을 누출시켜 ROS(반응성 산소 화학종)를 생성하고 자가면역 응답을 개시하여 탈수(demyelination), 뉴런 신호전달의 붕괴 및 세포사를 야기할 수 있음을 시사하였다. (문헌[Zlokovic 2008]).

[0077] 최근의 연구는, BBB의 약화가 내피 세포의 VEGF-A 수용체를 통하여 매개되는 내피 세포의 동요에서 생길 수 있음을 시사한다. (문헌[Argaw AT et al., "VEGF-mediated disruption of endothelial CLN-5 promotes blood-brain barrier breakdown," *PNAS* 106(6): 1977-1982 (2009)]). 상기 연구에 따르면, 정상 세포로부터 유래된 VEGF-A는 내피 막관통 밀착 결합부 단백질인 클라우딘-5(CLN-5) 및 오클루딘(occludin; OCLN) 둘 모두를 표적화하여 이들의 발현을 붕괴시킨다. CLN-5 및 OCLN 둘 모두의 발현이 감소함에 따라, BBB의 파괴는 증가한다.

[0078] 본 발명의 실시예에 나타난 바와 같이, BBB 약화의 또 다른 가능한 기작으로는 SEMA4D의 플렉신-B1 고 친화도(1 nM) 수용체를 통한 내피 세포 동요의 결과로서의 기작이 있다. 플렉신-B1은 내피 세포에 의해 발현될 수 있다. SEMA4-D의 존재 하에서, 내피 세포는, 예를 들어 밀착 접합부의 변형을 통하여 BBB의 약화가 야기되도록 내피 세포의 형태 또는 기능을 변경시키는 변환을 겪을 수 있다. 이러한 BBB 약화는 다시 세포 및 분자에 대한 BBB의 투과성을 증가시키며 그러한 세포 및 분자가 뇌 및 중추 신경계로 들어가 뇌 및 중추 신경계의 활성을 변경시키게 할 수 있다. 그 결과로서, 항-SEMA4D 또는 항-플렉신-B1 중 어느 하나의 첨가는 내피 세포가 변환을 겪는 것을 방지하여 BBB의 약화를 감소시킬 수 있다.

[0079] III. 표적 폴리펩티드의 설명

[0080] 본원에서 사용될 때, "세마포린-4D," "SEMA4D" 및 "SEMA4D 폴리펩티드"는 "SEMA4D" 및 "Sema4D"가 그러한 바와 같이 상호교환가능하게 사용된다. 특정 실시 양태에서, SEMA4D는 세포 표면 상에서 발현되거나 세포에 의해 분비된다. 또 다른 실시 양태에서, SEMA4D는 막 결합된다. 또 다른 실시 양태에서, SEMA4D는 가용성이며, 예를 들

어, sSEMA4D이다. 다른 실시 양태에서, SEMA4D는 전장 SEMA4D 또는 이의 단편, 또는 SEMA4D 변이형 폴리펩티드를 포함할 수 있으며, 여기서, SEMA4D 변이형 폴리펩티드 또는 SEMA4D의 단편은 전장 SEMA4D의 일부 또는 전부의 기능적 특성을 유지한다.

[0081] 전장 인간 SEMA4D 단백질은 150 kDa의 2개의 폴리펩티드 사슬로 이루어진 동종이량체형 막관통 단백질이다. SEMA4D는 세마포린 패밀리의 세포 표면 수용체에 속하며, CD 100으로도 칭해진다. 인간 및 마우스 SEMA4D/Sema4D 둘 모두는 이들의 막관통 형태로부터 단백질 분해에 의해 절단되어 120 kDa의 가용성 형태를 생성하며, 이는 2가지의 Sema4D 이소형(isoform)의 존재를 나타낸다(문헌[Kumanogoh et al., J. Cell Science 116(7) 3464 (2003)]). 세마포린은 뉴런과 그의 적절한 표적 사이에 정확한 연결을 확립하는 데 있어서 중요한 역할을 하는, 발달 동안의 축색 유도 인자(axonal-guidance factor)로 원래 정의되었던 가용성 및 막 결합 단백질을 포함한다. 구조적으로 고려되는 클래스 IV 세마포린, 전장 SEMA4D는 아미노 말단 신호 서열, 이어서 17개의 보존된 시스테인 잔기를 함유하는 특징적인 'Sema' 도메인, Ig 유사 도메인, 리신 풍부 스트레치(stretch), 소수성 막관통 영역 및 세포질 테일을 포함한다.

[0082] SEMA4D의 각각의 폴리펩티드 사슬은 약 13개 아미노산의 신호 서열, 이어서 약 512개 아미노산의 세마포린 도메인, 약 65개 아미노산의 면역글로불린 유사(Ig 유사) 도메인, 104개 아미노산의 리신 풍부 스트레치, 약 19개 아미노산의 소수성 막관통 영역, 및 110개 아미노산의 세포질 테일을 포함한다. 세포질 테일 내의 티로신 인산화에 위한 콘센서스(consensus) 부위는 SEMA4D와 티로신 키나아제와의 예상된 회합을 지지한다(문헌[Schlossman, et al., Eds. (1995) Leucocyte Typing V (Oxford University Press, Oxford)]).

[0083] SEMA4D는 2개 이상의 수용체를 갖는 것으로 공지되어 있다. 상기 수용체들 중 하나인 플렉신-B1은 비림프계 조직에서 발현되며, SEMA4D의 고 친화도(1 nM) 수용체인 것으로 밝혀졌다(문헌[Tamagnone et al., Cell 99:71-80 (1999)]). 플렉신-B1 신호전달의 SEMA4D 자극은 뉴런의 성장 원추 붕괴(growth cone collapse)를 유도하고, 올리고덴드로사이트의 과정 연장 붕괴 및 아포토시스를 유도하는 것으로 밝혀졌다(문헌[Giraudon et al., J Immunol. 72: 1246-1255 (2004)]; 문헌[Giraudon et al., NeuroMolecular Med. 7:207-216 (2005)]). SEMA4D에 의한 결합 후, 플렉신-B1 신호전달은, 세포골격을 재편성하고 세포를 이주시키는 RhoA의 활성화 뿐만 아니라 세포 외 매트릭스에의 인테그린 매개된 부착을 감소시키는 R-Ras의 불활성화도 매개한다. 문헌[Kruger et al., Nature Rev. Mol. Cell Biol. (5):789-800 (2005); Pasterkamp, TRENDS in Cell Biology 75:61-64 (2005)]을 참조한다.

[0084] 림프계 조직에 있어서, CD72는 저 친화도(300 nM) SEMA4D 수용체로 이용된다(문헌[Kumanogoh et al., Immunity 73:621-631 (2000)]). B 세포 및 APC는 CD72를 발현하며, 항-CD72 항체는 CD40 유도된 B 세포 응답의 향상 및 CD23의 B 세포 shedding(shedding)과 같은 sSEMA4D와 동일한 효과들 중 다수를 갖는다. CD72는 많은 저해성 수용체와 회합될 수 있는 티로신 포스포타아제 SHP-1의 모집에 의해 B 세포 응답의 음성 조절자로서 작용하는 것으로 생각된다. SEMA4D와 CD72와의 상호작용은 SHP-1을 해리시키고 이러한 음성 활성화 신호를 손실시킨다. SEMA4D는 시험관내에서 T 세포 자극 및 B 세포 응집 및 생존을 촉진하는 것으로 밝혀졌다. SEMA4D 발현 세포 또는 sSEMA4D의 첨가는 시험관내에서 CD40 유도된 B 세포 증식 및 면역글로불린 생성을 향상시키며, 생체내 항체 응답을 가속화한다(문헌[Ishida et al., Inter. Immunol. 75: 1027-1034 (2003)]; 문헌[Kumanogoh and H. Kukutani, Trends in Immunol. 22:670-676 (2001)]). sSEMA4D는 공자극 분자들의 상향 조절 및 IL-12의 분비의 증가를 비롯하여 DC의 CD40 유도된 성숙을 향상시킨다. 게다가, sSEMA4D는 면역 세포 이주를 저해할 수 있는데, 이는 차단 항-SEMA4D 항체의 첨가에 의해 역전될 수 있다(문헌[Elhabazi et al., J. Immunol. 166:4341-4347 (2001)]; 문헌[Delaire et al., J. Immunol. 166:4348-4354 (2001)]).

[0085] Sema4D는 비장, 흉선, 및 림프절을 포함하는 림프계 기관, 및 뇌, 심장 및 신장과 같은 비림프계 기관에서 고수준으로 발현된다. 림프계 기관에 있어서, Sema4D는 휴면 T 세포 상에서 풍부하게 발현되지만, 휴면 B 세포 및 항원 제시 세포(APC), 예컨대 수지상 세포(DC) 상에서는 단지 약하게 발현된다. 세포 활성화는 가용성 SEMA4D(sSEMA4D)의 생성 뿐만 아니라 SEMA4D의 표면 발현도 증가시킨다.

[0086] SEMA4D의 발현 패턴은 이것이 면역계에 있어서의 병리학적 역할 뿐만 아니라 중요한 생리학적 역할도 함을 시사한다. SEMA4D는 B 세포의 활성화, 응집 및 생존을 촉진하며; CD40 유도된 증식 및 항체 생성을 향상시키며; T 세포 의존성 항원에 대한 항체 응답을 향상시키며; T 세포 증식을 증가시키며; 수지상 세포의 성숙 및 수지상 세포가 T 세포를 자극하는 능력을 향상시키는 것으로 밝혀졌으며; 탈수 및 축색 퇴행에 직접적으로 연루된다(문헌[Shi et al., Immunity 75:633-642 (2000)]; 문헌[Kumanogoh et al., J Immunol 769: 1175-1181 (2002)]; 및 문헌[Watanabe et al., J Immunol 767:4321-4328 (2001)]).

- [0087] SEMA4D 녹아웃(SEMA4D<sup>-/-</sup>) 마우스는, SEMA4D가 체액성 및 세포성 면역 응답 둘 모두에서 중요한 역할을 한다는 추가의 증거를 제공하였다. SEMA4D<sup>-/-</sup> 마우스에 있어서의 비립체계 조직의 공지된 주요한 비정상적인 것은 전혀 없었다. SEMA4D<sup>-/-</sup> 마우스로부터의 수지상 세포(DC)는 불량한 동종이계 자극(allostimulatory) 능력을 가지며, 공자극 분자의 발현에서의 결함을 나타내는데, 이는 sSEMA4D의 첨가에 의해 구제될 수 있다. SEMA4D 결함 마우스(SEMA4D<sup>-/-</sup>)는 미엘린 올리고덴드로사이트 당단백질 펩티드에 의해 유도되는 실험적 자가면역 뇌척수염을 발병하지 못하며, 그 이유는 미엘린 올리고덴드로사이트 당단백질 특이적 T 세포가 SEMA4D의 부재 하에서는 불량하게 생성되기 때문이다(문헌[Kumanogoh et al., J Immunol 7(59):1175-1181 (2002)]). 유의한 양의 가용성 SEMA4D는 자가 면역에 걸리기 쉬운 MRL/lpr 마우스(SLE와 같은 전신성 자가면역 질환의 모델)의 혈청에서 또한 검출되지만, 정상 마우스에서는 검출되지 않는다. 또한, sSEMA4D의 수준은 자기 항체의 수준과 상관되며, 나이가 들어감에 따라 증가한다(문헌[Wang et al., Blood 97:3498-3504 (2001)]). 또한 가용성 SEMA4D는 탈수초성 질환에 걸린 환자의 뇌척수액 및 혈청에 축적되는 것으로 밝혀졌으며, sSEMA4D는 인간 전능성 신경 전구체(Dev 세포)의 아포토시스를 유도하며, 이들 둘 모두는 과정 연장을 저해하며, 시험관내에서 래트 올리고덴드로사이트의 아포토시스를 유도한다(문헌[Giraudon et al., J Immunol 772(2): 1246-1255 (2004)]). 이러한 아포토시스는 항-SEMA4D MAb에 의해 차단되었다.
- [0088] IV. 항-SEMA4D 항체
- [0089] SEMA4D에 결합하는 항체가 당업계에서 기술되었다. 예를 들어, 미국 특허 공개 제2008/0219971 A1호, 미국 특허 공개 제2010/0285036 A1호, 및 미국 특허 공개 제2006/0233793 A1호, 국제 특허 공개 제WO 93/14125호, 국제 특허 공개 제WO 2008/100995호, 및 국제 특허 공개 제WO 2010/129917호와, 문헌[Herold et al., Int. Immunol. 7(1): 1-8 (1995)]을 참조하는데, 이들 각각은 그 전체 내용이 본원에 참고로 포함된다.
- [0090] 일반적으로 본 출원은 신경염증성 장애, 예를 들어 CNS 염증성 장애 또는 신경퇴행성 장애를 갖는 대상체, 예를 들어, 인간 환자에 있어서 혈뇌 장벽 투과성을 감소시키는 방법으로서, SEMA4D에 특이적으로 결합하는 항체, 또는 이의 항원 결합 단편, 변이체 또는 유도체를 투여하는 단계를 포함하는 방법에 관한 것이다. 특정 실시 양태에서, 항체는 SEMA4D와 그 수용체들 중 하나 이상, 예를 들어 플렉신-B1과의 상호작용을 차단한다. 이들 특성을 갖는 항-SEMA4D 항체는 본원에 제공된 방법에서 사용될 수 있다. 사용될 수 있는 항체는 MAb인 VX 15/2503, 67, 및 76과 이들의 항원 결합 단편, 변이체, 또는 유도체를 포함하지만, 이로 한정되는 것은 아니며, 이는 미국 특허 공개 제2010/0285036 A1호에 충분히 기술되어 있다. 본원에 제공된 방법에서 사용될 수 있는 추가의 항체는 미국 특허 공개 제2006/0233793 A1호에 기술된 BD16 및 BB18 항체와, 이들의 항원 결합 단편, 변이체, 또는 유도체; 또는 미국 특허 공개 제2008/0219971 A1호에 기술된 바와 같이 MAb 301, MAb 1893, MAb 657, MAb 1807, MAb 1656, MAb 1808, Mab 59, Mab 2191, Mab 2274, Mab 2275, Mab 2276, Mab 2277, Mab 2278, Mab 2279, Mab 2280, Mab 2281, Mab 2282, Mab 2283, Mab 2284, 및 Mab 2285 중 임의의 것과, 이들의 임의의 단편, 변이체 또는 유도체를 포함한다. 특정 실시 양태에서, 본원에 제공된 방법에서 사용하기 위한 항-SEMA4D 항체는 인간 SEMA4D, 쥐과 SEMA4D, 또는 인간 및 쥐과 둘 모두의 SEMA4D에 결합한다. 또한 유용한 것은 전술한 항체 중 임의의 것과 동일한 에피토프에 결합하는 항체 및/또는 전술한 항체 중 임의의 것이 SEMA4D에 결합하는 것을 경쟁적으로 저해하는 항체이다.
- [0091] 특정 실시 양태에서, 본원에 제공된 방법에서 유용한 항-SEMA4D 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 변이체 또는 유도체는 기준 항-SEMA4D 항체 분자, 예를 들어 상기에 기술된 것의 아미노산 서열에 대한 서열 동일성이 약 80% 이상, 약 85% 이상, 약 88% 이상, 약 89% 이상, 약 90% 이상, 약 91% 이상, 약 92% 이상, 약 93% 이상, 약 94% 이상, 또는 약 95% 이상인 아미노산 서열을 갖는다. 추가의 실시 양태에서, 본 결합 분자는 기준 항체에 대하여 적어도 약 96%, 약 97%, 약 98%, 약 99%, 또는 100%의 서열 동일성을 공유한다.
- [0092] 또 다른 실시 양태에서, 본원에 제공된 방법에서 유용한 항-SEMA4D 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 변이체 또는 유도체는 면역글로불린 중쇄 가변 도메인(VH 도메인)으로서, 여기서, VH 도메인의 CDR들 중 하나 이상은 서열 번호 9 또는 10의 CDR1, CDR2 또는 CDR3에 대하여 적어도 동일성이 약 80%, 약 85%, 약 90%, 약 95%, 약 96%, 약 97%, 약 98%, 약 99%이거나 CDR1, CDR2 또는 CDR3과 동일한 아미노산 서열을 갖는 면역글로불린 중쇄 가변 도메인(VH 도메인)을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어진다.
- [0093] 또 다른 실시 양태에서, 본원에 제공된 방법에서 유용한 항-SEMA4D 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 변이체 또는 유도체는 면역글로불린 중쇄 가변 도메인 (VH 도메인)으로서, 여기서, VH 도메인의 CDR들 중 하나 이상은 서열 번호 6, 서열 번호 7, 또는 서열 번호 8의 서열에 대하여 적어도 동일성이 약 80%, 약 85%, 약 90%, 약 95%, 약 96%, 약 97%, 약 98%, 약 99%이거나 동일한 아미노산 서열을 갖는 면역글로불린 중쇄 가변 도메인 (VH 도메

인)을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어진다.

- [0094] 또 다른 실시 양태에서, 본원에 제공된 방법에서 유용한 항-SEMA4D 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 변이체 또는 유도체는 면역글로불린 중쇄 가변 도메인(VH 도메인)으로서, 여기서, VH 도메인의 CDR들 중 하나 이상은 서열 번호 6, 서열 번호 7, 또는 서열 번호 8의 서열에 대하여, 1개, 2개, 3개, 4개 또는 5개의 보존적 아미노산 치환을 제외하고는 동일한 아미노산 서열을 갖는 면역글로불린 중쇄 가변 도메인(VH 도메인)을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어진다.
- [0095] 또 다른 실시 양태에서, 본원에 제공된 방법에서 유용한 항-SEMA4D 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 변이체 또는 유도체는, 서열 번호 9 또는 서열 번호 10의 서열에 대하여 적어도 약 80%, 약 85%, 약 90%, 약 91%, 약 92%, 약 93%, 약 94%, 약 95%, 약 96%, 약 97%, 약 98%, 약 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 갖는 VH 도메인을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지며, 여기서, 코딩된 VH 도메인을 포함하는 항-SEMA4D 항체는 SEMA4D에 특이적으로, 우선적으로 또는 경쟁적으로 결합한다.
- [0096] 또 다른 실시 양태에서, 본원에 제공된 방법에서 유용한 항-SEMA4D 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 변이체 또는 유도체는 면역글로불린 경쇄 가변 도메인(VL 도메인)으로서, 여기서, VL 도메인의 CDR들 중 하나 이상은 서열 번호 17 또는 18의 CDR1, CDR2 또는 CDR3에 대하여 적어도 동일성이 약 80%, 약 85%, 약 90%, 약 95%, 약 96%, 약 97%, 약 98%, 약 99%이거나 동일한 아미노산 서열을 갖는 면역글로불린 경쇄 가변 도메인(VL 도메인)을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어진다.
- [0097] 또 다른 실시 양태에서, 본원에 제공된 방법에서 유용한 항-SEMA4D 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 변이체 또는 유도체는 면역글로불린 경쇄 가변 도메인(VL 도메인)으로서, 여기서, VL 도메인의 CDR들 중 하나 이상은 서열 번호 14, 서열 번호 15, 또는 서열 번호 16의 서열에 대하여 적어도 동일성이 약 80%, 약 85%, 약 90%, 약 95%, 약 96%, 약 97%, 약 98%, 약 99%이거나 동일한 아미노산 서열을 갖는 면역글로불린 경쇄 가변 도메인(VL 도메인)을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어진다.
- [0098] 또 다른 실시 양태에서, 본원에 제공된 방법에서 유용한 항-SEMA4D 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 변이체 또는 유도체는 면역글로불린 경쇄 가변 도메인(VL 도메인)으로서, 여기서, VL 도메인의 CDR들 중 하나 이상은 서열 번호 14, 서열 번호 15, 또는 서열 번호 16의 서열에 대하여, 1개, 2개, 3개, 4개 또는 5개의 보존적 아미노산 치환을 제외하고는 동일한 아미노산 서열을 갖는 면역글로불린 경쇄 가변 도메인(VL 도메인)을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어진다.
- [0099] 또 다른 실시 양태에서, 본원에 제공된 방법에서 유용한 항-SEMA4D 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 변이체 또는 유도체는, 서열 번호 17 또는 서열 번호 18의 서열에 대하여 적어도 약 80%, 약 85%, 약 90%, 약 91%, 약 92%, 약 93%, 약 94%, 약 95%, 약 96%, 약 97%, 약 98%, 약 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 갖는 VL 도메인을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지며, 여기서, 코딩된 VL 도메인을 포함하는 항-SEMA4D 항체는 SEMA4D에 특이적으로, 우선적으로 또는 경쟁적으로 결합한다.
- [0100] 또 다른 실시 양태에서, 본원에 제공된 방법에서 유용한 항-SEMA4D 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 변이체 또는 유도체는, 면역글로불린 중쇄 가변 도메인(VH 도메인) 및 면역글로불린 경쇄 가변 도메인(VL 도메인)으로서, 여기서, VH 도메인의 CDR들 중 하나 이상은 서열 번호 9 또는 10의 CDR1, CDR2 또는 CDR3에 대하여 적어도 동일성이 약 80%, 약 85%, 약 90%, 약 95%, 약 96%, 약 97%, 약 98%, 약 99%이거나, 동일한 아미노산 서열을 갖고, VL 도메인의 CDR들 중 하나 이상은 서열 번호 17 또는 서열 번호 18의 CDR1, CDR2 또는 CDR3에 대하여 적어도 동일성이 약 80%, 약 85%, 약 90%, 약 95%, 약 96%, 약 97%, 약 98%, 약 99%이거나, 동일한 아미노산 서열을 갖는 면역글로불린 중쇄 가변 도메인(VH 도메인) 및 면역글로불린 경쇄 가변 도메인(VL 도메인)을 포함하거나, 이들로 본질적으로 이루어지거나, 이들로 이루어진다.
- [0101] 또 다른 실시 양태에서, 본원에 제공된 방법에서 유용한 항-SEMA4D 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 변이체 또는 유도체는 면역글로불린 중쇄 가변 도메인(VH 도메인) 및 면역글로불린 경쇄 가변 도메인(VL)으로서, 여기서, VH 도메인의 CDR들 중 하나 이상은 서열 번호 6, 서열 번호 7, 또는 서열 번호 8의 서열에 대하여, 1개, 2개, 3개, 4개 또는 5개의 보존적 아미노산 치환을 제외하고는 동일한 아미노산 서열을 갖고, VL 도메인의 CDR들 중 하나 이상은 서열 번호 14, 서열 번호 15, 또는 서열 번호 16의 서열에 대하여, 1개, 2개, 3개, 4개 또는 5개의 보존적 아미노산 치환을 제외하고는 동일한 아미노산 서열을 갖는 면역글로불린 중쇄 가변 도메인(VH 도메인) 및 면역글로불린 경쇄 가변 도메인(VL 도메인)을 포함하거나, 이들로 본질적으로 이루어지거나, 이들로 이루어진다.

- [0102] 또 다른 실시 양태에서, 본원에 제공된 방법에서 유용한 항-SEMA4D 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 변이체 또는 유도체는 서열 번호 9 또는 서열 번호 10의 서열에 대하여 적어도 약 80%, 약 85%, 약 90%, 약 91%, 약 92%, 약 93%, 약 94%, 약 95%, 약 96%, 약 97%, 약 98%, 약 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 갖는 VH 도메인, 및 서열 번호 17 또는 서열 번호 18의 서열에 대하여 적어도 약 80%, 약 85%, 약 90%, 약 91%, 약 92%, 약 93%, 약 94%, 약 95%, 약 96%, 약 97%, 약 98%, 약 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 갖는 VL 도메인을 포함하거나, 이들로 본질적으로 이루어지거나, 이들로 이루어지며, 여기서, 코딩된 VH 및 VL 도메인을 포함하는 항-SEMA4D 항체는 SEMA4D에 특이적으로, 우선적으로 또는 경쟁적으로 결합한다.
- [0103] 또 다른 실시 양태에서, 본원에 제공된 방법에서 유용한 항-SEMA4D 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 변이체 또는 유도체는 MAb VX15/2503, 67, 또는 76의 VL 도메인의 3개의 CDR 및 VH 도메인의 3개의 CDR을 포함하거나, 이들로 본질적으로 이루어지거나, 이들로 이루어지며, 이는 미국 특허 공개 제2010/0285036 A1호에 충분히 기술되어 있다. 몇몇 실시 양태에서, 본원에 제공된 방법에서 유용한 항-SEMA4D 항체는 MAb VX15/2503 또는 67을 포함한다.
- [0104] 본원에 제공된 방법에서 사용하기 위하여 또한 포함되는 것은 본원에 기술된 항-SEMA4D 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 변이체, 또는 유도체를 코딩하는 폴리펩티드, 그러한 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드, 그러한 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터, 및 그러한 벡터 또는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 숙주 세포이며, 이들 전부는 본원에 기술된 방법에서 사용하기 위한 항-SEMA4D 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 변이체, 또는 유도체를 생성하기 위한 것이다.
- [0105] 본 발명의 항-SEMA4D 항체의 적합한 생물학적 활성 변이체가 본 발명의 방법에서 사용될 수 있다. 그러한 변이체는 모(parent) 항-SEMA4D 항체의 요망되는 결합 특성을 유지한다. 항체 변이체의 제조 방법은 일반적으로 당 업계에서 이용가능하다.
- [0106] 돌연변이 유발 방법 및 뉴클레오티드 서열 변경 방법은 당업계에 공지되어 있다. 예를 들어, 문헌[Walker and Gaastra, eds. (1983) *Techniques in Molecular Biology* (MacMillan Publishing Company, New York)]; 문헌[Kunkel, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 52:488-492 (1985)]; 문헌[Kunkel et al., *Methods Enzymol.* 754:367-382 (1987)]; 문헌[Sambrook et al. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor, N.Y.)]; 미국 특허 제4,873,192호; 및 그 안에 인용된 참고 문헌을 참조하며, 이는 본원에 참고로 포함된다. 관심있는 폴리펩티드의 생물학적 활성에 영향을 주지 않는 적절한 아미노산 치환에 관한 안내는 그 전체 내용이 본원에 참고로 포함된 문헌[Dayhoff et al. (1978), *Atlas of Protein Sequence and Structure* (Natl. Biomed. Res. Found., Washington, D.C.), pp. 345-352]의 모델에서 발견될 수 있다. 데이호프(Dayhoff) 등의 모델은 PAM(Point Accepted Mutation) 아미노산 유사성 매트릭스(PAM 250 매트릭스)를 사용하여 적합한 보존적 아미노산 치환을 결정한다. 보존적 치환, 예컨대 하나의 아미노산을 유사한 특성을 갖는 또 다른 것과 교환하는 것이 바람직할 수 있다. 데이호프 등의 모델의 PAM 250 매트릭스에 의해 교시되는 바와 같이 보존적 아미노산 치환의 예는 Gly↔Ala, Val↔Ile↔Leu, Asp↔Glu, Lys↔Arg, Asn↔Gln, 및 Phe↔Trp↔Tyr을 포함하지만, 이로 한정되는 것은 아니다.
- [0107] 관심있는 폴리펩티드, 항-SEMA4D 결합 분자, 예를 들어, 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 변이체의 구성에 있어서, 변이체가 요망되는 특성, 예를 들어, 예컨대 세포의 표면 상에서 발현되거나 세포에 의해 분비되는 SEMA4D, 예를 들어, 인간 SEMA4D, 쥐과 SEMA4D, 또는 인간 및 쥐과 둘 모두의 SEMA4D에 특이적으로 결합할 수 있는, 그리고 SEMA4D 차단 활성을 갖는 요망되는 특성을 계속하여 보유하도록 변형이 이루어질 수 있는데, 이는 본원에 기술된 바와 같다. 명확하게는, 변이형 폴리펩티드를 코딩하는 DNA에서 이루어진 임의의 돌연변이는 그 서열을 리딩 프레임 밖에 두어서는 안되며, 바람직하게는 2차 mRNA 구조체를 생성할 수 있는 상보성 영역을 생성하지 않는다. 유럽 특허 제75,444호를 참조한다.
- [0108] 항-SEMA4D 결합 분자, 예를 들어, 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 변이체 또는 유도체의 결합 특이성의 측정 방법은 표준 경쟁 결합 분석법, T 세포 또는 B 세포에 의한 면역글로불린 분비의 모니터링을 위한 분석법, T 세포 증식 분석법, 아포토시스 분석법, ELISA 분석법 등을 포함하지만, 이로 한정되는 것은 아니다. 예를 들어, 국제 특허 공개 제WO 93/14125호; 문헌[Shi et al., *Immunity* 73:633-642 (2000)]; 문헌[Kumanogoh et al., *J Immunol* 760: 1175-1181 (2002)]; 문헌[Watanabe et al., *J Immunol* 767:4321-4328 (2001)]; 문헌[Wang et al., *Blood* 97:3498-3504 (2001)]; 및 문헌[Giraudon et al., *J Immunol* 772(2):1246-1255 (2004)]에 개시된 그러한 분석법을 참조하는데, 이들 전부는 본원에 참고로 포함된다.
- [0109] 본원에 개시된 불변 영역, CDR, VH 도메인 또는 VL 도메인을 포함하는 임의의 특정 폴리펩티드가 또 다른 폴리

펩티드에 대하여 적어도 약 65%, 약 70%, 약 75%, 약 80%, 약 85%, 약 90%, 약 91%, 약 92%, 약 93%, 약 94%, 약 95%, 약 96%, 약 97%, 약 98%, 약 99%, 또는 심지어 약 100% 동일한지를 본원에서 논의할 때, 동일성 %는 베스트피트(BESTFIT) 프로그램(위스콘신 서열 분석 패키지, 유닉스용 버전 8, 미국 53711 위스콘신주 매디슨 사이언스 드라이브 575 유니버시티 리서치 파크의 제네틱스 컴퓨터 그룹)과 같은 그러나 이로 한정되는 것은 아닌 당업계에 공지된 컴퓨터 프로그램/소프트웨어 및 방법을 이용하여 결정될 수 있다. 베스트피트는 문헌[Smith and Waterman (1981) Adv. Appl. Math. 2:482-489]의 국소적 상동성 알고리즘을 사용하여 두 서열들 사이의 최상의 상동성 절편을 발견한다. 베스트피트 또는 임의의 다른 서열 정렬 프로그램을 사용하여 특정 서열이 예를 들어 본 발명에 따른 기준 서열에 대하여 95% 동일한지를 결정할 때, 그 파라미터는 물론 동일성 백분율이 전장의 기준 폴리펩티드 서열에 걸쳐서 계산되도록 그리고 기준 서열에서의 아미노산의 총 수의 5% 이하의 상동성의 갭이 허용되도록 설정된다.

[0110] 본 발명의 목적상, 서열 동일성 퍼센트는 12의 갭 오픈 페널티(gap open penalty) 및 2의 갭 연장 페널티, 62의 BLOSUM 매트릭스를 이용하여 어핀(affine) 갭 검색을 사용하여 스미스(Smith)-워터맨(Waterman) 상동성 검색 알고리즘을 이용하여 결정될 수 있다. 스미스-워터맨 상동성 검색 알고리즘은 문헌[Smith and Waterman (1981) Adv. Appl. Math. 2:482-489]에 교시되어 있다. 예를 들어 변이체는 1 내지 15개만큼 적은 아미노산 잔기, 1 내지 10개, 예컨대 6 내지 10개만큼 적은 아미노산 잔기, 5개만큼 적은, 4개, 3개, 2개 또는 심지어 1개만큼 적은 아미노산 잔기가 기준 항-SEMA4D 항체(예를 들어, Mab VX15/2503, 67 또는 76)와 상이할 수 있다.

[0111] 다수의 방식으로 이펙터(effector) 기능을 변경하도록 항-SEMA4D 항체의 불변 영역을 돌연변이시킬 수 있다. 예를 들어, 미국 특허 제6,737,056B1호 및 미국 특허 공개 제2004/0132101A1호를 참조하는데, 이들은 Fc 수용체에 의 항체 결합을 최적화하는 Fc 돌연변이를 개시한다.

[0112] 본원에 제공된 방법에서 유용한 특정한 항-SEMA4D 항체 또는 이의 단편, 변이체 또는 유도체에서, Fc 부분은 당업계에 공지된 기술을 이용하여 이펙터 기능이 감소되도록 돌연변이시킬 수 있다. 예를 들어, 불변 영역 도메인의 결실 또는 불활성화(점 돌연변이 또는 다른 수단을 통한 것임)는 순환 변형 항체의 Fc 수용체 결합을 감소시킴으로써 종양 국소화를 증가시킬 수 있다. 다른 경우에, 본 발명과 일치하는 불변 영역 변형은 보체 결합이 적당해지게 하고 따라서 혈청중 반감기를 감소시킨다. 불변 영역의 또 다른 변형은 증가된 항원 특이성 또는 항체 가요성으로 인하여 향상된 국소화를 허용하는 올리고당 모이어티(moiety) 또는 디설피드 결합을 변형시키기 위하여 사용될 수 있다. 생성된 생리학적 프로필, 생체이용률 및 상기 변형의 다른 생화학적 영향, 예컨대 종양 국소화, 생체내 분포 및 혈청중 반감기는 지나친 실험 없이 공지된 면동력학적 기술을 이용하여 용이하게 측정 및 정량화될 수 있다. 본원에 제공된 방법에서 사용하기 위한 항-SEMA4D 항체는, 항체가 그의 동족 에피토프에 특이적으로 결합하는 것을 공유적 부착이 방지하지 않도록, 예를 들어 임의의 타입의 분자의 항체에의 공유적 부착에 의해 변형된 유도체를 포함한다. 예를 들어, 그러나 제한하는 것으로서는 아닌 것에 있어서, 항체 유도체는, 예를 들어 글리코실화, 아세틸화, 폐길화, 인산화, 아미드화, 공지된 보호/차단 기에 의한 유도체화, 단백질 분해적 절단, 세포 리간드 또는 다른 단백질에의 결합 등에 의해 변형된 항체를 포함한다. 임의의 다수의 화학적 변형이 특정한 화학적 절단, 아세틸화, 포르밀화 등을 포함하지만 이로 한정되는 것은 아닌 공지된 기술에 의해 실시될 수 있다. 부가적으로, 유도체는 하나 이상의 비고전적 아미노산을 함유할 수 있다.

[0113] "보존적 아미노산 치환"은 그 아미노산 잔기가 유사한 전하를 갖는 측쇄를 갖는 아미노산 잔기로 대체된 것이다. 유사한 전하를 갖는 측쇄를 갖는 아미노산 잔기의 패밀리는 당업계에서 규정되었다. 이들 패밀리는 염기성 측쇄(예를 들어, 라이신, 아르기닌, 히스티딘), 산성 측쇄(예를 들어, 아스파르트산, 글루탐산), 비하전된 극성 측쇄(예를 들어, 글리신, 아스파라긴, 글루타민, 세린, 트레오닌, 티로신, 시스테인), 비극성 측쇄(예를 들어, 알라닌, 발린, 류신, 이소류신, 프롤린, 페닐알라닌, 메티오닌, 트립토판), 메타 분지형 측쇄(예를 들어, 트레오닌, 발린, 이소류신) 및 방향족 측쇄(예를 들어, 티로신, 페닐알라닌, 트립토판, 히스티딘)를 갖는 아미노산을 포함한다. 대안적으로, 돌연변이는 포화 돌연변이 유발에 의한 것과 같이 코딩 서열의 전부 또는 일부를 따라서 랜덤하게 도입될 수 있으며, 생성된 돌연변이체를 생물학적 활성에 대하여 스크리닝하여 활성(예를 들어, 항-SEMA4D 폴리펩티드에 결합하거나, SEMA4D와 그 수용체와의 상호작용을 차단하거나, 대상체, 예를 들어 신경염증성 장애를 갖는 환자에 있어서 BBB 투과성을 감소시키는 능력)을 유지하는 돌연변이체를 동정할 수 있다.

[0114] 예를 들어, 돌연변이를 항체 분자의 단지 프레임워크 영역 내에 또는 단지 CDR 영역 내에 도입하는 것이 가능하다. 도입된 돌연변이는 사일런트(silent) 또는 중성 미스센스(missense) 돌연변이일 수 있으며, 즉, 항체가 항원에 결합하는 능력에 대하여 영향을 전혀 주지 않거나 거의 주지 않을 수 있다. 이러한 타입의 돌연변이는 코돈 사용의 최적화에 유용하거나 하이브리도마의 항체 생산을 향상시킬 수 있다. 대안적으로, 비중성 미스센스

돌연변이는 항체가 항원에 결합하는 능력을 변경시킬 수 있다. 당업계의 숙련자라면, 항원 결합 활성의 변경 또는 결합 활성의 변경(예를 들어, 항원 결합 활성의 개선 또는 항체 특이성의 변화)이 없는 것과 같은 요망되는 특성을 갖는 돌연변이 분자를 설계 및 테스트할 수 있다. 돌연변이 유발 후, 코딩된 단백질은 일상적으로 발현될 수 있으며, 코딩된 단백질의 기능적 및/또는 생물학적 활성(예를 들어, SEMA4D 폴리펩티드의 하나 이상의 에피토프에 면역특이적으로 결합하는 능력)은 본원에 설명된 기술을 이용하여 또는 당업계에 공지된 일상적 변형 기술에 의해 결정될 수 있다.

[0115] 특정 실시 양태에서, 본원에 제공된 방법에서 사용하기 위한 항-SEMA4D 항체는 하나 이상의 최적화된 상보성 결정 영역(CDR)을 포함한다. "최적화된 CDR"은, 최적화된 CDR을 포함하는 항-SEMA4D 항체에 부여된 항-SEMA4D 활성 및/또는 결합 친화성을 향상시키도록 CDR이 변형 및 최적화된 것으로 의도된다. "항-SEMA4D 활성" 또는 "SEMA4D 차단 활성"은 SEMA4D와 결부된 하기 활성들 중 하나 이상을 조정하는 활성을 포함할 수 있다: B 세포의 활성화, 응집 및 생존; CD40 유도된 증식 및 항체 생성; T 세포 의존성 항원에 대한 항체 응답; T 세포 또는 다른 면역 세포의 증식; 수지상 세포의 성숙; 탈수 및 축색 퇴행; 전능성 신경 전구체 및/또는 올리고덴드로사이트의 아포토시스; 내피 세포 이주의 유도; 자발적 단구 이주의 저해; 세포 표면 플렉신-B1 또는 다른 수용체에 의한 결합, 또는 SEMA4D+ 세포의 표면 상에서 발현되는 SEMA4D 또는 가용성 SEMA4D와 결부된 임의의 다른 활성. 항-SEMA4D 활성은 또한 중추 신경계(CNS) 및 말초 신경계(PNS) 염증성 질환을 포함하는 신경염증성 질환을 포함하지만 반드시 이로 한정될 필요는 없는, SEMA4D 발현 또는 과발현과 결부된 질환의 발생 또는 중증도의 감소의 원인이 될 수 있다.

[0116] 쥐과 항-SEMA4D Mab인 BD16 및 BB18을 기반으로 하는 최적화된 항체의 예는 미국 특허 공개 제2008/0219971 A1호, 국제 특허 공개 제WO 93/14125호 및 문헌[Herold et al., Int. Immunol. 7(1): 1-8 (1995)]에 기술되었으며, 이들 각각은 그 전체가 본원에 참고로 포함된다. 변형은, 항-SEMA4D 항체가 SEMA4D 항원에 대한 특이성을 유지하도록 그리고 개선된 결합 친화성 및/또는 개선된 항-SEMA4D 활성을 갖도록 CDR 내의 아미노산 잔기를 대체하는 것을 포함할 수 있다.

[0117] V. 치료적 항-SEMA4D 및 항-플렉신B1 항체를 이용한 치료 방법

[0118] 본 발명의 방법은 SEMA4D와 SEMA4D 수용체, 예를 들어, 항-SEMA4D 결합 분자, 항-플렉신B1 결합 분자, 또는 이들의 조합과의 상호작용의 저해제, 예를 들어, 항원 결합 단편, 변이체 및 유도체를 포함하는 항체를 사용하여 신경염증성 장애를 갖는 대상체에서 혈뇌 장벽 투과성을 감소시키는 것에 관한 것이다. 특정 실시 양태에서, 신경염증성 장애는 예를 들어, 다발성 경화증, 근위축성 측삭 경화증, 간질, 알츠하이머병, 파킨슨병, 수막염, 뇌 부종, 뇌 외상, 또는 뇌졸중이다. 특정 실시 양태에서, 내피 세포는 SEMA4D 수용체를 발현하며; 특정 실시 양태에서, 수용체는 플렉신-B1이다. 하기 논의는 항-SEMA4D 항체, 항-플렉신B1 항체 및 이들의 조합의 투여를 나타내지만, 본원에 기술된 방법은 본 발명의 항-SEMA4D 또는 항-플렉신B1 항체의 요망되는 특성을 유지하는, 예를 들어 SEMA4D, 예를 들어, 인간, 마우스, 또는 인간 및 마우스 SEMA4D에 특이적으로 결합하고/하거나, SEMA4D 중화 활성을 갖고/갖거나 SEMA-4D와 그 수용체, 예를 들어 플렉신-B1과의 상호작용을 차단할 수 있는 이들 항-SEMA4D 항체, 또는 항-플렉신B1 항체의 항원 결합 단편, 변이체 및 유도체에 또한 적용가능하다.

[0119] 일 실시 양태에서, 치료는 항-SEMA4D 결합 분자, 항-플렉신B1 결합 분자, 또는 이들의 조합, 예를 들어, 본원에 기술된 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 환자에게 적용하거나 투여하는 것을 포함하며, 여기서, 환자는 신경염증성 장애를 갖거나, 신경염증성 장애의 발병 위험성을 갖는다. 또 다른 실시 양태에서, 치료는 또한 항-SEMA4D 결합 분자, 항-플렉신B1 결합 분자, 또는 이들의 조합, 예를 들어, 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하는 제약 조성물을 환자에게 적용하거나 투여하는 것을 포함하는 것으로 의도되며, 여기서, 환자는 신경염증성 장애를 갖거나, 신경염증성 장애의 발병 위험성을 갖는다. SEMA4D와 내피 세포 상의 수용체와의 상호작용으로 인하여 항-SEMA4D 결합 분자, 항-플렉신B1 결합 분자, 또는 이들의 조합의 적용 또는 투여는 혈뇌 장벽의 혈액측에서 일어날 것으로 예상됨을 알아야 한다. 항-SEMA4D 결합 분자, 항-플렉신B1 결합 분자 또는 이들의 조합을, 예를 들어 정맥내 투여를 포함하지만 이로 한정되는 것은 아닌, 이를 혈액측에 노출시키는 경로에 의해 투여함으로써, 항-SEMA4D 결합 분자, 항-플렉신B1 결합 분자, 또는 이들의 조합은 내피 세포에 의해 발현되는 SEMA4D 수용체와의 SEMA4D의 상호작용의 저해를 가능케 한다.

[0120] 항-SEMA4D 결합 분자, 항-플렉신B1 결합 분자, 또는 이들의 조합, 예를 들어, 본원에 기술된 항체 또는 이의 결합 단편은 다양한 신경염증성 장애의 치료에 유용하다. 몇몇 실시 양태에서, 신경염증성 장애의 치료는 BBB의 투과성의 감소 또는 감소를 포함하는 것으로 의도된다. 다른 실시 양태에서, 신경염증성 장애의 치료는 BBB의 저항성의 증가를 포함하는 것으로 의도된다. 다른 실시 양태에서, 신경염증성 장애의 치료는 BBB 상에 존재하는

내피 세포의 수, 밀도 및/또는 농도의 증가를 포함하는 것으로 의도된다. 다른 실시 양태에서, 신경염증성 장애의 치료는 내피 세포의 형태 또는 기능의 변화, 또는 BBB를 형성하는 내피 세포들간의 또는 성상 세포들간의 상호작용 또는 내피 세포와 성상 세포의 상호작용의 변화를 포함하는 것으로 의도된다.

[0121] 일 실시 양태에서, 본 발명은 특히 신경염증성 장애의 치료 또는 예방에서 사용하기 위한 의약으로서 항-SEMA4D 결합 분자, 항-플렉신B1 결합 분자, 또는 이들의 조합, 예를 들어, 항체 또는 이의 항원-결합 단편, 변이체 또는 유도체를 사용하여 BBB의 파괴 또는 BBB의 투과성의 증가를 저해하거나, 감소시키거나, 예방하거나, 최소화하는 것에 관한 것이다.

[0122] 본 발명의 방법에 따르면, 하나 이상의 항-SEMA4D 결합 분자 또는 항-플렉신B1 결합 분자, 예를 들어, 본원의 다른 곳에 정의된 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 변이체 또는 유도체를 사용하여 신경염증성 장애와 관련된 긍정적인 치료적 응답을 촉진할 수 있다. "신경염증성 장애"와 관련된 "긍정적인 치료적 응답"은 이들 항체의 항염증 활성, 항아포토시스 활성 등과 결부된 질환의 개선 및/또는 이 질환과 결부된 증상의 개선을 포함하는 것으로 의도된다. 즉, 항-증식 효과, SEMA4D 발현 세포의 추가 증식의 방지, 염증성 사이토카인, 유착 분자, 프로테아제, 면역글로불린(SEMA4D를 지닌 세포가 B 세포인 경우), 이들의 조합 등의 분비의 감소를 포함하지만 이로 한정되는 것은 아닌 염증 응답의 감소, 항-염증성 단백질의 생성의 증가, 자가반응성 세포의 수의 감소, 면역 내성의 증가, 자가반응성 세포의 생존의 저해, 아포토시스의 감소, 내피 세포 이주의 감소, 자발적 단구 이주의 증가, sSEMA4D 또는 SEMA4D 발현 세포의 자극에 의해 매기되는 하나 이상의 증상의 감소 및/또는 감소가 관찰될 수 있다. 그러한 긍정적인 치료적 응답은 투여 경로에 한정되는 것은 아니며, 공여체, 공여체 조직(예를 들어 기관 관류와 같은 것), 숙주, 이들의 임의의 조합 등에의 투여를 포함할 수 있다. 특히, 본원에 제공된 방법은 환자에 있어서 신경염증성 장애의 발병의 저해, 예방, 감소, 완화 또는 줄임에 관한 것이다. 따라서 예를 들어 질환의 개선은 임상적으로 관찰가능한 증상의 부재, BBB 투과성의 감소, BBB 상에 존재하는 내피 세포의 수, 밀도 또는 농도의 증가, 내피 세포의 형태 또는 기능의 변화, 또는 BBB를 형성하는, 내피 세포간의 그리고 주피 세포간의 또는 성상 세포간의 상호작용 또는 내피 세포, 주피 세포 및 성상 세포 사이의 상호작용의 변화로서 특성화될 수 있다.

[0123] BBB 투과성의 변화는 시험관내 모델을 사용하여 측정될 수 있다. 특정 실시 양태에서, 동력학적 시험관내 DIV-BBB 모델이 이용될 수 있다. 쿠쿨로(Cucullo) 등은 어떻게 혈동동력학적 변화 및 전신성 염증이 뇌 미세혈관계의 완전성에 영향을 주는지를 연구하기 위하여 정상적인 성인 뇌 미세혈관 내피 세포 및 성인 성상 세포로 구성된 DIV-BBB 모델을 제시하였다. 구체적으로, 이 모델은 혈뇌 장벽을 나타내기 위하여 카트리지를, 또는 중공관을 사용하며, 이때 카트리지의 내부는 혈뇌 장벽의 혈액쪽을 나타내고, 카트리지의 외부는 혈뇌 장벽의 뇌쪽을 나타낸다. 카트리지의 내부는 성인 뇌 미세혈관 내피 세포로 라이닝되며, 외부는 성인 성상 세포로 라이닝된다. 혈뇌 장벽 변형제, 예컨대 SEMA4D가 카트리지의 관강 내에 도입될 때, 관의 내부와 외부 사이의 전류가 하기에 기술된 경내피세포 전기 저항 측정을 이용하여 모니터링된다. 이 모델의 일 실시 양태는 경내피세포가 혈관 구획과 실질 구획 사이에서 트래피킹하는 것을 가능하게 하기 위한 경모세관 미세구멍(transcapillary microhole)을 갖는다는 신규성을 갖는다. 이용되는 인간 미세혈관 내피 세포 및 성인 성상 세포의 유도체화 및 배양과 시험관내 DIV-BBB 모델에 대한 철저한 설명은 예를 들어 문헌[Cucullo et al., Brain Research. 951 243-254 (2002)]; 및 문헌[Cucullo et al., Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism. 2:767-77 (2011)]에서 발견될 수 있다. 당업계의 숙련자라면 종래 기술에서 다른 BBB 모델이 설명되었고, 질환에서의 BBB의 역할에 대한 연구에 유용하게 이용되었으며, 본 발명은 임의의 하나의 특정 모델에 한정되어서는 안된다는 것을 인식함을 알아야 한다.

[0124] BBB의 투과성은 경내피세포 전기 저항 측정(TEER)을 이용하여 모니터링될 수 있다. TEER은 실시간으로 BBB 완전성을 모니터링하는 데 사용되는데, 상기 BBB 완전성은 BBB의 투과성과 상관된 것으로 밝혀졌다. TEER 시스템은 빠르게 연속으로 다수의 카트리지를 측정하기 위하여 전자적 다중송신을 이용하며, 조직 배양 이중층의 완전성 및 생육성을 신속하게 그리고 신뢰성 있게 평가한다(문헌[Cucullo et al., 2002]; 문헌[Cucullo et al., 2010]; 문헌[Santaguida et al., 2006]). 작동에 있어서, 상기 시스템은 관강 구획 및 관강의 구획 내의 각각의 카트리지 내에 삽입된 여기 전극들을 가로질러서 여기 전압(0.06 V)을 인가한다. 마이크로컨트롤러는 물리적 파라미터로부터 장벽의 저항률 및 전기 용량( $cm^2$ 당)을 컴퓨터로 계산한다. 전기 용량 값은 전압 및 전류 파형의 비교에 의해 계산된다. 두 파형의 피크-피크로부터의 지연은 전기 용량 값에 비례하는데, 이는 아치 장력(arch tension)으로 표현된다. TEER은 각각의 실험 코스 전체에 걸쳐 초기 셋업으로부터 측정될 수 있다.

[0125] 항-SEMA4D 결합 분자, 항-플렉신B1 결합 분자, 또는 이들의 조합, 예를 들어, 항체 또는 이의 항원 결합 단편,

변이체 또는 유도체는 신경염증성 장애의 적어도 하나 이상의 다른 치료제와 병용될 수 있으며, 여기서, 추가의 치료법이 항-SEMA4D 결합 분자, 항-플렉신B1 결합 분자, 또는 이들의 조합, 예를 들어, 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 변이체 또는 유도체의 치료법 이전에, 그 동안, 또는 그 후에 투입된다. 따라서, 항-SEMA4D 결합 분자, 항-플렉신B1 결합 분자, 또는 이들의 조합, 예를 들어, 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 변이체 또는 유도체의 투여가 또 다른 치료제의 투여와 조합된 것을 병용 치료법이 포함할 경우, 본 발명의 방법은 별도의 제형들 또는 단일 제약 제형을 이용하여 동시투여하는 것을 포함하며, 이때 어느 하나의 순서로 연속 투여하거나 동시 투여한다.

[0126] VI. 제약 조성물 및 투여 방법

[0127] 항-SEMA4D 결합 분자, 항-플렉신B1 결합 분자, 또는 이들의 조합, 예를 들어, 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 변이체, 또는 유도체를 제조하고 이를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 방법은 당업계의 숙련자에게 공지되어 있거나 당업계의 숙련자에 의해 쉽게 결정된다. 항-SEMA4D 결합 분자, 항-플렉신B1 결합 분자, 또는 이들의 조합, 예를 들어, 항체, 또는 이의 항원 결합 단편, 변이체 또는 유도체의 투여 경로는 예를 들어 경구, 비경구 투여, 흡입에 의한 것 또는 국소 투여일 수 있다. 본원에서 사용될 때 비경구라는 용어는 예를 들어 정맥내, 동맥내, 복강내, 근육내, 피하, 직장 또는 질 투여를 포함한다. 모든 이러한 형태의 투여는 본 발명의 범주 이내 인 것으로 명백하게 고려되지만, 투여 형태의 예로는 주사용 용액, 특히 정맥내 또는 동맥내 주사 또는 점적용 용액이 있다. 주사용으로 적합한 제약 조성물은 완충제(예를 들어, 아세트이트, 포스페이트 또는 시트레이트 완충제), 계면활성제(예를 들어, 폴리소르베이트), 임의로 안정제(예를 들어, 인간 알부민) 등을 포함할 수 있다. 그런, 본원의 교시와 양립가능한 다른 방법에서, 항-SEMA4D 결합 분자, 항-플렉신B1 결합 분자, 또는 이들의 조합, 예를 들어, 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 변이체, 또는 유도체를 해로운 세포 집단의 부위에 직접적으로 전달함으로써 질환에 걸린 조직의 치료제에의 노출을 증가시킬 수 있다.

[0128] 본원에서 논의된 바와 같이, 항-SEMA4D 결합 분자, 항-플렉신B1 결합 분자, 또는 이들의 조합, 예를 들어, 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 변이체, 또는 유도체는 신경염증성 장애의 생체내 치료에 대하여 제약적 유효량으로 투여될 수 있다. 이와 관련하여, 개시된 결합 분자는 활성제의 투여를 돕고 활성제의 안정성을 촉진하도록 제형화될 수 있음을 알 것이다. 특정 실시 양태에서, 본 발명에 따른 제약 조성물은 제약상 허용되는 비독성 살균 담체, 예컨대 생리식염수, 비독성 완충제, 보존제 등을 포함한다. 본 출원의 목적상, 제약적 유효량의 항-SEMA4D 결합 분자, 항-플렉신B1 결합 분자, 또는 이들의 조합, 예를 들어, 항체, 또는 이의 항원 결합 단편, 변이체 또는 유도체는 표적에의 유효한 결합을 달성하고 이득을 달성하기에 충분한 양, 예를 들어 신경염증성 장애를 갖는 환자에 있어서 BBB의 투과성을 감소시키기에 충분한 양을 의미하는 것으로 의도된다.

[0129] 본 발명에서 사용되는 제약 조성물은 예를 들어 이온 교환자, 알루미늄, 스테아르산알루미늄, 레시틴, 혈청 단백질, 예컨대 인간 혈청 알부민, 완충제 물질, 예컨대 포스페이트, 글리신, 소르브산, 소르브산칼륨, 포화 식물 지방산들의 부분 글리세라이드 혼합물, 물, 염, 또는 전해질, 예컨대 프로타민 황산염, 인산수소이온나트륨, 인산수소칼륨, 염화나트륨, 아연염, 콜로이드성 실리카, 삼규산마그네슘, 폴리비닐 피롤리돈, 셀룰로오스 기재의 물질, 폴리에틸렌 글리콜, 소듐 카르복시메틸셀룰로오스, 폴리아크릴레이트, 왁스, 폴리에틸렌-폴리옥시프로필렌-블록 중합체, 폴리에틸렌 글리콜, 및 양모지를 포함하는 제약상 허용되는 담체를 포함한다.

[0130] 비경구 투여용 제제는 살균 수성 또는 비수성 용액, 현탁액 및 에멀전을 포함한다. 비수성 용매의 예로는 프로필렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 식물유, 예컨대 올리브유, 및 주사가능 유기 에스테르, 예컨대 에틸 올레이트가 있다. 수성 담체는 예를 들어 물, 알코올/수성 용액, 에멀전 또는 현탁액을 포함하며, 이는 염수 및 완충 매질을 포함한다. 본 발명에서, 제약상 허용되는 담체는 0.01-0.1 M, 바람직하게는 0.05 M의 포스페이트 완충제 또는 0.8% 염수를 포함하지만, 이로 한정되는 것은 아니다. 다른 일반적인 비경구용 비히클은 인산나트륨 용액, 링거 텍스트로스, 텍스트로스 및 염화나트륨, 유산화 링거, 또는 고정유를 포함한다. 정맥내용 비히클은 유체 및 영양소 보충제, 전해질 보충제, 예컨대 링거 텍스트로스를 기재로 하는 것 등을 포함한다. 예를 들어 항미생물제, 산화방지제, 킬레이팅제 및 불활성 가스 등과 같은 보존제 및 다른 첨가제가 또한 존재할 수 있다.

[0131] 더욱 특히는, 주사가능용으로 적합한 제약 조성물은 살균 수성 용액(수용성일 경우) 또는 분산액 및 살균 주사 가능 용액 또는 분산액의 즉석 제조를 위한 살균 분말을 포함한다. 그러한 경우에, 조성물은 살균성이어야 하며, 용이한 주입가능성이 존재하는 경우 유체이어야 한다. 이것은 제조 및 보관 조건 하에서 안정해야 하며, 바람직하게는 박테리아 및 진균류와 같은 미생물의 오염 작용에 대하여 보존된다. 담체는 예를 들어 물, 에탄올, 폴리올(예를 들어, 글리세롤, 프로필렌 글리콜, 및 액상 폴리에틸렌 글리콜 등) 및 이들의 적합한 혼합물을 함유하는 용매 또는 분산 매질일 수 있다. 적당한 유동성은 예를 들어 레시틴과 같은 코팅의 사용에 의해,

분산액의 경우 요구되는 입자 크기의 유지에 의해, 그리고 계면활성제의 사용에 의해 유지될 수 있다. 본원에 개시된 치료 방법에서 사용하기에 적합한 제형은 문헌[Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Publishing Co.) 16th ed. (1980)]에 기술되어 있다.

- [0132] 미생물 작용의 방지는 다양한 항균제 및 항진균제, 예를 들어, 파라벤, 클로로부탄올, 페놀, 아스코르브산, 티메로살 등에 의해 달성될 수 있다. 많은 경우에, 등장제, 예를 들어 당, 폴리알코올, 에컨대 만니톨, 소르비톨 또는 염화나트륨을 조성물 중에 포함시키는 것이 바람직하다. 주사가능 조성물의 장시간 흡수는 흡수를 지연시키는 에이전트, 예를 들어 모노스테아르산알루미늄 및 젤라틴을 조성물 중에 포함시킴으로써 초래될 수 있다.
- [0133] 임의의 경우에, 살균 주사가능 용액은 활성 화합물(예를 들어, 항-SEMA4D 항체, 또는 이의 항원 결합 단편, 변이체 또는 유도체를 홀로, 또는 다른 활성제와 조합하여)을 본원에 열거된 성분들 중 하나 또는 상기 성분들의 조합물과 함께 적절한 용매 중에 필요한 양으로 혼입시키고, 이어서 여과 살균함으로써 제조될 수 있다. 일반적으로, 분산액은 기본 분산 매질 및 상기에 열거된 것으로부터의 필요한 다른 성분들을 함유하는 살균 비히클 내에 혼입시킴으로써 제조된다. 살균 주사가능 용액 제조용 살균 분말의 경우에, 바람직한 제조 방법은 진공 건조 및 동결 건조이며, 이는 이전의, 이의 살균 여과 용액으로부터 활성 성분 + 임의의 추가의 요망되는 성분의 분말을 생성한다. 주사용 제제는 프로세싱되고, 용기, 예컨대 앰플, 백, 보틀, 시린지 또는 바이알 내에 충전되고, 무균 조건 하에서 밀봉되는데, 이는 당업계에 공지된 방법에 따른 것이다. 또한, 상기 제제는 키트의 형태로 패키징되어 판매될 수 있다. 이러한 제조 물품은 결부된 조성물이 소정 질환 또는 장애를 앓고 있거나 소정 질환 또는 장애에 걸리기 쉬운 대상체를 치료하는 데 유용함을 나타내는 라벨 또는 패키지 인서트를 가질 수 있다. 비경구 제형은 단회 볼루스 용량, 주입 또는 로딩 볼루스 용량, 이어서 유지 용량일 수 있다. 이들 조성물은 특정한 고정된 간격 또는 가변적 간격으로, 예를 들어 일일 1회, 또는 "필요한 경우"를 바탕으로 하여 투여될 수 있다.
- [0134] 본 발명에서 사용되는 특정 제약 조성물은 예를 들어 캡슐, 정제, 수성 현탁액 또는 용액을 포함하는 허용되는 투여 형태로 경구 투여될 수 있다. 특정 제약 조성물은 또한 비강 에어로졸 또는 흡입에 의해 투여될 수 있다. 그러한 조성물은 벤질 알코올 또는 다른 적합한 보존제, 생체이용률을 향상시키기 위한 흡수 촉진제, 및/또는 다른 통상적인 가용화제 또는 분산제를 이용하여 염수 중 용액으로서 제조될 수 있다.
- [0135] 담체 물질과 조합되어 단회 투여 형태를 생성하기 위한 항-SEMA4D 결합 분자, 항-플렉신B1 결합 분자, 또는 이들의 조합, 예를 들어, 항체, 또는 이의 단편, 변이체 또는 유도체의 양은 치료되는 숙주 및 특정 투여 양식에 따라 달라진다. 조성물은 단회 용량, 다회 용량으로 투여되거나 주입에 있어서 확립된 기간의 시간에 걸쳐서 투여될 수 있다. 투약 요법은 또한 최적의 요망되는 응답(예를 들어, 치료적 또는 예방적 응답)을 제공하도록 조정될 수 있다.
- [0136] 본 발명의 범주에 따르면, 항-SEMA4D 항체, 또는 이의 항원 결합 단편, 변이체 또는 유도체는 치료 효과를 생성하기에 충분한 양으로, 전술한 치료 방법에 따라 인간 또는 다른 동물에게 투여될 수 있다. 항-SEMA4D 항체, 또는 이의 항원 결합 단편, 변이체 또는 유도체는 공지된 기술에 따라 본 발명의 항체를 통상적인 제약상 허용되는 담체 또는 희석제와 조합함으로써 제조되는 통상적인 투여 형태로 그러한 인간 또는 다른 동물에게 투여될 수 있다. 당업계의 숙련자라면 제약상 허용되는 담체 또는 희석제의 형태 및 특성이, 이것과 조합될 활성 성분의 양, 투여 경로, 및 다른 공지된 변수에 의해 결정됨을 인식할 것이다. 당업계의 숙련자라면 항-SEMA4D 결합 분자, 항-플렉신B1 결합 분자, 또는 이들의 조합, 예를 들어, 본 발명의 항체, 또는 이의 항원 결합 단편, 변이체, 또는 유도체 중 하나 이상의 화학종을 포함하는 카테일이 사용될 수 있음을 또한 알 것이다.
- [0137] "치료적 유효 용량 또는 치료적 유효량" 또는 "유효량"은, 투여된 때, 치료될 질환을 갖는 환자의 치료와 관련하여 긍정적인 치료 응답, 예를 들어 BBB 투과성의 감소, BBB의 저항률의 증가, BBB 상에 존재하는 내피 세포의 수, 밀도 또는 농도의 증가, 내피 세포의 형태 또는 기능의 변화, 또는 BBB를 형성하는, 내피 세포들간의 또는 성상 세포들간의 상호작용 또는 내피 세포와 성상 세포 사이의 상호작용의 변화를 초래하는 항-SEMA4D 결합 분자, 항-플렉신B1 결합 분자, 또는 이들의 조합, 예를 들어, 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 변이체 또는 유도체의 양을 의도한다.
- [0138] BBB 투과성 감소에 있어서의 본 발명의 조성물의 치료적 유효 용량은 투여 수단, 표적 부위, 환자가 인간이든지 동물이든지 간에 환자의 생리학적 상태, 투여되는 다른 의약, 및 치료가 예방적인지 치료적인지를 포함하는 많은 상이한 인자에 따라 달라진다. 특정 실시 양태에서, 환자는 인간이지만, 트랜스제닉 포유류를 포함하는 비인간 포유류도 치료될 수 있다. 치료제 투여량은 안전성 및 효능을 최적화하기 위하여 당업계의 숙련자에게 공지된 일상적인 방법을 이용하여 적정될 수 있다.

- [0139] 하나 이상의 항-SEMA4D 결합 분자, 항-플렉신B1 결합 분자, 또는 이들의 조합, 예를 들어, 항체 또는 이의 결합 단편, 변이체 또는 유도체의 투여량은 본 발명의 개시 내용이 주어질 경우 지나친 실험 없이 당업계의 숙련자에 의해 쉽게 결정된다. 하나 이상의 항-SEMA4D 결합 분자, 항-플렉신B1 결합 분자, 또는 이들의 조합, 예를 들어, 항체, 이의 항원 결합 단편, 변이체 또는 유도체의 투여 양식 및 각각의 양에 영향을 주는 인자는 질환의 중증도, 병력, 및 치료법을 겪고 있는 개체의 연령, 키, 중량, 건강, 및 신체 상태를 포함하지만, 이로 한정되는 것은 아니다. 이와 유사하게, 항-SEMA4D 결합 분자, 항-플렉신B1 결합 분자, 또는 이들의 조합, 예를 들어, 항체, 또는 이의 단편, 변이체 또는 유도체의 투여량은 투여 양식 및 대상체가 단회 용량의 이 에이전트를 겪을 것인지 다회 용량의 이 에이전트를 겪을 것인지에 따라 달라진다.
- [0140] 또한 본 발명은 신경염증성 장애 치료를 위한 대상체 치료용 의약의 제조에 있어서의 항-SEMA4D 결합 분자, 항-플렉신B1 결합 분자, 또는 이들의 조합, 예를 들어, 본 발명의 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 변이체 또는 유도체의 용도를 제공하며, 여기서, 상기 의약은 하나 이상의 다른 치료법으로 예비치료된 대상체에서 사용된다. "예비치료된" 또는 "예비치료"는 항-SEMA4D 결합 분자, 항-플렉신B1 결합 분자, 또는 이들의 조합, 예를 들어, 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 변이체 또는 유도체를 포함하는 의약을 받기 이전에 대상체가 하나 이상인 다른 치료법을 받았음을(예를 들어, 하나 이상의 다른 신경염증 치료법으로 치료되었음을) 의도한다. "예비치료된" 또는 "예비치료"는, 항-SEMA4D 결합 분자, 예를 들어, 본원에 개시된 단클론 항체 VX15/2503, 또는 이의 항원 결합 단편, 변이체 또는 유도체를 포함하는 의약을 이용한 치료의 개시 이전에 2년 이내에, 18개월 이내에, 1년 이내에, 6개월 이내에, 2개월 이내에, 6주 이내에, 1개월 이내에, 4주 이내에, 3주 이내에, 2주 이내에, 1주 이내에, 6일 이내에, 5일 이내에, 4일 이내에, 3일 이내에, 2일 이내에, 또는 심지어 1일 이내에 하나 이상의 다른 치료법으로 치료된 대상체를 포함한다. 대상체는 이전의 치료법(들)을 이용한 예비치료에 대한 응답자일 필요는 없다. 따라서, 항-SEMA4D 결합 분자, 항-플렉신B1 결합 분자, 또는 이들의 조합, 예를 들어, 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 변이체 또는 유도체를 포함하는 의약을 받는 대상체는 이전의 치료법을 이용한 예비치료에 대하여 또는 예비치료가 다수의 치료법을 포함한 경우 이전의 치료법들 중 하나 이상에 대하여 응답하였을 수 있거나 응답하지 못하였을 수 있다.
- [0141] 본 발명의 실시는, 달리 나타내지 않으면, 세포 생물학, 세포 배양, 분자 생물학, 트랜스제닉 생물학, 미생물학, 재조합 DNA, 및 번역학의 통상적인 기술을 이용하는데, 이는 당업계의 기술 이내이다. 그러한 기술은 문헌에 충분히 설명되어 있다. 예를 들어, 문헌[Sambrook et al., ed. (1989) *Molecular Cloning A Laboratory Manual* (2nd ed.; Cold Spring Harbor Laboratory Press)]; 문헌[Sambrook et al., ed. (1992) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, (Cold Springs Harbor Laboratory, NY)]; 문헌[D. N. Glover ed., (1985) *DNA Cloning*, Volumes I and II]; 문헌[Gait, ed. (1984) *Oligonucleotide Synthesis*]; 물리스(Mullis) 등의 미국 특허 제4,683,195호; 문헌[Hames and Higgins, eds. (1984) *Nucleic Acid Hybridization*; Hames and Higgins, eds. (1984) *Transcription And Translation*]; 문헌[Freshney (1987) *Culture Of Animal Cells* (Alan R. Liss, Inc.)]; 문헌[*Immobilized Cells And Enzymes* (IRL Press) (1986)]; 문헌[Perbal (1984) *A Practical Guide To Molecular Cloning*]; 문헌[the treatise, *Methods In Enzymology* (Academic Press, Inc., N.Y.)]; 문헌[Miller and Calos eds. (1987) *Gene Transfer Vectors For Mammalian Cells*, (Cold Spring Harbor Laboratory)]; 문헌[Wu et al., eds., *Methods In Enzymology*, Vols. 154 and 155]; 문헌[Mayer and Walker, eds. (1987) *Immunochemical Methods In Cell And Molecular Biology* (Academic Press, London)]; 문헌[Weir and Blackwell, eds., (1986) *Handbook Of Experimental Immunology*, Volumes I-IV]; 문헌[*Manipulating the Mouse Embryo*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., (1986)]; 및 문헌[Ausubel et al. (1989) *Current Protocols in Molecular Biology* (John Wiley and Sons, Baltimore, Md.)]을 참조한다.
- [0142] 항체 엔지니어링의 일반 원리는 문헌[Borrebaeck, ed. (1995) *Antibody Engineering* (2nd ed.; Oxford Univ. Press)]에 개시되어 있다. 단백질 엔지니어링의 일반 원리는 문헌[Rickwood et al., eds. (1995) *Protein Engineering, A Practical Approach* (IRL Press at Oxford Univ. Press, Oxford, Eng.)]에 개시되어 있다. 항체 및 항체-합텐(hapten) 결합의 일반 원리는 문헌[Nisonoff (1984) *Molecular Immunology* (2nd ed.; Sinauer Associates, Sunderland, Mass.)]; 및 문헌[Steward (1984) *Antibodies, Their Structure and Function* (Chapman and Hall, New York, N.Y.)]에 개시되어 있다. 부가적으로, 문헌[*Current Protocols in Immunology*, John Wiley & Sons, New York; Stites et al., eds. (1994) *Basic and Clinical Immunology* (8th ed; Appleton & Lange, Norwalk, Conn.)] 및 문헌[Mishell and Shiigi (eds) (1980) *Selected Methods in Cellular Immunology* (W.H. Freeman and Co., NY)]에서와 같이 당업계에 공지된 그리고 구체적으로 기술되지

않은 면역학의 표준 방법을 일반적으로 따른다.

- [0143] 면역학의 일반 원리를 개시하는 표준 참조 문헌은 문헌[Current Protocols in Immunology, John Wiley & Sons, New York; Klein (1982) J., Immunology: The Science of Self-Nonself Discrimination (John Wiley & Sons, NY)]; 문헌[Kennett et al., eds. (1980) Monoclonal Antibodies, Hybridoma: A New Dimension in Biological Analyses (Plenum Press, NY)]; 문헌[Campbell (1984) "Monoclonal Antibody Technology" in Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, ed. Burden et al., (Elsevier, Amsterdam)]; 문헌 [Goldsby et al., eds. (2000) Kuby Immunology (4th ed.; H. Freeman & Co.)]; 문헌[Roitt et al. (2001) Immunology (6th ed.; London: Mosby)]; 문헌[Abbas et al. (2005) Cellular and Molecular Immunology (5th ed.; Elsevier Health Sciences Division)]; 문헌[Kontermann and Dubel (2001) Antibody Engineering (Springer Verlag)]; 문헌[Sambrook and Russell (2001) Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Press); Lewin (2003) Genes VIII (Prentice Hall 2003)]; 문헌[Harlow and Lane (1988) Antibodies: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Press)]; 문헌[Dieffenbach and Dveksler (2003) PCR Primer (Cold Spring Harbor Press)]을 포함한다.
- [0144] 상기에 인용된 모든 참고 문헌과, 그 안에 인용된 모든 참고 문헌은 그 전체가 본원에 참고로 포함된다.
- [0145] 하기 실시예는 예시로서 제공되며 한정하는 것으로서 제공되는 것은 아니다.
- [0146] 실시예
- [0147] 하기 실시예는 생체내 EAE 모델에서만 아니라 시험관내 DIV-BBB 모델에서도 BBB의 파괴의 감소 또는 방지, 즉, BBB 투과성의 감소에 있어서의 항-SEMA4D 항체(VX15/2503)의 효능을 입증한다. 생체내 알츠하이머병 모델 실험도 본원에서 개시한다. 시험관내 DIV-BBB 모델에 관한 철저한 설명은 예를 들어 문헌[Cucullo et al., Brain Research. 951 243-254 (2002)]; 및 문헌[Cucullo et al., Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism. 1-11 (2010)]에서 발견할 수 있다. 생체내 EAE 및 알츠하이머병 모델은 예를 들어, 각각 문헌 [Miller et al., Curr Protoc Immunol. CHAPTER: Unit-15.1, 2007]; 문헌[Colton et al., J Alzheimers Dis 15:571-587, 2008] 및 문헌[Wilcock et al., J. Neuroscience, 29:7957-7965, 2009]에 개시되어 있다.
- [0148] **실시예 1:** 시험관내 DIV-BBB 모델에서 BBB의 SEMA4D 유도된 파괴 후 항-SEMA4D 결합 분자, 예를 들어, 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 변이체 또는 유도체, 예를 들어, VX15/2503이 BBB의 완전성을 복구하는 능력의 테스트
- [0149] **실험 설계.** 동력학적 시험관내 BBB("DIV-BBB") 모델을 수행하여 BBB의 완전성에 대한 재조합 인간 SEMA4D(huSEMA4D-his) 및 VX15/2503(그 전체가 본원에 참고로 포함된 미국 특허 공개 제2010/0285036 A1호에 상세하게 기술됨)의 영향을 연구하였다. 2개의 DIV-BBB 카트리지를 상기 모델에서 테스트하였다. 기본 실험 설계를 도 1에 나타낸다. 증가하는 농도의 재조합 SEMA4D(rSEMA4D)를 12시간 간격으로 관강 내에 첨가하여 평형화시켰다(대략 12시간/농도). 처음에 rSEMA4D를 0의 시점에 0.05  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 관강 내에 첨가하였다. rSEMA4D의 농도를 각각의 간격으로 10배만큼, 예를 들어 12시간에 0.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 24시간에 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 및 36시간에 50.0  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 만큼 증가시켰다. TEER 측정치는 rSEMA4D의 다양한 농도에서의 BBB의 투과성의 변화를 반영하는 것으로서 각각의 간격 사이에 취하였다. 36시간에 50.0  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 rSEMA4D의 최종 용량의 첨가 후, VX15/2503을 48시간에 250  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 관강 내에 첨가하였다. VX15/2503을 첨가한지 24시간 후인 72시간에, BBB 투과성을 다시 측정하였다. 경내피세포 전기 저항 측정(TEER)을 이용하여 BBB의 완전성을 실시간으로 모니터링하였다. 상기에 언급된 바와 같이, TEER 시스템은 빠르게 연속으로 다수의 카트리지를 측정하기 위하여 전자적 다중송신을 이용하며, 조직 배양 이중층의 완전성 및 생육성을 신속하게 그리고 신뢰성 있게 평가한다(문헌[Cucullo et al., 2002]; 문헌[Santaguida et al., 2006]). 이러한 동력학적 시험관내 모델에 있어서, 혈뇌 장벽을 나타내기 위하여 카트리지, 또는 중공관을 셋업하였으며, 이때 카트리지의 내부는 혈뇌 장벽의 혈액쪽을 나타내고, 카트리지의 외부는 혈뇌 장벽의 뇌쪽을 나타낸다. 카트리지의 내부를 성인 뇌 미세혈관 내피 세포로 라이닝하고, 외부를 성인 성상 세포로 라이닝하였다. 혈뇌 장벽 변형체, 예컨대 SEMA4D를 카트리지의 관강 내에 도입할 때, 관의 내부와 외부 사이의 전류를 TEER을 사용하여 모니터링하였다. 작동에 있어서, TEER 시스템은 관강 구획 및 관강외 구획 내의 각각의 카트리지 내에 삽입된 여기 전극들을 가로질러서 여기 전압(0.06 V)을 인가한다. 마이크로컨트롤러는 물리적 파라미터로부터 장벽의 저항률 및 전기 용량( $\text{cm}^2$ 당)을 컴퓨터로 계산한다. 전기 용량 값은 전압 및 전류 파형의 비교에 의해 계산한다. 두 파형의 피크-피크로부터의 지연은 전기 용량 값에 비례하는데, 이는 아치 장력으로 표현된다. TEER은 각각의 실험 코스 전체에 걸쳐 초기 셋업으로부터 측정하였다.
- [0150] **BBB 투과성의 rSEMA4D 유도된 증가.** BBB의 형성 후, BBB의 완전성에 대한 rSEMA4D의 영향은 증가하는 농도의 재

조합 SEMA4D(rSEMA4D)를 2개의 카트리지의 관강 내에 첨가함으로써 측정하였다. 처음에 rSEMA4D를 0의 시점에 0.05  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 관강 내에 첨가하였다. rSEMA4D의 농도를 각각의 12시간 간격으로 10배, 예를 들어 12시간에 0.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 24시간에 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 및 36시간에 50.0  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 증가시켰다. TEER 측정치는 rSEMA4D의 다양한 농도에서의 BBB의 투과성의 변화를 반영하는 것으로서 각각의 간격 사이에 그리고 각각의 간격 동안 취하였다. BBB의 전체 투과성은 0.05  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 rSEMA4D에서 비교적 안정하게 남아 있었다. 0.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 출발하여, 증가하는 농도의 rSEMA4D(즉, 0.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  및 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )는 TEER 측정치를 감소시켰으며, 이는 내피 세포 층의 투과성 증가를 반영하는 것이었다. 이들 결과를 도 2에 나타낸다.

[0151] **rSEMA4D 처리된 BBB의 투과성의 항체 유도된 감소.** 증대되는 투여량의 rSEMA4D에의 노출 후, BBB에 대한 항-SEMA4D 항체의 영향을 측정하기 위하여, VX15/2503을 48시간에 250  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 첨가하였다. TEER 측정치를 72시간에 취하였다. VX15/2503으로 처리하면 2개의 카트리지에 있어서 총체적으로 BBB의 투과성이 감소하였다 (BBB의 저항률이 증가하였다). 이러한 투과성 감소는 BBB의 복구를 반영한다. 그 결과를 도 2에 나타낸다.

[0152] **실시예 2:** 시험관내 DIV-BBB 모델에서 BBB의 SEMA4D 유도된 파괴 후 항-SEMA4D 결합 분자, 예를 들어, 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 변이체 또는 유도체, 예를 들어, VX15/2503이 BBB의 완전성을 복구하는 능력의 테스트

[0153] **실험 설계.** 시험관내 DIV-BBB 모델을 이용한 제2 실험을 수행하여 BBB의 완전성에 대한 SEMA4D 및 VX15/2503의 영향을 연구하였다. 기본 실험 설계는 상기 실시예 1 및 도 1에 나타난 것과 유사하였다. 2주 동안, DIV-BBB 카트리지는 내피 세포 구획 및 성상 세포 구획에서 BBB 형성을 겪었다. TEER에서 반영되는 BBB의 형성을 도 3 및 도 4에 나타낸다.

[0154] **BBB 투과성의 rSEMA4D 유도된 증가.** BBB의 형성 후, BBB의 완전성에 대한 rSEMA4D의 영향은 증가하는 농도의 재조합 SEMA4D(rSEMA4D)를 3개의 카트리지의 세트의 제1 카트리지의 관강 내에 12시간 간격으로 첨가하여 평형시킴으로써 측정하였다(대략 12시간/농도). 처음에 rSEMA4D를 0의 시점에 0.05  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 관강 내에 첨가하였다. rSEMA4D의 농도를 각각의 간격으로 10배만큼, 예를 들어 12시간에 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 및 24시간에 50.0  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 증가시켰다. TEER 측정치는 rSEMA4D의 다양한 농도에서의 BBB의 투과성의 변화를 반영하는 것으로서 각각의 간격 사이에 취하였다. 총체적으로 증가하는 농도의 rSEMA4D는 TEER 측정치를 감소시켰으며, 이는 BBB 투과성 증가를 반영하는 것이었다. 이들 결과를 도 3에 나타낸다.

[0155] 내피 세포 층을 표적화하지 않는 항원의 존재 하에서의 BBB의 완전성의 테스트를 위하여, 유사하게 제조된 재조합 단백질 대조구(CTRL, C35 단백질)를 상기 12시간 간격으로 등몰 농도로 2개의 추가의 대조 카트리지에 첨가하였다(즉, 0의 시점에 0.25  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 12시간에 2.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 및 24시간에 25.0  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ). rSEMA4D의 영향과는 대조적으로, CTRL 단백질은 TEER의 유의한 변화를 유도하지 않았으며, 이는 BBB 투과성의 유의미한 변화가 없음을 반영하는 것이었다. 그러나, 최고 농도의 CTRL 단백질을 첨가한지 12시간 후에 50.0  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 rSEMA4D를 첨가할 경우, 증대되는 용량의 rSEMA4D에서 관찰된 것과 유사한 급속한 TEER 감소가 유도되었다. 그 결과를 도 4에 나타낸다.

[0156] **rSEMA4D 처리된 BBB의 투과성의 항체 유도된 감소.** 24시간에 50.0  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 최종 용량의 rSEMA4D에의 첨가 후, BBB의 TEER 및 투과성에 대한 VX15/2503의 영향을 측정하였다. 도 3에서, VX15/2503 항체를, 증대되는 용량의 rSEMA4D를 받은 3개의 카트리지 중 2개의 카트리지에 36시간에 250  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 첨가하는 한편, 동일 농도의 이소타입 대조 항체를, 증대되는 용량의 rSEMA4D를 받은 나머지 하나의 카트리지에 첨가하였다. TEER 측정치를 다양한 후속 시점에 취하였다. VX15/2503으로 처리하면 TEER이 실험 시작시의 피크 수준으로 다시 증가하였으며, 이는 총체적인 BBB 투과성 감소(즉, BBB의 복구)를 반영하는 것이었다. 이소타입 대조 항체를 받은 상기 하나의 카트리지에서, TEER 수준은 rSEMA4D를 이용한 처리에 의해 유도된 비교적 감소된 수준으로 남아 있었으며, 이는 BBB 투과성의 유의미한 감소가 없음을 나타내는 것이었다. 유사한 결과를 도 4에 나타낸다. 도 4에서, 초기 대조 재조합 C35 단백질, 이어서 12시간에 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 rSEMA4D를 받은 2개의 카트리지에 48시간에 250  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 VX15/2503 항체를 첨가하였다. VX15/2503으로 처리하면 TEER이 실험 시작시의 피크 수준으로 다시 증가하였으며, 이는 총체적인 BBB 투과성 감소(즉, BBB의 복구)를 반영하는 것이었다.

[0157] **실시예 3:** 시험관내 DIV-BBB 모델에서 BBB의 SEMA4D 유도된 파괴 후 항-플렉신-B1 결합 분자, 예를 들어, 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 변이체 또는 유도체가 BBB의 완전성을 복구하는 능력의 테스트

[0158] 또 다른 연구를 행하여 BBB의 완전성에 대한 항-플렉신-B1 항체(MAB37491 인간 플렉신-B1 MAb(클론 559830), 알앤디 시스템즈(R&D Systems))의 영향을 측정하였다. 이 항체는 SEMA4D가 플렉신-B1 수용체에 결합하는 것을 차단한다. 이 연구의 결과를 도 5에 나타낸다. 도 5에 나타난 바와 같이, 4개의 DIV-BBB 카트리지 내의 인간 내피

세포 및 성상 세포는 상기에 기술한 실험과 유사한 BBB 형성을 겪었다. BBB 형성 후, rSEMA4D를 50.0  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 첨가하여 BBB 투과성 증가(즉, BBB의 파괴)를 유도하였다. rSEMA4D의 첨가 후, 항-플렉신-B1 항체를 상기 4개의 카트리지 중 2개의 카트리지에 6시간에 125  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 첨가하고, VX15/2503 항체를 상기 4개의 카트리지 중 1개의 카트리지에 250  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 첨가하고, 이소타입 대조 항체를 나머지 카트리지에 250  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 첨가하였다. TEER 측정치를 다양한 후속 시점에서 취하였다. VX15/2503 또는 항-플렉신-B1 항체 중 어느 하나로 처리하면 이들 둘 모두의 에이전트에 의해 TEER 수준이 증가하였다. VX15/2503으로 처리하면 마지막 시점에서 항-플렉신-B1 항체를 이용한 처리보다 TEER이 다소 더 크게 증가하였다. 상기 2가지의 항체의 영향은 모든 다른 시점에서는 구별할 수 없다. TEER의 증가는 VX15/2503 또는 항-플렉신-B1 항체 중 어느 하나의 존재 하에서의 총체적인 BBB 투과성 감소(즉, BBB의 복구)를 반영한다. 이소타입 대조 항체를 받은 상기 1개의 카트리지에서, TEER 수준은 rSEMA4D를 이용한 처리에 의해 유도된 비교적 감소된 수준으로 남아 있었으며, 이는 BBB 투과성의 유의미한 감소가 없음을 나타내는 것이었다. VX15/2503과 항-플렉신-B1의 조합물을 이용하여 처리를 또한 행할 수 있음을 알아야 한다.

- [0159] **실시예 4:** 시험관내 DIV-BBB 모델에서 활성화된 PBMC 및 유동 중단에 의해 유도된 BBB의 파괴 후 항-SEMA4D 결합 분자, 예를 들어, 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 변이체 또는 유도체, 예를 들어 VX15/2503이 BBB의 완전성을 복구하는 능력의 테스트
- [0160] **실험 설계.** 활성화된 말초 혈액 단핵 세포(PBMC) 및 유동 중단에 의해 유도된 BBB의 파괴 후 BBB의 완전성에 대한 VX15/2503의 영향을 연구하기 위하여 시험관내 DIV-BBB 모델을 이용한 또 다른 실험을 수행하였다. 2주 동안, 2개의 DIV-BBB 카트리지는 내피 세포 구획 및 성상 세포 구획에서 BBB 형성을 겪었다.
- [0161] **활성화된 PBMC 유도된 BBB 투과성 증가.** BBB의 형성 후, BBB의 완전성에 대한 활성화된 PBMC의 영향을 측정하였다. PBMC를 PMA/이노마이신을 이용하여 2시간 동안 활성화시키고, 그 후, 2개의 카트리지의 관강 내에 10<sup>6</sup>개/ml의 농도로 첨가하였다. BBB 투과성 변화를 반영하는 것으로서 TEER 측정치를 활성화된 PBMC의 첨가 전 및 후에 취하였다. 총체적으로, 활성화된 PBMC를 상기 카트리지에 10<sup>6</sup>개/ml로 첨가하면 TEER 측정치가 감소하였으며, 이는 BBB 투과성 증가를 반영하는 것이었다. 이들 결과를 도 6에 나타낸다.
- [0162] 활성화된 PBMC를 카트리지에 첨가한지 대략 2 내지 4시간 후에, 유동 중단을 1시간 동안 수행하였다. BBB 투과성 변화를 반영하는 것으로서 TEER 측정치를 유동 중단 전 및 후에 취하였다. 총체적으로, 유동 중단은 TEER 측정치를 추가로 감소시켰으며, 이는 BBB 투과성 증가를 반영하는 것이었다. 이들 결과도 도 6에 나타낸다.
- [0163] **활성화된 PBMC에 노출된 BBB의 투과성의 항체 유도된 감소.** 활성화된 PBMC에의 노출 및 유동 중단 후, BBB의 투과성 및 TEER에 대한 VX15/2503의 영향을 측정하였다. VX15/2503 항체를, 활성화된 PBMC를 받은 2개의 카트리지 중 1개의 카트리지에 250  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 첨가하는 한편, 동일 농도의 이소타입 대조 항체(이소타입 대조 Ig, 2269)를 나머지 카트리지에 첨가하였다. TEER 측정치를 다양한 후속 시점에 취하였다. 도 6에 나타낸 바와 같이, VX15/2503으로 처리하면 TEER이 실험 시작시의 피크 수준으로 다시 증가하였으며, 이는 총체적인 BBB 투과성 감소(즉, BBB의 복구)를 반영하는 것이었다. 이소타입 대조 항체를 받은 카트리지에서, TEER 수준은 활성화된 PBMC를 이용한 처리 및 유동 중단에 의해 유도된 비교적 감소된 수준으로 남아 있었으며, 이는 BBB 투과성의 유의미한 감소가 없음을 나타내는 것이었다.
- [0164] **실시예 5:** 생체내 EAE 모델에서 항-SEMA4D 결합 분자, 예를 들어, 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 변이체 또는 유도체, 예를 들어, VX15/2503이 BBB의 완전성을 보호하는 능력의 테스트
- [0165] 항-SEMA4D 결합 분자, 예를 들어, 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 변이체 또는 유도체, 예를 들어, VX15/2503을 자가면역성 뇌척수염(EAE)의 생체내 실험 모델에서 테스트하였다.
- [0166] 생체내 EAE 모델에서, 혈액으로부터의 뇌 실질 내로의 피브리노겐의 투과에서 반영되는 뇌 투과성의 변화의 조사에 의해 그리고 클라우딘-5를 비롯한 내피 밀착 결합부 단백질의 조사를 통하여 BBB의 파괴를 연구하였다. 이 모델에서, PLP 펩티드(139-151)를 이용한 면역화에 의해 EAE를 마우스에서 유도하였다. 물론, 당업계에서 숙련자라면, 다른 EAE 유도 단백질도 사용될 수 있으며(예를 들어, 마이엘린 항원, 예를 들어 마이엘린-올리고덴드로사이트 당단백질 펩티드 35-55) 최고 효율을 위해서는 이들 유도 단백질 또는 펩티드가 종마다 그리고 마우스의 주(strain)마다 다를 수 있음을 알 것이다(문헌[Steinman, L. Neuron 24:511-514 (1999)]). 그 후, 상이한 병기의 동물의 중추 신경계(CNS)로부터의 조직 섹션을 단백질(BBB 붕괴에 대한 마커로서의 역할을 하는 피브리노겐 및 클라우딘-5)에 대하여 면역염색하였다.

- [0167] **실험 설계.** 생체내 EAE 모델에서, 완전 프로인트 아주반트(CFA) 중 PLP 펩티드(139-151)를 이용한 면역화에 의해 12주령의 SJL/J 마우스(군당 10마리의 마우스)에서 EAE를 유도하였다. 그 후, 상기 마우스를 유도한지 7일 후로부터 주당 1회, 600  $\mu$ g의 항-SEMA4D 항체(VX15/2503 항체) 또는 대조 IgG로 처리하였다. 유도한지 11일 후(dpi) 신경학적 징후가 처음으로 관찰되었다. 유도한지 13일 후, 질환의 급성기 동안, 군당 4마리의 마우스를 희생시키고, 요수 샘플들을 병리조직학적 분석을 위하여 준비하였다. 상기 샘플들에서 BBB 붕괴를 검출하기 위하여, 이들 샘플을 피브리노겐 및 클라우딘-5에 대하여 면역염색하였다. 면역염색 절차는 하기와 같다: 섹션들을 PBS에서 2회 행구고, 그 후 PBS 0.1% 글리신에서 10분 동안 인큐베이션하고, PBS 0.3% 트리톤(Triton) X-100 10% 염소 혈청에서 1시간 동안 차단시키고, 차단 완충제 중 일차 Ab와 함께 4°C에서 하룻밤 인큐베이션하였다. 클라우딘-5(CLN-5)에 있어서, 차단 전에, 섹션들을 100°C의 pH 8의 EDTA에 침지시켰다. 사용한 일차 항체는 항-CLN-5(1:50), 및 항-피브리노겐(1:1,000)이었다. 그 후, PBS 0.3%, 트리톤 X-100에서 3회 세척한 후, 섹션들을 그 후 차단 완충제 중 알렉사플루오르(AlexaFluor) 488 및/또는 알렉사플루오르 594에 콘주게이션된 관련 중 특이적 이차 항체(1/100; 몰레큘러 프로브즈)에서 25°C에서 1시간 동안 인큐베이션하고, 다시 3회 세척하고, 4,6-디아미디노-2-페닐인돌(DAPI)로 대조 염색하였다. 악시오버트(Axiovert) 200 도립 형광 현미경에 부착된 차이스(Zeiss) LSM 510 META 레이저 스캐닝 공초점 시스템을 사용하여 모든 샘플을 조사하고 사진을 촬영하였다.
- [0168] 마우스에서의 임상 질환을 하기와 같이 스코어링하였다: 0= 증상 없음; 1= 축 늘어진 꼬리; 2= 뒷다리의 허약; 4= 앞다리 및 뒷다리의 허약; 5= 사망. 처음에 신경학적 징후는 유도한지 11일 후에 관찰되었다. VX15/2503 항체로 처리된 마우스에서, 임상 질환은 경증의 꼬리 허약을 나타내는 0.75의 평균 중증도 스코어에 도달한 반면, 대조군의 마우스에서의 임상 질환은 부전 마비를 나타내는 2.25의 평균 중증도 범주에 도달하였다.
- [0169] 유도한지 13일 후의 면역염색의 결과를 도 7a 내지 도 7c에 나타낸다. 피브리노겐은 보통은 혈뇌 장벽(BBB)을 투과하지 않는다. BBB가 손상된 EAE에서, 녹색 피브리노겐 염색이 뇌 물질에서 검출되었다(좌측 패널). 게다가, BBB를 구성하는 밀착 결합부의 성분인 클라우딘-5(CLN-5, 적색 염색)의 발현이 감소되었다. 대조군의 마우스는 클라우딘-5의 발현 감소 및 피브리노겐의 혈관의 누출의 수준의 증가를 나타냈는데, 이는 BBB의 붕괴와 상관되었다. 반면에, VX15/2503 항체로 처리된 마우스에서, 클라우딘-5의 발현은 유지되었으며, 피브리노겐 누출은 유의하게 감소되었다. 이들 결과는 이들 처리된 마우스에서 BBB의 붕괴에 대한 VX15/2503 항체의 보호 효과를 입증하였으며, 어떻게 항-SEMA4D 항체가 BBB 파괴를 방지하고, 피브리노겐의 혈관의 누출을 방지하고(도 7a의 좌측 패널, 및 도 7b에서의 정성화), 적색 염색에 의해 검출되는 클라우딘-5를 보존하는지를 구체적으로 입증하였다(도 7a의 우측 패널, 그리고 도 7c에서의 정성화).
- [0170] **실시예 6:** 뇌 내피 세포의 배양물 중 밀착 결합부 단백질에 대한 SEMA4D의 영향
- [0171] **실험 설계.** CNS 유래된 내피 세포를 가용성 재조합 SEMA4D를 이용하여 처리한 후 핵심 내피 밀착 결합부 단백질 클라우딘-5의 발현을 조사하였다. 이 모델에서, 일차 마우스 중추 신경계(CNS) 내피 배양물을 단리하고, 6웰 매트릭스(matrigel) 코팅 플레이트 상에 도말하였다(10개의 뇌로부터의 단리된 MBCEC를 3 ml의 일차 내피 세포 배양 배지 중에 재현탁하고, 웰당 250  $\mu$ l로 도말하였다). 단리한지 7일 후에 배양물을 사용하였다. 배양물을 1 ng/ml, 10 ng/ml 또는 100 ng/ml의 재조합 마우스 SEMA4D 또는 100 ng/ml의 마우스 VEGF-A(양성 대조구)로 24 시간 동안 처리하였다. 그 후, 상기 동물의 내피 배양물들을 SDS-폴리아크릴아미드 겔 전기영동(SDS-PAGE)하고, 클라우딘-5 밀착 결합부 단백질 및 액틴 로딩 대조구에 대하여 면역블로팅하였다. 데이터를 스캐닝하고, 이미지(Image) J 소프트웨어(엔아이에이치(NIH))를 사용하여 농도 측정을 하였다.
- [0172] 면역블로팅 결과를 도 8에 나타낸다. 도 8에 제공된 바와 같이, 100 ng/ml의 재조합 SEMA4D로 처리된 내피 세포 배양물은 클라우딘-5 단백질 발현의 유의한 감소를 나타냈다. 100 ng/ml의 VEGF-A로 처리된 내피 세포 배양물을 클라우딘-5의 하향 조절에 대한 양성 대조구로서 테스트하였다. 이는 BBB의 핵심 밀착 결합부 단백질의 발현 조절에 있어서의 SEMA4D의 중요한 역할을 입증한다.
- [0173] **실시예 7:** 생체내 알츠하이머병(AD) 모델에서 항-SEMA4D 또는 항-플렉신B1 결합 분자, 예를 들어, 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 변이체 또는 유도체가 BBB 투과성을 감소시키는 능력의 테스트
- [0174] 항-SEMA4D 또는 항-플렉신B1 결합 분자, 예를 들어, 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 변이체 또는 유도체, 예를 들어, MAbs 67(그 전체가 본원에 참고로 포함된 미국 특허 공개 제2010/0285036 A1호에 상세하게 기술됨)을 알츠하이머병(AD) 생체내 실험 트랜스제닉 마우스 모델 APPSwDI/NOSC<sup>-/-</sup>를 포함하지만 이로 한정되는 것은 아닌 신경염증성 장애의 다양한 모델 시스템에서 테스트한다. 이들 마우스는 APP-스웨디쉬(Swedish)-더치(Dutch)-아이오와(Iowa) 돌연변이 마우스를 산화질소 신타아제 2 녹아웃 마우스와 교배함으로써 생성하였다(문헌[Colton et

al., J Alzheimers Dis. 15:571-587, 2008]; 문헌[Van Nostrand et al., Stroke 41 :S135-S138, 2010]). APPSwDI/NOSC<sup>-/-</sup> 마우스는 BBB 기능의 붕괴, 실질내 아밀로이드 플라크, 마우스 tau 과잉 인산화, 신경염증, 뉴런 세포사, 및 인지 장애와 함께 연령 관련된 신경혈관 아밀로이드증이 발병한다. 윌코크(Wilcock) 등은 APPSwDI/NOSC<sup>-/-</sup> 마우스를 아밀로이드-베타 유도된 능동 면역요법으로 처리하면 아밀로이드 침착이 두드러지게 감소하지만, 이때 미세출혈의 발생이 증가한다(문헌[Wilcock et al., J Neurosci. 29:7957-7965, 2009]).

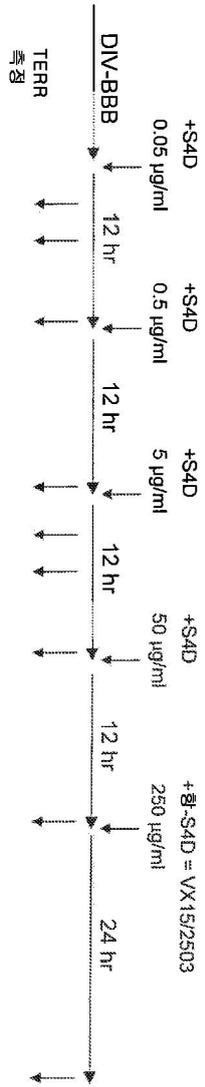
[0175] 생체내 AD 모델에서, AD의 진행은 아밀로이드 침착, tau 과잉 인산화, 및 BBB 누출(피브리노겐)의 면역조직화학적 시그니처(signature)를 조사함에 의해 연구하며, 이외에도, 공간 기억 기반의 행동 파라다임에서의 인지 능력을 평가함에 의해 연구한다. 이 모델에서, 트랜스제닉 마우스에게 MA67 또는 대조 Ig(Mab 2B8)를 26주령으로부터 38주령까지 총 13회의 용량에 있어서 30 mg/kg의 농도로 정맥내 투여한다.

[0176] 처음에 마우스는 10 내지 12주령에서 기저선 행동 테스트, 예를 들어, 오픈 필드(Open field), RA Wn 및 바네스 메이즈(Barnes Maze) 테스트를 하고, 활동 및 학습/기억 기준에 도달한 마우스를 추적 검사(follow-up)에 포함시킨다. 행동 결손을 38주령, 39주령 및 40주령에 다시 측정하고, 체중을 기록한다. 연구 기재 기준에 도달하지 못하는 마우스를 희생시킨다. 41주령의 종점에서, 동물들을 안락사시키고, 뇌를 가용성 및 불용성 아밀로이드 베타의 수준 및 침착에 대한 생화학적인 그리고 면역조직화학적 분석용으로 프로세싱한다. 혈청을 10주령, 25주령 및 41주령에서 투약 전, 투약 동안, 그리고 PK에 대한 종점에서 수집한다. 상이한 병기들의 동물의 중추 신경계(CNS)로부터의 조직 섹션을 피브리노겐에 대하여 면역염색할 수 있는데, 이는 BBB 붕괴에 대한 마커로서 사용할 수 있다.

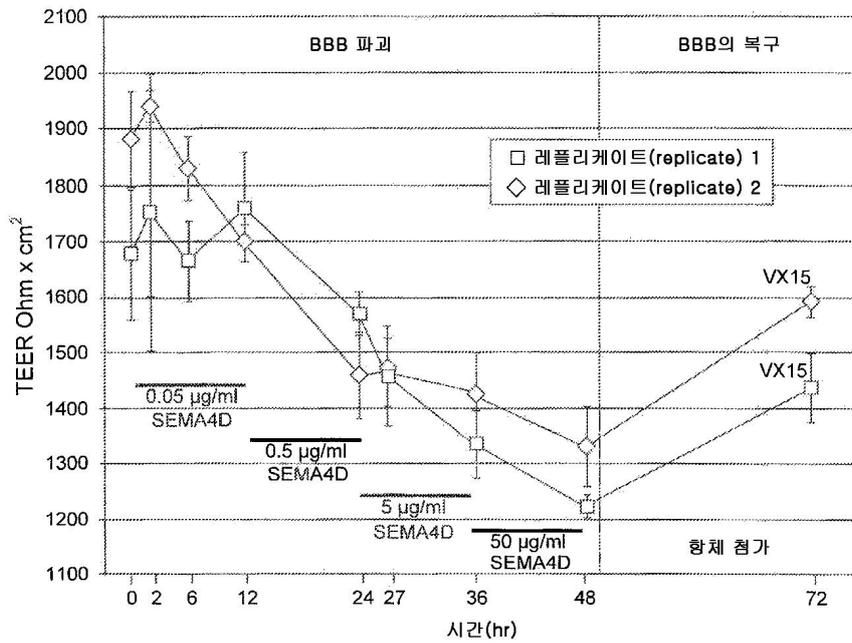
[0177] 이들 발명이 속하는 기술분야의 숙련자라면 본원에 개시된 본 발명의 많은 변형 및 다른 실시 양태를 떠올릴 것인데, 이는 전술한 설명 및 결부된 도면에 제시된 교시의 이득을 갖게 된다. 따라서, 본 발명은 개시된 특정 실시 양태로 한정되지 않으며, 변형 및 다른 실시 양태가 첨부된 특허청구범위의 범주 및 본원에 개시된 실시 양태들의 목록 내에 포함되는 것으로 의도됨을 이해해야 한다. 특정 용어가 본원에서 이용되지만, 이는 단지 포괄적이고 설명하는 의미로 사용되며, 한정하기 위하여 사용되는 것은 아니다.

도면

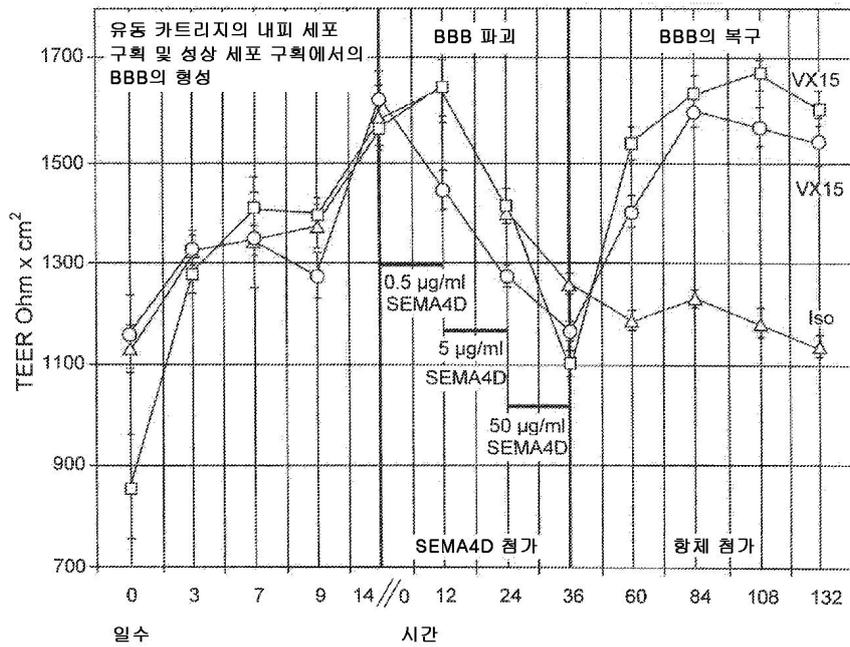
도면1



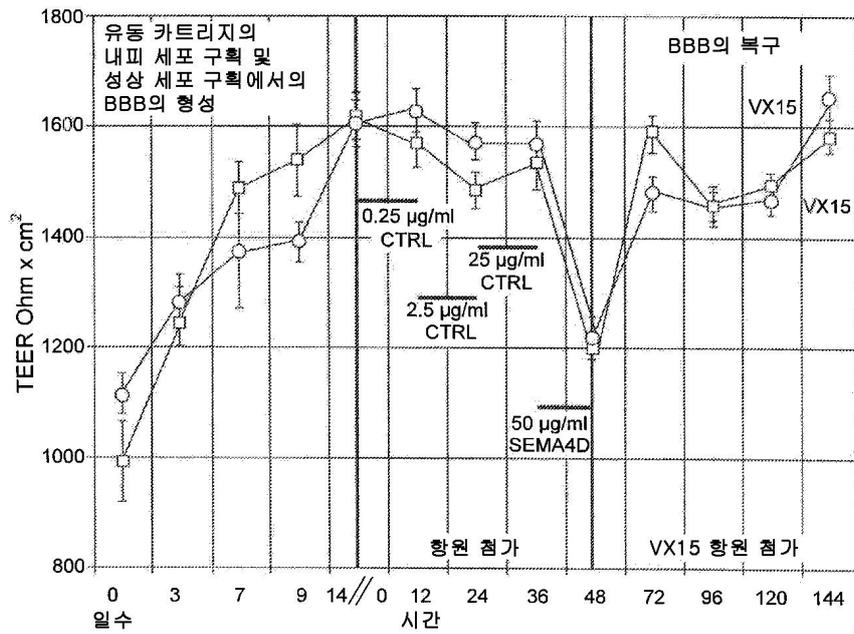
도면2



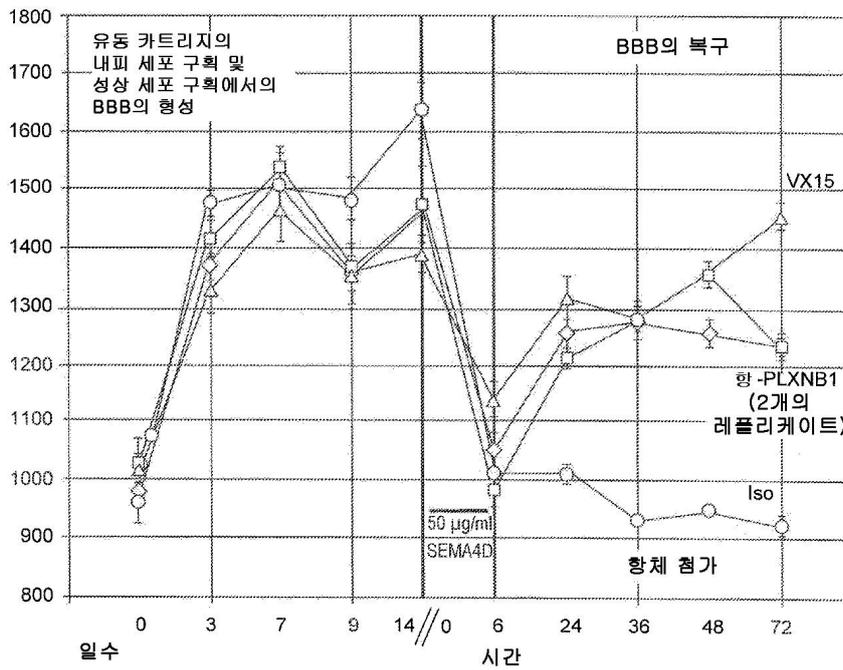
도면3



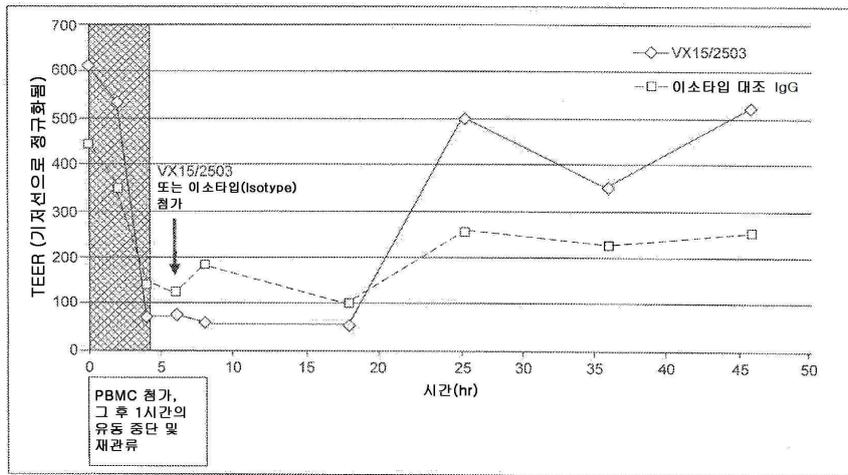
도면4



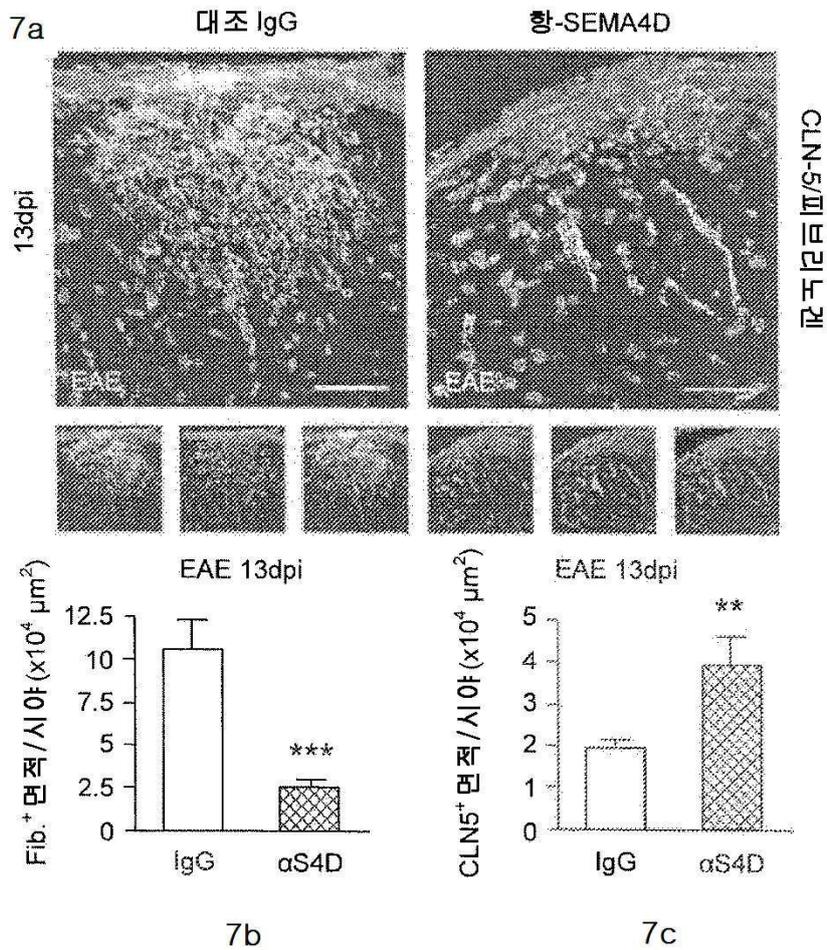
도면5



도면6

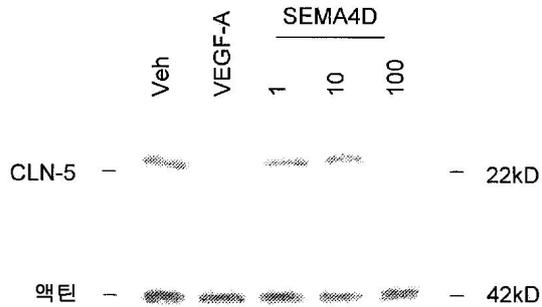


도면7



도면8

마우스 CNS 내피



CLN-5/액틴: .56 .03 .49 .60 .00

서열 목록

SEQUENCE LISTING

- <110> Vaccinex, Inc.  
SMITH, Ernest S.  
  
ZAUDERER, Maurice
- <120> USE OF SEMAPHORIN-4D BINDING MOLECULES FOR  
MODULATION OF BLOOD BRAIN BARRIER PERMEABILITY
- <130> 1843.068PC03/EJH/BNC
- <140> To be assigned
- <141> Herewith
- <150> US 61/593,641
- <151> 2012-02-01
- <150> US 61/555,726
- <151> 2011-11-04
- <150> US 61/545,809
- <151> 2011-10-11
- <160> 40
- <170> PatentIn version 3.3
- <210> 1

<211> 862

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Pro Ser Phe Val Phe Ala Asp Val Ile Arg Lys Ser Pro Asp Ser Pro



Gln Leu Phe Gln Asp Phe Glu Pro Val Gln Thr Leu Leu Leu Ser Ser  
 465                      470                      475                      480  
 Lys Lys Gly Asn Arg Phe Val Tyr Ala Gly Ser Asn Ser Gly Val Val  
                                  485                      490                      495  
 Gln Ala Pro Leu Ala Phe Cys Gly Lys His Gly Thr Cys Glu Asp Cys  
                                  500                      505                      510

Val Leu Ala Arg Asp Pro Tyr Cys Ala Trp Ser Pro Pro Thr Ala Thr  
                                  515                      520                      525  
 Cys Val Ala Leu His Gln Thr Glu Ser Pro Ser Arg Gly Leu Ile Gln  
                                  530                      535                      540  
 Glu Met Ser Gly Asp Ala Ser Val Cys Pro Asp Lys Ser Lys Gly Ser  
 545                      550                      555                      560  
 Tyr Arg Gln His Phe Phe Lys His Gly Gly Thr Ala Glu Leu Lys Cys  
                                  565                      570                      575

Ser Gln Lys Ser Asn Leu Ala Arg Val Phe Trp Lys Phe Gln Asn Gly  
                                  580                      585                      590  
 Val Leu Lys Ala Glu Ser Pro Lys Tyr Gly Leu Met Gly Arg Lys Asn  
                                  595                      600                      605  
 Leu Leu Ile Phe Asn Leu Ser Glu Gly Asp Ser Gly Val Tyr Gln Cys  
                                  610                      615                      620  
 Leu Ser Glu Glu Arg Val Lys Asn Lys Thr Val Phe Gln Val Val Ala  
 625                      630                      635                      640

Lys His Val Leu Glu Val Lys Val Val Pro Lys Pro Val Val Ala Pro  
                                  645                      650                      655  
 Thr Leu Ser Val Val Gln Thr Glu Gly Ser Arg Ile Ala Thr Lys Val  
                                  660                      665                      670  
 Leu Val Ala Ser Thr Gln Gly Ser Ser Pro Pro Thr Pro Ala Val Gln  
                                  675                      680                      685  
 Ala Thr Ser Ser Gly Ala Ile Thr Leu Pro Pro Lys Pro Ala Pro Thr  
                                  690                      695                      700

Gly Thr Ser Cys Glu Pro Lys Ile Val Ile Asn Thr Val Pro Gln Leu





305                    310                    315                    320  
 Gly Leu Ser Ala Val Cys Ala Tyr Thr Leu Ala Thr Val Glu Ala Val  
                                  325                    330                    335  
 Phe Ser Arg Gly Lys Tyr Met Gln Ser Ala Thr Val Glu Gln Ser His  
  
                                  340                    345                    350  
 Thr Lys Trp Val Arg Tyr Asn Gly Pro Val Pro Thr Pro Arg Pro Gly  
                                  355                    360                    365  
 Ala Cys Ile Asp Ser Glu Ala Arg Ala Ala Asn Tyr Thr Ser Ser Leu  
                                  370                    375                    380  
 Asn Leu Pro Asp Lys Thr Leu Gln Phe Val Lys Asp His Pro Leu Met  
 385                    390                    395                    400  
 Asp Asp Ser Val Thr Pro Ile Asp Asn Arg Pro Lys Leu Ile Lys Lys  
  
                                  405                    410                    415  
 Asp Val Asn Tyr Thr Gln Ile Val Val Asp Arg Thr Gln Ala Leu Asp  
                                  420                    425                    430  
 Gly Thr Phe Tyr Asp Val Met Phe Ile Ser Thr Asp Arg Gly Ala Leu  
                                  435                    440                    445  
 His Lys Ala Val Ile Leu Thr Lys Glu Val His Val Ile Glu Glu Thr  
                                  450                    455                    460  
 Gln Leu Phe Arg Asp Ser Glu Pro Val Leu Thr Leu Leu Leu Ser Ser  
  
 465                    470                    475                    480  
 Lys Lys Gly Arg Lys Phe Val Tyr Ala Gly Ser Asn Ser Gly Val Val  
                                  485                    490                    495  
 Gln Ala Pro Leu Ala Phe Cys Glu Lys His Gly Ser Cys Glu Asp Cys  
                                  500                    505                    510  
 Val Leu Ala Arg Asp Pro Tyr Cys Ala Trp Ser Pro Ala Ile Lys Ala  
                                  515                    520                    525  
 Cys Val Thr Leu His Gln Glu Glu Ala Ser Ser Arg Gly Trp Ile Gln  
  
                                  530                    535                    540  
 Asp Met Ser Gly Asp Thr Ser Ser Cys Leu Asp Lys Ser Lys Glu Ser  
 545                    550                    555                    560

Phe Asn Gln His Phe Phe Lys His Gly Gly Thr Ala Glu Leu Lys Cys  
 565 570 575  
 Phe Gln Lys Ser Asn Leu Ala Arg Val Val Trp Lys Phe Gln Asn Gly  
 580 585 590  
 Glu Leu Lys Ala Ala Ser Pro Lys Tyr Gly Phe Val Gly Arg Lys His  
 595 600 605  
 Leu Leu Ile Phe Asn Leu Ser Asp Gly Asp Ser Gly Val Tyr Gln Cys  
 610 615 620  
 Leu Ser Glu Glu Arg Val Arg Asn Lys Thr Val Ser Gln Leu Leu Ala  
 625 630 635 640  
 Lys His Val Leu Glu Val Lys Met Val Pro Arg Thr Pro Pro Ser Pro  
 645 650 655  
 Thr Ser Glu Asp Ala Gln Thr Glu Gly Ser Lys Ile Thr Ser Lys Met  
 660 665 670  
 Pro Val Ala Ser Thr Gln Gly Ser Ser Pro Pro Thr Pro Ala Leu Trp  
 675 680 685  
 Ala Thr Ser Pro Arg Ala Ala Thr Leu Pro Pro Lys Ser Ser Ser Gly  
 690 695 700  
 Thr Ser Cys Glu Pro Lys Met Val Ile Asn Thr Val Pro Gln Leu His  
 705 710 715 720  
 Ser Glu Lys Thr Val Tyr Leu Lys Ser Ser Asp Asn Arg Leu Leu Met  
 725 730 735  
 Ser Leu Leu Leu Phe Ile Phe Val Leu Phe Leu Cys Leu Phe Ser Tyr  
 740 745 750  
 Asn Cys Tyr Lys Gly Tyr Leu Pro Gly Gln Cys Leu Lys Phe Arg Ser  
 755 760 765  
 Ala Leu Leu Leu Gly Lys Lys Thr Pro Lys Ser Asp Phe Ser Asp Leu  
 770 775 780  
 Glu Gln Ser Val Lys Glu Thr Leu Val Glu Pro Gly Ser Phe Ser Gln  
 785 790 795 800  
 Gln Asn Gly Asp His Pro Lys Pro Ala Leu Asp Thr Gly Tyr Glu Thr

805 810 815  
 Glu Gln Asp Thr Ile Thr Ser Lys Val Pro Thr Asp Arg Glu Asp Ser  
 820 825 830  
 Gln Arg Ile Asp Glu Leu Ser Ala Arg Asp Lys Pro Phe Asp Val Lys  
 835 840 845  
 Cys Glu Leu Lys Phe Ala Asp Ser Asp Ala Asp Gly Asp

850 855 860  
 <210> 3  
 <211> 30  
 <212> DNA  
 <213> Artificial  
 <220><223> Polynucleotide anti-CD100 VH CDR1  
 <400> 3  
 ggctacagct tcagcgacta ctacatgcac 30  
 <210> 4  
 <211> 51  
 <212> DNA  
 <213> Artificial  
 <220><223> Polynucleotide anti-CD100 VH CDR2  
 <400> 4  
 cagattaatc ctaccactgg cggcgctagc tacaaccaga agttcaaggg c 51  
 <210> 5  
 <211> 27  
 <212> DNA  
 <213> Artificial  
 <220><223> Polynucleotide anti-CD100 VH CDR3  
 <400> 5  
 tattactacg gcagacactt cgatgtc 27  
 <210> 6  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 <220><223> Polypeptide anti-CD100 VH CDR1

<400> 6

Gly Tyr Ser Phe Ser Asp Tyr Tyr Met His

1                    5                    10

<210> 7

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Polypeptide anti-CD100 VH CDR2

<400> 7

Gln Ile Asn Pro Thr Thr Gly Gly Ala Ser Tyr Asn Gln Lys Phe Lys

1                    5                    10                    15

Gly

<210> 8

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Polypeptide anti-CD100 VH CDR3

<400> 8

Tyr Tyr Tyr Gly Arg His Phe Asp Val

1                    5

<210> 9

<211> 118

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Polypeptide anti-CD100 VH 2503

<400> 9

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser

1                    5                    10                    15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Ser Asp Tyr

20                    25                    30

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

35                    40                    45

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

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

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

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

Thr Val Thr Val Ser Ser  
 115

<210> 10

<211> 118

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Polypeptide anti-CD100 VH 67

<400> 10

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

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Ser Asp Tyr

20 25 30

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

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

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

Met Gln Leu Lys Ser Leu Thr Ser Glu Glu Ser Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

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

Thr Val Thr Val Ser Ser  
 115

<210> 11  
 <211> 45  
 <212> DNA  
 <213> Artificial  
 <220><223> Polynucleotide anti-CD100 VL CDR1  
 <400> 11  
 aaggccagcc aaagcgtgga ttatgatggc gatagctata tgaac 45  
 <210> 12  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Artificial  
 <220><223> Polynucleotide anti-CD100 VL CDR2  
 <400> 12  
 gctgcatcca atctggaag c 21  
 <210> 13  
 <211> 27  
 <212> DNA  
 <213> Artificial  
 <220><223> Polynucleotide anti-CD100 VL CDR3  
 <400> 13  
 cagcaaagca atgaggatcc ctacacc 27  
 <210> 14  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 <220><223> Polypeptide anti-CD100 VL CDR1  
 <400> 14  
 Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Asp Gly Asp Ser Tyr Met Asn  
 1                    5                    10                    15  
 <210> 15  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220><223> Polypeptide anti-CD100 VL CDR2

<400> 15

Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser

1                    5

<210> 16

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Polypeptide anti-CD100 VL CDR3

<400> 16

Gln Gln Ser Asn Glu Asp Pro Tyr Thr

1                    5

<210> 17

<211> 111

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Polypeptide anti-CD100 VL 2503

<400> 17

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly

1                    5                    10                    15

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

                  20                    25                    30

Gly Asp Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro

                  35                    40                    45

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

                  50                    55                    60

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

65                    70                    75                    80

Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn

                  85                    90                    95

Glu Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

                  100                    105                    110

<210> 18

<211> 111

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Polypeptide anti-CD100 VL 67

<400> 18

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

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

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

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

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

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

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

<210> 19

<211> 354

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Polynucleotide anti-CD100 VH 2503

<400> 19

caggtgcagc tgggtgcagag cggcgtgag gtgaagaagc ctggcagcag cgtgaaggtc 60

tcctgcaagg ctagcggcta cagcttcagc gactactaca tgcactgggt gagacaggcc 120

ctggccaag gcctggagtg gatggccag attaatccta ccaactggcgg cgctagctac 180

aaccagaagt tcaagggcaa ggccaccatt accgtggaca aaagcaccag cacagcctac 240

atggagctga gcagcctgag aagcaggac accgccgtgt attactgtgc cagatattac 300

tacggcagac acttcgatgt ctggggccaa ggcaccacgg tcaccgtctc ttca 354

<210> 20

<211> 354  
 <212> DNA  
 <213> Artificial  
 <220><223> Polynucleotide anti-CD100 VH 67  
 <400> 20  
 caggtccagc tgcagcagtc tggacctgag ctggtgaagc ctggggcttc agtgaagata 60  
 tcctgcaagg ctcttggtta ctcatcagc gactactaca tgcactgggt gaagcaaagt 120  
  
 cctgaaaata gtcttgagtg gattggacag attaatccta ccactggggg tgctagctac 180  
 aaccagaagt tcaagggcaa ggccacatta actgtagata aatcctccag cacagcctac 240  
 atgcagctca agagcctgac atctgaagag tctgcagtct attactgtac aagatattac 300  
 tacggtagac acttcgatgt ctggggccaa gggaccacgg tcaccgtttc ctca 354  
  
 <210> 21  
 <211> 333  
 <212> DNA  
 <213> Artificial  
 <220><223> Polynucleotide anti-CD100 VL 2503  
 <400> 21  
 gacatcgtga tgaccagag cccagacagc ctggctgtga gcctgggca gagggccacc 60  
 atcaactgca aggccagcca aagcgtggat tatgatggcg atagctatat gaactggtac 120  
  
 cagcagaaac caggccagcc tcctaagctg ctgatttacg ctgcatccaa tctggaaagc 180  
 ggcgtgcctg acagattcag cggcagcggc agcggcacag attcactct gaccatcagc 240  
 agcctgcagg ctgaagatgt ggcagtgtat tactgtcagc aaagcaatga ggatccctac 300  
 accttcggcc aagggaccaa gctcgagatc aaa 333  
  
 <210> 22  
 <211> 333  
 <212> DNA  
 <213> Artificial  
 <220><223> Polynucleotide anti-CD100 VL 67  
 <400> 22  
 gacattgtga tgaccagtc tccagcttct ttggctgtgt ctctaggga gagggccacc 60  
 atctcctgca aggccagcca aagtgtgat tatgatggtg atagttatat gaactggtac 120  
  
 caacagaaac caggacagcc acccaaactc ctcatctatg ctgcatccaa tctagaatct 180

gggatcccag ccaggttttag tggcagtggg tctgggacag acttcaccct caacatccat 240  
 cctgtggagg aggaggatgc tgcaacctat tactgtcagc aaagtaatga ggatccgtac 300  
 acgttcggag gggggaccaa gctcagatc aaa 333  
 <210> 23  
 <211> 2586  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 23  
 atgaggatgt gcacccccat tagggggctg ctcatggccc ttgcagtgat gtttgggaca 60  
 gcgatggcat ttgcacccat accccggatc acctgggagc acagagaggt gcacctggtg 120  
  
 cagtttcatg agccagacat ctacaactac tcagccttgc tgctgagcga ggacaaggac 180  
 accttgta ca taggtgcccc ggaggcggtc ttcgctgtga acgcactcaa catctccgag 240  
 aagcagcatg aggtgtattg gaaggtctca gaagacaaaa aagcaaatg tgcagaaaag 300  
 gggaaatcaa aacagacaga gtgcctcaac tacatccggg tgctgcagcc actcagcggc 360  
 acttcctttt acgtgtgtgg gaccaacgca ttccagccgg cctgtgacca cctgaactta 420  
 acatccttta agtttctggg gaaaaatgaa gatggcaaag gaagatgtcc ctttgacca 480  
 gcacacagct acacatccgt catggttgat ggagaacttt attcggggac gtcgtataat 540  
  
 tttttgggaa gtgaacccat catctcccga aattcttccc acagtcctct gaggacagaa 600  
 tatgcaatcc cttggctgaa cgagcctagt ttcgtgtttg ctgacgtgat ccgaaaaagc 660  
 ccagacagcc ccgacggcga ggatgacagg gtctacttct tcttcacgga ggtgtctgtg 720  
 gagtatgagt ttgtgtttag ggtgctgac ccacggatag caagagtgtg caagggggac 780  
 cagggcggcc tgaggacctt gcagaagaaa tggacctcct tctgaaaagc ccgactcatc 840  
 tgctcccggc cagacagcgg cttggtcttc aatgtgctgc gggatgtctt cgtgctcagg 900  
 tccccgggcc tgaaggtgcc tgtgttctat gactcttca ccccacagct gaacaacgtg 960  
  
 gggctgtcgg cagtgtgcgc ctacaacctg tccacagccg aggaggtctt ctcccacggg 1020  
 aagtacatgc agagcaccac agtggagcag tcccacacca agtgggtgcg ctataatggc 1080  
 ccggtacca agcccgggcc tggagcgtgc atcgacagcg aggcacgggc cgccaactac 1140  
 accagctcct tgaatttgcc agacaagacg ctgcagtctg ttaaagacca ccctttgatg 1200  
 gatgactcgg taacccaat agacaacagg cccaggttaa tcaagaaaga tgtgaactac 1260  
 accagatcg tgggtggacc gaccaggcc ctggatggga ctgtctatga tgtcatgttt 1320  
 gtcagcacag accggggagc tctgcacaaa gccatcagcc tcgagcacgc tgttcacatc 1380

atcgaggaga cccagctctt ccaggacttt gagccagtcc agaccctgct gctgtcttca 1440  
 aagaagggca acaggtttgt ctatgctggc tctaactcgg gcgtggtcca ggcctcctg 1500  
 gccttctgtg ggaagcacgg cacctgag gactgtgtgc tggcgcgga cccctactgc 1560  
 gcctggagcc cgcccacagc gacctgcgtg gctctgcacc agaccgagag ccccagcagg 1620  
 ggtttgattc aggagatgag cggcgatgct tctgtgtgcc cggataaaag taaaggaagt 1680  
 taccggcagc attttttcaa gcacgggtgc acagcggaac tgaaatgctc ccaaaaatcc 1740  
 aacctggccc gggctctttg gaagtccag aatggcgtgt tgaaggccga gagccccaag 1800  
  
 tacggcttta tgggcagaaa aaacttgctc atcttcaact tgtcagaagg agacagtggg 1860  
 gtgtaccagt gcctgtcaga ggagagggtt aagaacaaaa cggctttcca agtggctgcc 1920  
 aagcacgtcc tggaaagtga ggtggttcca aagcccgtag tggccccac cttgtcagtt 1980  
 gttcagacag aaggtagtag gattgccacc aaagtgttg tggcatccac ccaagggtct 2040  
 tctcccccac cccagcctg gcagccacc tctccgggg ccatcaccct tctcccaag 2100  
 cctgcgccc cggcacatc ctgcgaacca aagatcgtca tcaacacggt cccccagctc 2160  
 cactcggaga aaacatgta tcttaagtcc agcgacaacc gcctcctcat gtcctcttc 2220  
  
 ctcttcttct ttgttctctt cctctgcctc tttttctaca actgctataa gggatacctg 2280  
 cccagacagt gcttgaatt ccgctcggcc ctactaattg ggaagaagaa gccaagtca 2340  
 gatttctgtg accgtgagca gacctgaag gagacgttag tagagccagg gagcttctcc 2400  
 cagcagaatg gggagcacc caagccagcc ctggacaccg gctatgagac cgagcaagac 2460  
 accatcacca gcaaagtccc cacggatagg gaggactcac agaggatcga cgaccttct 2520  
 gccagggaca agcccttga cgtcaagtgt gagctgaagt tcgctgactc agacgcagat 2580  
 ggagac 2586

<210> 24

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Peptide epitope of proteolipid protein PLP(139-151)

<400> 24

His Ser Leu Gly Lys Trp Leu Gly His Pro Asp Lys Phe

1                    5                    10

<210> 25

<211> 118

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Polypeptide anti-CD100 VH 76

<400> 25

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala Lys Pro Gly Ala

1                    5                    10                    15

Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr

20                    25                    30

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

35                    40                    45

Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Thr Gly Tyr Ser Asp Tyr Asn Gln Lys Phe

50                    55                    60

Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr

65                    70                    75                    80

Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys

85                    90                    95

Ala Arg Asp Pro Tyr Gly Trp Thr Met Asp Ser Trp Gly Gln Gly Thr

100                    105                    110

Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 26

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Polypeptide anti-CD100 VH 76 CDR1

<400> 26

Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr Trp Met His

1                    5                    10

<210> 27

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial

<

220><223> Polypeptide anti-CD100 VH 76 CDR2

<400> 27

Tyr Ile Asn Pro Ser Thr Gly Tyr Ser Asp Tyr Asn Gln Lys Phe Lys

1                    5                    10                    15

Asp

<210> 28

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Polypeptide anti-CD100 VH 76 CDR3

<400> 28

Asp Pro Tyr Gly Trp Thr Met Asp Ser

1                    5

<210> 29

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Polypeptide anti-CD100 VL 76

<400> 29

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly

1                    5                    10                    15

Asp Thr Ile Thr Ile Thr Cys His Ala Ser Gln Asn Ile Asn Val Trp

20                    25                    30

Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Asn Ile Pro Lys Leu Leu Ile

35                    40                    45

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

50                    55                    60

Ser Gly Ser Gly Thr Gly Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65                    70                    75                    80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Gln Ser Tyr Pro Tyr

85                    90                    95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100                    105

<210> 30

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Polypeptide anti-CD100 VL 76 CDR1

<400> 30

His Ala Ser Gln Asn Ile Asn Val Trp Leu Ser

1                    5                    10

<210> 31

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Polypeptide anti-CD100 VL 76 CDR2

<400> 31

Lys Ala Ser Asn Leu His Thr

1                    5

<210> 32

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Polypeptide anti-CD100 VL 76 CDR3

<400> 32

Gln Gln Gly Gln Ser Tyr Pro Tyr Thr

1                    5

<210> 33

<211> 354

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Polynucleotide anti-CD100 VH 76

<400> 33

caggtccagc tgcagcagtc tggggctgaa ctggcaaaac ctggggcctc agtgaagatg      60

tcttgcaagg ctctggccta cacctttact aggtactgga tgcactgggt aaaacagagg      120

cctggacagg gtctggaatg gattggatac attaatccta gcactggtta ttctgattac      180

aatcagaagt tcaaggacaa ggccacattg actgcagaca aatcctccag cacagcctac 240  
atgcaactga gcagcctgac atctgaggac tctgcagtct attactgtgc aagagacccc 300  
tacggctgga ctatggactc ctggggccaa gggactctgg tcaccgtctc ctca 354  
<210> 34  
<211> 30  
<212> DNA  
<213> Artificial  
<220><223> Polynucleotide anti-CD100 VH 76 CDR1  
<400> 34  
ggctacacct ttactaggtg ctggatgcac 30  
<210> 35  
<211> 51  
<212> DNA  
<213> Artificial  
<220><223> Polynucleotide anti-CD100 VH 76 CDR2  
<400> 35  
tacattaate ctagcaactgg ttattctgat tacaatcaga agttcaagga c 51  
<210> 36  
<211> 27  
<212> DNA  
<213> Artificial  
<220><223> Polynucleotide anti-CD100 VH 76 CDR3  
<400> 36  
gaccctacg gctggactat ggactcc 27  
<210> 37  
<211> 321  
<212> DNA  
<213> Artificial  
<220><223> Polynucleotide anti-CD100 VL 76  
<400> 37  
gacatccaga tgaccagtc tccatccagt ctgtctgcat cccttgaga cacaattacc 60  
atcacttgcc atgccagtca gaacattaat gtttggttaa gctggtacca gcagaaacca 120  
ggaaatattc ctaaactatt gatctataag gcttccaact tgcacacagg cgtcccatca 180

aggtttagtg gcagtggatc tggaacaggt ttcacattaa ccatcagcag cctgcagcct 240  
 gaagacattg ccaattacta ctgtcaacag ggtcaaagtt atccgtacac gttcggaggg 300  
 gggaccaagc tcgagatcaa a 321

<210> 38

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Polynucleotide anti-CD100 VL 76 CDR1

<400> 38

catgccagtc agaacattaa tgtttgggta agc 33

<210> 39

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Polynucleotide anti-CD100 VL 76 CDR2

<400> 39

aaggcttcca acttgcacac a 21

<210> 40

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Polynucleotide anti-CD100 VL 76 CDR3

<400> 40

caacagggtc aaagttatcc gtacacg 27