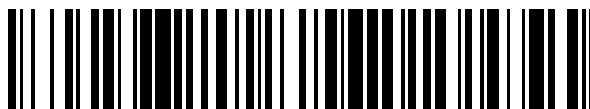


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 669 209**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)

A61P 25/00 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **11.10.2012** **PCT/US2012/059757**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.04.2013** **WO13055922**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.10.2012** **E 12839601 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.02.2018** **EP 2766093**

54 Título: **Uso de moléculas de unión a semaforina-4D para la modulación de la permeabilidad de la barrera hematoencefálica**

30 Prioridad:

11.10.2011 US 201161545809 P

04.11.2011 US 201161555726 P

01.02.2012 US 201261593641 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
24.05.2018

73 Titular/es:

VACCINEX, INC. (100.0%)

**1895 Mt. Hope Avenue
Rochester, NY 14620, US**

72 Inventor/es:

**SMITH, ERNEST S. y
ZAUDERER, MAURICE**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 669 209 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Uso de moléculas de unión a semaforina-4D para la modulación de la permeabilidad de la barrera hematoencefálica

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La semaforina 4D (SEMA4D), también conocida como CD100, es una proteína transmembranaria (por ejemplo, SEQ ID NO: 1 (humana); SEQ ID NO: 2 (murina)) que pertenece a la familia del gen de la semaforina. SEMA4D se expresa sobre la superficie celular como un homodímero, pero tras la activación celular, SEMA4D puede ser liberada de la superficie celular mediante escisión proteolítica para generar SEMA4Ds, una forma soluble de la proteína, que también es biológicamente activa. Véanse Suzuki et al., Nature Rev. Immunol. 3:159-167 (2003); Kikutani et al., Nature Immunol. 9:17-23 (2008).

SEMA4D se expresa a altos niveles en órganos linfoides, que incluyen el bazo, timo y ganglios linfáticos, y en órganos no linfoides, tales como el cerebro, corazón y riñón. En órganos linfoides, SEMA4D se expresa abundantemente en linfocitos T en reposo, pero solo se expresa débilmente en linfocitos B en reposo y células presentadoras de antígenos (APC), tales como células dendríticas (DC). Su expresión, sin embargo, está regulada por incremento en estas células tras la activación por diversos estímulos inmunológicos. La liberación de SEMA4D soluble de células inmunitarias también es aumentada por la activación celular.

SEMA4D participa en el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas, enfermedades autoinmunitarias, enfermedades desmielinizantes, y ciertos cánceres. Mientras que la función de señalización de SEMA4D mediante sus receptores, por ejemplo, plexina B1, en la angiogénesis es bien reconocida, sigue sin estar bien definido el efecto de la señalización de SEMA4D sobre la barrera hematoencefálica (BBB). Esto es importante debido a que cambios en la permeabilidad de la BBB tienen una profunda influencia sobre el tejido cerebral y función. Sigue existiendo, por tanto, una necesidad de tratamientos para trastornos neuroinflamatorios que surgen como resultado de la rotura en la BBB, y, en particular, agentes terapéuticos que inhiben, suprimen, previenen, invierten o ralentizan la rotura de la BBB.

BREVE SUMARIO DE LA INVENCION

Se desvelan en el presente documento métodos de uso de moléculas de unión a semaforina-4d para la modulación de la permeabilidad de la barrera hematoencefálica. Se presenta evidencia que demuestra que SEMA4D puede comprometer la integridad de la BBB aumentando así su permeabilidad. Según aspectos de la invención ilustrados en el presente documento, se proporciona una cantidad eficaz de un anticuerpo aislado o fragmento de unión al antígeno del mismo que se une específicamente a semaforina-4D (SEMA4D) para su uso en un tratamiento para disminuir la permeabilidad de la barrera hematoencefálica (BBB) en un sujeto con elevada permeabilidad de BBB y un trastorno neuroinflamatorio, en el que el anticuerpo aislado o fragmento de unión al antígeno del mismo inhibe específicamente la interacción de la semaforina 4D (SEMA4D) con el receptor de SEMA4D plexina B1.

Como se ilustra en el presente documento, se desvela un método de mantenimiento o aumento de la expresión de claudina-5 en un sujeto que tiene un trastorno neuroinflamatorio que comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz de una molécula de unión aislada que se une específicamente a semaforina-4D (SEMA4D), en el que la molécula de unión mantiene o aumenta la expresión de claudina-5 en el sujeto.

Como se ilustra en el presente documento, se desvela un método de disminución de la permeabilidad de la barrera hematoencefálica en un sujeto que tiene un trastorno neuroinflamatorio, que comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz de una molécula de unión aislada que inhibe específicamente la interacción de semaforina 4D (SEMA4D) con un receptor de SEMA4D, disminuyendo así la permeabilidad de la barrera hematoencefálica en el sujeto.

Como se ilustra en el presente documento, se desvela un método de tratamiento de un sujeto que tiene un trastorno neuroinflamatorio, que comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz de una molécula de unión aislada que inhibe específicamente la interacción de semaforina 4D (SEMA4D) con un receptor de SEMA4D, en el que la molécula de unión disminuye la permeabilidad de la barrera hematoencefálica, tratando así al sujeto.

Como se ilustra en el presente documento, se desvela un método de disminución de la permeabilidad de la barrera hematoencefálica en un sujeto que tiene un trastorno neuroinflamatorio, que comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz de una molécula de unión aislada que se une específicamente a SEMA4D, en el que la molécula de unión inhibe competitivamente que un anticuerpo monoclonal de referencia seleccionado del grupo que consiste en VX15/2503 o 67 se une específicamente a SEMA4D.

Como se ilustra en el presente documento, se desvela un método de tratamiento de un sujeto que tiene un trastorno neuroinflamatorio, que comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz de una molécula de unión aislada que se une específicamente a semaforina-4D (SEMA4D) y una molécula de unión aislada que se une específicamente a plexina-B1, en el que las moléculas de unión a SEMA4D y plexina-B1 disminuyen la permeabilidad de la barrera hematoencefálica, tratando así al sujeto.

Como se ilustra en el presente documento, se desvela un método de tratamiento de un sujeto que tiene un trastorno neuroinflamatorio, que comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz de un inhibidor de la interacción de semaforina 4D (SEMA4D) con un receptor de SEMA4D, en el que el inhibidor disminuye la permeabilidad de la barrera hematoencefálica, tratando así al sujeto.

5 BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS/FIGURAS

FIGURA 1: Esquema del protocolo experimental de BBB *in vitro* dinámico ("DIV-BBB") descrito en los ejemplos.

FIGURAS 2: Modelo de DIV-BBB *in vitro* que muestra mediciones de la integridad de BBB como se refleja en resistencia eléctrica transendotelial (TEER) en presencia de SEMA4D recombinante (0,05, 0,5, 5 o 50 µg/ml) y anticuerpo VX15/2503 ("VX15").

10 FIGURA 3: Modelo de DIV-BBB *in vitro* que muestra mediciones de la integridad de BBB como se refleja en resistencia eléctrica transendotelial (TEER) durante la formación de la BBB, la rotura de BBB en presencia de SEMA4D recombinante (0,5, 5 o 50 µg/ml), y la restauración de la BBB en presencia del anticuerpo VX15/2503 ("VX15"), pero no el control de isotipo ("Iso").

15 FIGURA 4: Modelo de DIV-BBB *in vitro* que muestra mediciones de la integridad de BBB como se refleja en resistencia eléctrica transendotelial (TEER) durante la formación de la BBB, la rotura de BBB en presencia de 0,25, 2,5 o 25 µg/ml del antígeno C35 de control ("CTRL") o 50 µg/ml de SEMA4D recombinante, y la restauración de la BBB en presencia del anticuerpo VX15/2503 ("VX15").

20 FIGURA 5: Modelo de DIV-BBB *in vitro* que muestra mediciones de la integridad de BBB como se refleja en resistencia eléctrica transendotelial (TEER) durante la formación de la BBB, la rotura de BBB en presencia de SEMA4D recombinante (50 µg/ml), y la restauración de la BBB en presencia del anticuerpo VX15/2503 ("VX15"), anticuerpo anti-plexina-B1 ("Anti-PLXNB1"), pero no control de isotipo ("Iso").

25 FIGURA 6: Modelo de DIV-BBB *in vitro* que muestra mediciones de la integridad de BBB como se refleja en resistencia eléctrica transendotelial (TEER) durante la formación de la BBB, la rotura de BBB en presencia de CMSP activadas (10^6 /ml) y cese de flujo, y la restauración de la BBB en presencia del anticuerpo VX15/2503 o IgG de control de isotipo.

30 FIGURA 7A-C: Resultados del modelo de EAE *in vivo* que muestra la integridad de la BBB o pérdida de la misma como se refleja por inmunotinción de la penetración de fibrinógeno ("Fib.+") en tejido cerebral (7A panel izquierdo y cuantificación en 7B) y expresión de claudina-5 ("CLN5+") como se detectó por tinción roja (7A panel derecho y cuantificación en 7C) tras el tratamiento con el anticuerpo VX15/2503 ("Anti-SEMA4D") o control de isotipo ("IgG de control").

FIGURA 8: Resultados de inmunotransferencia que muestran el efecto de concentraciones crecientes de SEMA4D recombinante (1 ng/ml, 10 ng/ml y 100 ng/ml) sobre la expresión de la proteína de la zona de oclusión endotelial clave claudina-5 ("CLN-5") en comparación con el control positivo de VEGF-A en cultivos endoteliales de sistema nervioso central (SNC) de ratón primarios.

35 DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

I. Definiciones

Debe observarse que el término "un" o "una" entidad se refiere a uno o más de esa entidad; por ejemplo, se entiende que "un anticuerpo anti-SEMA4D" representa uno o más anticuerpos anti-SEMA4D. Como tales, los términos "un" (o "una"), "uno o más", y "al menos uno" pueden usarse indistintamente en el presente documento.

40 Debe observarse que el término "barrera hematoencefálica" y "BBB" se usan indistintamente.

Como se usa en el presente documento, el término "rotura" o "perturbación" con respecto a la BBB, tal como la "rotura de la barrera hematoencefálica" o "perturbación de la barrera hematoencefálica", se refiere a un aumento en la permeabilidad de la barrera hematoencefálica, o, en el caso de "DIV-BBB", un modelo de BBB *in vitro* dinámico humanizado, una disminución en la resistencia eléctrica transendotelial (TEER). McCallister et al., Brain Res. 904:20-30 (2001); Santaguida et al., Brain Res. 1109:1-13 (2006); y Cucullo et al., Epilepsia 48:505-16 (2007) han mostrado que hay una relación directa (inversa) entre TEER y la permeabilidad en DIV-BBB. Además, un aumento en la permeabilidad de la barrera hematoencefálica o una disminución en la resistencia eléctrica puede ser el resultado de una disminución en el número, densidad y/o concentración de células endoteliales presentes en la BBB; o un cambio en la morfología o interacciones entre células endoteliales o astrocitos o entre células endoteliales y astrocitos que forman la BBB.

Como se usa en el presente documento, el término "restauración" con respecto a la BBB, tal como "restauración de la barrera hematoencefálica", se refiere a una disminución en la permeabilidad de la barrera hematoencefálica, o, en el caso de DIV-BBB, un modelo *in vitro* dinámico humanizado de BBB, un aumento en la resistencia eléctrica transendotelial.

Como se usa en el presente documento, el término "trastorno neuroinflamatorio" se refiere a un trastorno inflamatorio del sistema nervioso central (SNC), un trastorno neurodegenerativo, un trastorno autoinmunitario del sistema nervioso central, un trastorno de mielina o una enfermedad que afecta a los oligodendrocitos, o un trastorno de mielina post-traumatismo del sistema nervioso central. Debe observarse que los trastornos neuroinflamatorios son frecuentemente también trastornos neurodegenerativos. Sin embargo, es posible que un trastorno neurodegenerativo exista en ausencia de neuroinflamación obvia. Esto es el caso, por ejemplo, en esclerosis múltiple progresiva secundaria avanzada.

El término "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad de un anticuerpo, polipéptido, polinucleótido, molécula orgánica pequeña, u otro fármaco eficaz, para "tratar" una enfermedad o trastorno en un sujeto o mamífero. En el caso de un trastorno neuroinflamatorio, la cantidad terapéuticamente eficaz del fármaco puede disminuir la permeabilidad de la BBB; reducir, retardar o parar un aumento en la permeabilidad de BBB; inhibir, por ejemplo, suprimir, retardar, prevenir, parar o invertir una elevada permeabilidad de la BBB; aumentar el número, densidad y/o concentración de células endoteliales presentes en la BBB; cambio en la morfología o función de células endoteliales; o un cambio en las interacciones entre células endoteliales o astrocitos o entre células endoteliales y astrocitos que forman la BBB; aliviar de algún modo uno o más de los síntomas asociados a una elevada permeabilidad de BBB, por ejemplo, trastornos neuroinflamatorios; reducir la morbilidad y mortalidad; mejorar la calidad de vida; o una combinación de tales efectos.

Términos tales como "tratar" o "tratamiento" o "para tratar" o "aliviar" o "para aliviar" se refieren a tanto 1) medidas terapéuticas que curan, ralentizar, disminuyen los síntomas de, invierten y/o detienen la progresión de una afección o trastorno patológico diagnosticado y 2) medidas profilácticas o preventivas que previenen y/o ralentizar el desarrollo de una afección o trastorno patológico elegido como diana. Así, aquellos en necesidad de tratamiento incluyen aquellos ya con el trastorno; aquellos propensos a tener el trastorno; y aquellos en los que el trastorno va a prevenirse. Resultados clínicos beneficiosos o deseados incluyen, pero no se limitan a, alivio de síntomas, disminución del grado de enfermedad, estado de enfermedad estabilizado (es decir, que no empeora), retraso o ralentizamiento de la progresión de la enfermedad, mejora o paliación del estado de enfermedad, y remisión (tanto parcial como total), tanto detectable como indetectable. "Tratamiento" también puede significar prolongar la supervivencia en comparación con la supervivencia esperada si no se recibe tratamiento. Aquellos en necesidad de tratamiento incluyen aquellos ya con la afección o trastorno, además de aquellos propensos a tener la afección o trastorno o aquellos en los que la afección o trastorno va a prevenirse.

Por "sujeto" o "individuo" o "animal" o "paciente" o "mamífero" se indica cualquier sujeto, particularmente un sujeto mamífero, para el que se desea diagnóstico, pronóstico o terapia. Los sujetos mamíferos incluyen seres humanos, animales domésticos, animales de granja, y animales de zoológico, para deportes, o mascotas, tales como perros, gatos, cobayas, conejos, ratas, ratones, caballos, ganado vacuno, vacas, osos, etc.

Como se usa en el presente documento, expresiones tales como "un sujeto que se beneficiaría de la administración de un anticuerpo anti-SEMA4D" y "un animal en necesidad de tratamiento" incluyen sujetos, tales como sujetos mamíferos, que se beneficiarían de la administración de un anticuerpo anti-SEMA4D u otra molécula de unión a SEMA4D usada, por ejemplo, para la detección de un polipéptido SEMA4D (por ejemplo, para un procedimiento de diagnóstico) y/o de tratamiento, es decir, paliación o prevención de una enfermedad, con un anticuerpo anti-SEMA4D u otra molécula de unión a SEMA4D.

Una "molécula de unión" o "molécula de unión al antígeno" de la presente invención se refiere en su sentido más amplio a una molécula que se une específicamente a un determinante antigénico. En una realización, la molécula de unión se une específicamente a SEMA4D, por ejemplo, a un polipéptido SEMA4D transmembranario de aproximadamente 150 kDa o un polipéptido SEMA4D soluble de aproximadamente 120 kDa (comúnmente denominado SEMA4Ds). En otra realización, una molécula de unión de la invención es un anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno del mismo. En otra realización, una molécula de unión de la invención comprende al menos una CDR de cadena pesada o ligera de una molécula de anticuerpo. En otra realización, una molécula de unión de la invención comprende al menos dos CDR de una o más moléculas de anticuerpo. En otra realización, una molécula de unión de la invención comprende al menos tres CDR de una o más moléculas de anticuerpo. En otra realización, una molécula de unión de la invención comprende al menos cuatro CDR de una o más moléculas de anticuerpo. En otra realización, una molécula de unión de la invención comprende al menos cinco CDR de uno o más moléculas de anticuerpo. En otra realización, una molécula de unión de la invención comprende al menos seis CDR de una o más moléculas de anticuerpo.

La presente solicitud se basa en un método de disminución de la permeabilidad de la barrera hematoencefálica en un sujeto que tiene un trastorno neuroinflamatorio (por ejemplo, esclerosis múltiple, esclerosis lateral amiotrófica, epilepsia, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, meningitis, edema cerebral, traumatismo cerebral y accidente cerebrovascular), que comprende administrar al sujeto una molécula de unión anti-SEMA4D, una molécula de unión anti-plexinaB1, o combinación de las mismas.

Como se usa en el presente documento, "molécula de unión anti-SEMA4D" o "molécula de unión anti-plexinaB1" se refiere a un anticuerpo, o fragmento de unión al antígeno, variante, o derivado del mismo. A menos que se haga específicamente referencia a anticuerpos de tamaño completo tales como anticuerpos que existen de forma natural,

el término "anticuerpo anti-SEMA4D" o "anticuerpo anti-plexinaB1" engloba anticuerpos de tamaño completo, además de fragmentos de unión al antígeno, variantes, análogos, o derivados de tales anticuerpos, por ejemplo, anticuerpo que existe de forma natural o moléculas de inmunoglobulina o moléculas de anticuerpo manipuladas o fragmentos que se unen al antígeno de un modo similar a las moléculas de anticuerpo.

- 5 Como se usa en el presente documento, "inhibidor de la interacción de SEMA4D con un receptor de SEMA4D" se refiere a una "molécula de unión anti-SEMA4D", una "molécula de unión anti-plexinaB1", además de a un inhibidor de molécula pequeña de SEMA4D o un receptor de SEMA4D.

- 10 Como se usa en el presente documento, anticuerpos "humanos" o "completamente humanos" incluyen anticuerpos que tienen la secuencia de aminoácidos de una inmunoglobulina humana e incluyen anticuerpos aislados de bibliotecas de inmunoglobulina humana o de animales transgénicos para una o más inmunoglobulinas humanas y que no expresan inmunoglobulinas endógenas, como se describe más adelante y, por ejemplo, en la patente de EE.UU. N.º 5.939.598 por Kucherlapati et al. Anticuerpos "humanos" o "completamente humanos" también incluyen anticuerpos que comprenden al menos el dominio variable de una cadena pesada, o al menos los dominios variables de una cadena pesada y una cadena ligera, donde el (los) dominio(s) variable(s) tienen la secuencia de aminoácidos del (los) dominio(s) variable(s) de inmunoglobulinas humanas.

- 15 Anticuerpos "humanos" o "completamente humanos" también incluyen anticuerpos "humanos" o "completamente humanos", como se ha descrito anteriormente, que comprenden, consisten esencialmente en, o consisten en, variantes (incluyendo derivados) de moléculas de anticuerpo (por ejemplo, las regiones VH y/o regiones VL) descritas en el presente documento, cuyos anticuerpos o fragmentos de los mismos se unen inmuno-específicamente a un polipéptido SEMA4D o fragmento o variante del mismo. Pueden usarse técnicas convencionales conocidas para aquellos expertos en la materia para introducir mutaciones en la secuencia de nucleótidos que codifica un anticuerpo anti-SEMA4D humano, que incluyen, pero no se limitan a, mutagénesis dirigida al sitio y mutagénesis mediada por PCR que produce sustituciones de aminoácidos. Preferentemente, las variantes (incluyendo derivados) codifican menos de 50 sustituciones de aminoácidos, menos de 40 sustituciones de aminoácidos, menos de 30 sustituciones de aminoácidos, menos de 25 sustituciones de aminoácidos, menos de 20 sustituciones de aminoácidos, menos de 15 sustituciones de aminoácidos, menos de 10 sustituciones de aminoácidos, menos de 5 sustituciones de aminoácidos, menos de 4 sustituciones de aminoácidos, menos de 3 sustituciones de aminoácidos, o menos de 2 sustituciones de aminoácidos con respecto a la región VH de referencia, VHCDR1, VHCDR2, VHCDR3, región VL, VLCDR1, VLCDR2, o VLCDR3.

- 20 En ciertas realizaciones, las sustituciones de aminoácidos son sustitución de aminoácidos conservativa, tratada adicionalmente más adelante. Alternativamente, pueden introducirse mutaciones al azar a lo largo de toda o parte de la secuencia codificante, tal como por mutagénesis de saturación, y los mutantes resultantes pueden cribarse para actividad biológica para identificar mutantes que retienen actividad (por ejemplo, la capacidad de unirse a un polipéptido SEMA4D, por ejemplo, SEMA4D humana, murina, o tanto humana como murina). Tales variantes (o derivados de los mismos) de anticuerpos "humanos" o "completamente humanos" también pueden denominarse anticuerpos humanos o completamente humanos que son "optimizados" u "optimizados para unión al antígeno" e incluyen anticuerpos que tienen afinidad mejorada por el antígeno.

- 25 Los términos "anticuerpo" e "inmunoglobulina" se usan indistintamente en el presente documento. Un anticuerpo o inmunoglobulina comprende al menos el dominio variable de una cadena pesada, y normalmente comprende al menos los dominios variables de una cadena pesada y una cadena ligera. Las estructuras de inmunoglobulina básicas en los sistemas de vertebrado son relativamente bien entendidas. Véase, por ejemplo, Harlow et al. (1988) Antibodies: A Laboratory Manual (2ª ed.; Cold Spring Harbor Laboratory Press).

- 30 Como se usa en el presente documento, el término "inmunoglobulina" comprende diversas clases amplias de polipéptidos que pueden distinguirse bioquímicamente. Aquellos expertos en la materia apreciarán que las cadenas pesadas se clasifican como gamma, mu, alfa, delta o epsilon (γ , μ , α , δ , ϵ), con algunas subclases entre ellas (por ejemplo, $\gamma 1$ - $\gamma 4$). Es la naturaleza de esta cadena la que determina la "clase" del anticuerpo como IgG, IgM, IgA, IgG o IgE, respectivamente. Las subclases de inmunoglobulina (isotipos), por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, etc., están bien caracterizadas y se sabe que confieren especialización funcional. Versiones modificadas de cada una de estas clases e isotipos son fácilmente perceptibles para el experto en vista de la presente divulgación y, por consiguiente, están dentro del alcance de la presente invención. Todas las clases de inmunoglobulina están claramente dentro del alcance de la presente invención, la siguiente discusión generalmente se referirá a la clase de IgG de moléculas de inmunoglobulina. Con respecto a IgG, una molécula de inmunoglobulina estándar comprende dos polipéptidos de cadena ligera idénticos de peso molecular aproximadamente 23.000 Daltons, y dos polipéptidos de cadena pesada idénticos de peso molecular 53.000-70.000. Las cuatro cadenas normalmente se unen por enlaces disulfuro en una configuración en "Y" en la que las cadenas ligeras unen las cadenas pesadas empezando en la boca de la "Y" y continuando a través de la región variable.

- 35 Las cadenas ligeras se clasifican o bien como kappa o bien como lambda (κ , λ). Cada clase de cadena pesada puede unirse con cualquiera de una cadena ligera kappa o lambda. En general, las cadenas ligeras y pesadas se unen covalentemente entre sí, y las porciones de "cola" de las dos cadenas pesadas están unidas entre sí por enlaces disulfuro covalentes o enlaces no covalentes cuando las inmunoglobulinas se generan o bien por

hibridomas, linfocitos B o bien por células hospedadoras genéticamente manipuladas. En la cadena pesada, las secuencias de aminoácidos van de un extremo N en los extremos bifurcados de la configuración en Y al extremo C en el final de cada cadena.

Ambas de las cadenas ligeras y pesadas se dividen en regiones de homología estructural y funcional. Los términos "constante" y "variable" se usan funcionalmente. A este respecto, se apreciará que los dominios variables de tanto las porciones de cadena ligera (VL o VK) como pesada (VH) determinan el reconocimiento del antígeno y la especificidad. En cambio, los dominios constantes de la cadena ligera (CL) y la cadena pesada (CH1, CH2 o CH3) confieren propiedades biológicas importantes tales como secreción, movilidad transplacentaria, unión al receptor de Fc, unión al complemento, y similares. Por convenio, la numeración de los dominios de la región constante aumenta a medida que se vuelven más distales desde el sitio de unión al antígeno o extremo amino del anticuerpo. La porción del extremo N es una región variable y en la porción del extremo C está una región constante; los dominios CH3 y CL comprenden en realidad el extremo carboxi de la cadena pesada y ligera, respectivamente.

Como se indica anteriormente, la región variable permite que el anticuerpo reconozca selectivamente y se una específicamente a epítopes sobre antígenos. Es decir, se combinan el dominio VL y el dominio VH, o subconjunto de las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) dentro de estos dominios variables, de un anticuerpo para formar la región variable que define un sitio de unión al antígeno tridimensional. Esta estructura de anticuerpo cuaternaria forma el sitio de unión al antígeno presente en el extremo de cada brazo de la Y. Más específicamente, el sitio de unión al antígeno se define por tres CDR sobre cada una de las cadenas VH y VL. En algunos casos, por ejemplo, ciertas moléculas de inmunoglobulina derivadas de especies de camélido o manipuladas basándose en inmunoglobulinas de camélido, una molécula de inmunoglobulina completa puede consistir en cadenas pesadas solo, sin cadenas ligeras. Véase, por ejemplo, Hamers-Casterman et al., Nature 363:446-448 (1993).

En anticuerpos que existen de forma natural, las seis "regiones determinantes de la complementariedad" o "CDR" presentes en cada dominio de unión al antígeno son secuencias no contiguas cortas de aminoácidos que están específicamente situadas para formar el dominio de unión al antígeno a medida que el anticuerpo adopta su configuración tridimensional en un entorno acuoso. El resto de los aminoácidos en los dominios de unión al antígeno, denominadas las "regiones estructurales", muestran menos variabilidad intermolecular. Las regiones estructurales adoptan en gran medida una configuración de hoja β y las CDR forman bucles que conectan, y en algunos casos forman parte de, la estructura de hoja β . Así, las regiones estructurales actúan formando un armazón que proporciona el posicionamiento de las CDR en orientación correcta por interacciones intercatenarias, no covalentes. El dominio de unión al antígeno formado por las CDR posicionadas define una superficie complementaria al epítipo sobre el antígeno inmunorreactivo. Esta superficie complementaria promueve la unión no covalente del anticuerpo a su epítipo relacionado. Los aminoácidos que comprenden las CDR y las regiones estructurales, respectivamente, pueden ser fácilmente identificados para cualquier dominio variable de la cadena pesada o ligera dado por un experto habitual en la materia, ya que han sido definidos con precisión (véase más adelante).

En el caso en el que haya dos o más definiciones de un término que se usa y/o está aceptado dentro de la materia, la definición del término como se usa en el presente documento pretende incluir todos aquellos significados, a menos que se establezca explícitamente lo contrario. Un ejemplo específico es el uso del término "región determinante de la complementariedad" ("CDR") para describir los sitios de combinación de antígenos no contiguos encontrados dentro de la región variable de tanto polipéptidos de cadena pesada como ligera. Esta región particular se ha descrito por Kabat et al. (1983) U.S. Dept. of Health and Human Services, "Sequences of Proteins of Immunological Interest" y por Chothia y Lesk, J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987), donde las definiciones incluyen solapamientos o subconjuntos de restos de aminoácidos cuando se comparan entre sí. Sin embargo, la aplicación de cualquier definición para referirse a una CDR de un anticuerpo o variantes del mismo pretende estar dentro del alcance del término como se define y se usa en el presente documento. Restos de aminoácidos apropiados que engloban las CDR como se define por cada una de las referencias anteriormente citadas se exponen a continuación en la Tabla 1 como una comparación. Los números exactos de resto que engloban una CDR particular variarán dependiendo de la secuencia y el tamaño de la CDR. Aquellos expertos en la materia pueden determinar rutinariamente qué restos comprenden una CDR particular dada la secuencia de aminoácidos de la región variable del anticuerpo.

Tabla 1. Definiciones de CDR¹

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

	Kabat	Chothia
VL CDR3	89-97	91-96
"La numeración de todas las definiciones de CDR en la Tabla 1 es según los convenios de numeración expuestos por Kabat et al. (véase más adelante)."		

Kabat *et al.* también definieron un sistema de numeración para secuencias del dominio variable que es aplicable a cualquier anticuerpo. Un experto habitual en la materia puede asignar inequívocamente este sistema de "numeración de Kabat" a cualquier secuencia del dominio variable, sin depender de ningún dato experimental más allá de la propia secuencia. Como se usa en el presente documento, "numeración de Kabat" se refiere al sistema de numeración expuesto por Kabat et al. (1983) U.S. Dept. of Health and Human Services, "Sequence of Proteins of Immunological Interest". A menos que se especifique de otro modo, referencias a la numeración de las posiciones de restos de aminoácidos específicos en un anticuerpo anti-SEMA4D o fragmento de unión al antígeno, variante, o derivado del mismo, de la presente invención son según el sistema de numeración de Kabat.

Anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno para el uso de la invención incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos policlonales, monoclonales, multiespecíficos y biespecíficos en los que al menos un brazo es específico para SEMA4D, humanos, humanizados, primatizados o quiméricos, anticuerpos monocatenarios, fragmentos de unión al epítipo, por ejemplo, Fab, Fab' y F(ab')₂, Fd, Fvs, Fv monocatenarios (scFv), Fv unidos por disulfuro (sdFv), fragmentos que comprenden ya sea un dominio VL o VH, fragmentos producidos por una biblioteca de expresión de Fab, y anticuerpos antiidiotípicos (anti-Id) (incluyendo, por ejemplo, anticuerpos anti-Id para los anticuerpos anti-SEMA4D desvelados en el presente documento). Las moléculas de scFv son conocidas en la técnica y se describen, por ejemplo, en la patente de EE.UU. N.º 5.892.019. Las moléculas de inmunoglobulina o de anticuerpo de la invención pueden ser de cualquier tipo (por ejemplo, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA e IgY), clase (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2, etc.), o subclase de molécula de inmunoglobulina.

Como se usa en el presente documento, el término "porción de cadena pesada" incluye secuencias de aminoácidos derivadas de una cadena pesada de la inmunoglobulina. En ciertas realizaciones, un polipéptido que comprende una porción de cadena pesada comprende al menos uno de: un dominio VH, un dominio CH1, un dominio bisagra (por ejemplo, región bisagra superior, media y/o inferior), un dominio CH2, un dominio CH3, o una variante o fragmento de los mismos. Por ejemplo, un polipéptido de unión para uso en la invención puede comprender una cadena de polipéptidos que comprende un dominio CH1; una cadena de polipéptidos que comprende un dominio CH1, al menos una porción de un dominio bisagra y un dominio CH2; una cadena de polipéptidos que comprende un dominio CH1 y un dominio CH3; una cadena de polipéptidos que comprende un dominio CH1, al menos una porción de un dominio bisagra y un dominio CH3, o una cadena de polipéptidos que comprende un dominio CH1, al menos una porción de un dominio bisagra, un dominio CH2 y un dominio CH3. En otra realización, un polipéptido de la invención comprende una cadena de polipéptidos que comprende un dominio CH3. Además, un polipéptido de unión para uso en la invención puede carecer de al menos una porción de un dominio CH2 (por ejemplo, toda o parte de un dominio CH2). Como se expone anteriormente, se entenderá por un experto habitual en la materia que estos dominios (por ejemplo, las porciones de cadena pesada) pueden modificarse de forma que varíen en la secuencia de aminoácidos de la molécula de inmunoglobulina que existe de forma natural.

En ciertos anticuerpos anti-SEMA4D, o fragmentos de unión al antígeno, variantes, o derivados de los mismos desvelados en el presente documento, las porciones de cadena pesada de una cadena de polipéptidos de un multímero son idénticas a aquellas en una segunda cadena de polipéptidos del multímero. Alternativamente, los monómeros que contienen porción de cadena pesada de la invención no son idénticos. Por ejemplo, cada monómero puede comprender un sitio de unión diana diferente, formando, por ejemplo, un anticuerpo biespecífico.

Las porciones de cadena pesada de una molécula de unión para su uso en los métodos desvelados en el presente documento pueden derivar de diferentes moléculas de inmunoglobulina. Por ejemplo, una porción de cadena pesada de un polipéptido puede comprender un dominio CH1 derivado de una molécula de IgG1 y una región bisagra derivada de una molécula de IgG3. En otro ejemplo, una porción de cadena pesada puede comprender una región bisagra derivada, en parte, de una molécula de IgG1 y, en parte, de una molécula de IgG3. En otro ejemplo, una porción de cadena pesada puede comprender una bisagra quimérica derivada, en parte, de una molécula de IgG1 y, en parte, de una molécula de IgG4.

Como se usa en el presente documento, el término "porción de cadena ligera" incluye secuencias de aminoácidos derivadas de una cadena ligera de la inmunoglobulina, por ejemplo, una cadena ligera kappa o lambda. Preferentemente, la porción de cadena ligera comprende al menos uno de un dominio VL o CL.

Anticuerpos anti-SEMA4D, o fragmentos de unión al antígeno, variantes, o derivados de los mismos desvelados en el presente documento pueden describirse o especificarse en términos del (de los) epítipo(s) o porción (porciones) de un antígeno, por ejemplo, un polipéptido diana desvelado en el presente documento (por ejemplo, SEMA4D) que

reconocen o al que se unen específicamente. La porción de un polipéptido diana que interacciona específicamente con el dominio de unión al antígeno de un anticuerpo es un "epítotope", o un "determinante antigénico". Un polipéptido diana puede comprender un único epítotope, pero normalmente comprende al menos dos epítotoes, y puede incluir cualquier número de epítotoes, dependiendo del tamaño, conformación y tipo de antígeno. Además, debe observarse que un "epítotope" sobre un polipéptido diana puede ser o puede incluir elementos no de polipéptido, por ejemplo, un epítotope puede incluir una cadena lateral de hidrato de carbono.

Se cree que el tamaño mínimo de un epítotope de péptido o polipéptido para un anticuerpo tiene aproximadamente cuatro a cinco aminoácidos. Los epítotoes de péptido o polipéptido contienen preferentemente al menos siete, más preferentemente al menos nueve, y lo más preferentemente entre al menos aproximadamente 15 y aproximadamente 30 aminoácidos. Como una CDR puede reconocer un péptido o polipéptido antigénico en su forma terciaria, los aminoácidos que comprenden un epítotope no necesitan estar contiguos, y en algunos casos incluso pueden no estar sobre la misma cadena de péptido. Un epítotope de péptido o polipéptido reconocido por los anticuerpos anti-SEMA4D de la presente invención puede contener una secuencia de al menos 4, al menos 5, al menos 6, al menos 7, más preferentemente al menos 8, al menos 9, al menos 10, al menos 15, al menos 20, al menos 25, o entre aproximadamente 15 y aproximadamente 30 aminoácidos contiguos o no contiguos de SEMA4D.

Por "se une específicamente a" se indica generalmente que un anticuerpo se une a un epítotope mediante su dominio de unión al antígeno, y que la unión implica cierta complementariedad entre el dominio de unión al antígeno y el epítotope. Según esta definición, se dice que un anticuerpo "se une específicamente" a un epítotope cuando se une a ese epítotope, mediante su dominio de unión al antígeno más fácilmente de lo que se uniría a un epítotope no relacionado aleatorio. El término "especificidad" se usa en el presente documento para limitar la afinidad relativa por la que un cierto anticuerpo se une a un cierto epítotope. Por ejemplo, puede considerarse que el anticuerpo "A" tiene una especificidad más alta por un epítotope dado que el anticuerpo "B", o puede decirse que el anticuerpo "A" se une al epítotope "C" con una especificidad más alta que la que tiene por el epítotope "D" relacionado.

Por "se une preferencialmente" se indica que el anticuerpo se une específicamente a un epítotope más fácilmente de lo que se uniría a un epítotope relacionado, similar, homólogo, o análogo. Así, un anticuerpo que "se une preferencialmente" a un epítotope dado se uniría más probablemente a ese epítotope que a un epítotope relacionado, aún cuando un anticuerpo tal pueda reaccionar de forma cruzada con el epítotope relacionado.

A modo de ejemplo no limitante, puede considerarse que un anticuerpo se une a un primer epítotope preferencialmente si se une a dicho primer epítotope con una constante de disociación (K_D) que es inferior a la K_D del anticuerpo para el segundo epítotope. En otro ejemplo no limitante, puede considerarse que un anticuerpo se une a un primer antígeno preferencialmente si se une al primer epítotope con una afinidad que es al menos un orden de magnitud inferior a la K_D del anticuerpo para el segundo epítotope. En otro ejemplo no limitante, puede considerarse que un anticuerpo se une a un primer epítotope preferencialmente si se une al primer epítotope con una afinidad que es al menos dos órdenes de magnitud inferior a la K_D del anticuerpo para el segundo epítotope.

En otro ejemplo no limitante, puede considerarse que un anticuerpo se une a un primer epítotope preferencialmente si se une al primer epítotope con una constante de disociación ($k(\text{dis})$) que es inferior a la $k(\text{dis})$ del anticuerpo para el segundo epítotope. En otro ejemplo no limitante, puede considerarse que un anticuerpo se une a un primer epítotope preferencialmente si se une al primer epítotope con una afinidad que es al menos un orden de magnitud inferior a la $k(\text{dis})$ del anticuerpo para el segundo epítotope. En otro ejemplo no limitante, puede considerarse que un anticuerpo se une a un primer epítotope preferencialmente si se une al primer epítotope con una afinidad que es al menos dos órdenes de magnitud inferior a la $k(\text{dis})$ del anticuerpo para el segundo epítotope. Puede decirse que un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno, variante, o derivado desvelado en el presente documento se une a un polipéptido diana desvelado en el presente documento (por ejemplo, SEMA4D, por ejemplo, SEMA4D humana, murina, o tanto humana como murina) o un fragmento o variante del mismo con una constante de disociación ($k(\text{dis})$) inferior o igual a $5 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$, 10^{-2} s^{-1} , $5 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ o 10^{-3} s^{-1} . Más preferentemente, puede decirse que un anticuerpo de la invención se une a un polipéptido diana desvelado en el presente documento (por ejemplo, SEMA4D, por ejemplo, SEMA4D humana, murina, o tanto humana como murina) o un fragmento o variante del mismo con una constante de disociación ($k(\text{dis})$) inferior o igual a $5 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$, 10^{-4} s^{-1} , $5 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$, o 10^{-5} s^{-1} , $5 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$, 10^{-6} s^{-1} , $5 \times 10^{-7} \text{ s}^{-1}$ o 10^{-7} s^{-1} .

Puede decirse que un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno, variante, o derivado desvelado en el presente documento, se une a un polipéptido diana desvelado en el presente documento (por ejemplo, SEMA4D, por ejemplo, SEMA4D humana, murina, o tanto humana como murina) o un fragmento o variante del mismo con una constante de asociación ($k(\text{as})$) superior o igual a $10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, $5 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, $10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ o $5 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Más preferentemente, puede decirse que un anticuerpo de la invención se une a un polipéptido diana desvelado en el presente documento (por ejemplo, SEMA4D, por ejemplo, SEMA4D humana, murina, o tanto humana como murina) o un fragmento o variante del mismo con una constante de asociación ($k(\text{as})$) superior o igual a $10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, $5 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, o $5 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ o $10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$.

Se dice que un anticuerpo inhibe competitivamente la unión de un anticuerpo de referencia a un epítotope dado si se une preferencialmente a ese epítotope hasta el punto que bloquee, hasta cierto grado, la unión del anticuerpo de referencia al epítotope. La inhibición competitiva puede determinarse por cualquier método conocido en la técnica, por

ejemplo, ensayos de ELISA de competición. Puede decirse que un anticuerpo inhibe competitivamente la unión del anticuerpo de referencia a un epítipo dado al menos el 90 %, al menos el 80 %, al menos el 70 %, al menos el 60 %, o al menos el 50 %.

Como se usa en el presente documento, el término "afinidad" se refiere a una medida de la intensidad de la unión de un epítipo individual con la CDR de una molécula de inmunoglobulina. Véase, por ejemplo, Harlow et al. (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2ª ed.) páginas 27-28. Como se usa en el presente documento, el término "avidez" se refiere a la estabilidad global del complejo entre una población de inmunoglobulinas y un antígeno, es decir, la intensidad de combinación funcional de una mezcla de inmunoglobulinas con el antígeno. Véase, por ejemplo, Harlow en las páginas 29-34. La avidez está relacionada con tanto la afinidad de moléculas de inmunoglobulina individuales en la población con epítopes específicos, como también las valencias de las inmunoglobulinas y el antígeno. Por ejemplo, la interacción entre un anticuerpo monoclonal bivalente y un antígeno con una estructura de epítipo altamente repetitiva, tal como un polímero, sería una de alta avidez.

Los anticuerpos anti-SEMA4D o fragmentos de unión al antígeno para el uso de la invención también pueden describirse o especificarse en términos de su reactividad cruzada. Como se usa en el presente documento, el término "reactividad cruzada" se refiere a la capacidad de un anticuerpo, específico por un antígeno, para reaccionar con un segundo antígeno; una medida de vinculación entre dos sustancias antigénicas diferentes. Así, un anticuerpo es reactivo de forma cruzada si se une a un epítipo distinto del que indujo su formación. El epítipo reactivo de forma cruzada generalmente contiene muchas de las mismas características estructurales complementarias que el epítipo inductor, y en algunos casos, puede en realidad adaptarse mejor que el original.

Por ejemplo, ciertos anticuerpos tienen algún grado de reactividad cruzada, por que se unen a epítopes relacionados, pero no idénticos, por ejemplo, epítopes con al menos el 95 %, al menos el 90 %, al menos 85 %, al menos el 80 %, al menos el 75 %, al menos el 70 %, al menos el 65 %, al menos el 60 %, al menos el 55 % y al menos el 50 % de identidad (como se calcula usando métodos conocidos en la técnica y descritos en el presente documento) con un epítipo de referencia. Puede decirse que un anticuerpo tiene poca o ninguna reactividad cruzada si no se une a epítopes con menos del 95 %, menos del 90 %, menos del 85 %, menos del 80 %, menos del 75 %, menos del 70 %, menos del 65 %, menos del 60 %, menos del 55 % y menos del 50 % de identidad (como se calcula usando métodos conocidos en la técnica y descritos en el presente documento) con un epítipo de referencia. Un anticuerpo puede ser considerado "altamente específico" para un cierto epítipo si no se une a ningún otro análogo, ortólogo, u homólogo de ese epítipo.

Las moléculas de unión anti-SEMA4D, por ejemplo, anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno, para el uso de la invención también pueden describirse o especificarse en términos de su afinidad de unión a un polipéptido de la invención, por ejemplo, SEMA4D, por ejemplo, SEMA4D humana, murina, o tanto humana como murina. Afinidades de unión preferidas incluyen aquellas con una constante de disociación o K_d inferior a 5×10^{-2} M, 10^{-2} M, 5×10^{-3} M, 10^{-3} M, 5×10^{-4} M, 10^{-4} M, 5×10^{-5} M, 10^{-5} M, 5×10^{-6} M, 10^{-6} M, 5×10^{-7} M, 10^{-7} M, 5×10^{-8} M, 10^{-8} M, 5×10^{-9} M, 10^{-9} M, 5×10^{-10} M, 10^{-10} M, 5×10^{-11} M, 10^{-11} M, 5×10^{-12} M, 10^{-12} M, 5×10^{-13} M, 10^{-13} M, 5×10^{-14} M, 10^{-14} M, 5×10^{-15} M, o 10^{-15} M. En ciertas realizaciones, la molécula de unión anti-SEMA4D, por ejemplo, un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo, de la invención se une a SEMA4D humana con una K_d de aproximadamente 5×10^{-9} a aproximadamente 6×10^{-9} . En otra realización, la molécula de unión anti-SEMA4D, por ejemplo, un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo, de la invención se une a SEMA4D murina con una K_d de aproximadamente 1×10^{-9} a aproximadamente 2×10^{-9} .

Como se usa en el presente documento, se mantendrá que el término "anticuerpo quimérico" significa cualquier anticuerpo en el que la región inmunorreactiva o sitio se obtiene o deriva de una primera especie y la región constante (que puede estar intacta, parcial o modificada según la presente invención) se obtiene de una segunda especie. En realizaciones preferidas, la región de unión diana o sitio será de una fuente no humana (por ejemplo, ratón o primate) y la región constante es humana.

Como se usa en el presente documento, el término "anticuerpo modificado" se refiere a un anticuerpo en el que el dominio variable en cualquiera de la cadena pesada o ligera o ambas está alterado por sustitución al menos parcial de una o más CDR de un anticuerpo de especificidad conocida y, si fuera necesario, por sustitución de la región estructural parcial y cambio de secuencia. Aunque las CDR pueden derivar de un anticuerpo de la misma clase o incluso subclase que el anticuerpo del que derivan las regiones estructurales, se prevé que las CDR deriven de un anticuerpo de clase diferente y preferentemente de un anticuerpo de una especie diferente. Un anticuerpo modificado en el que una o más CDR "donantes" de un anticuerpo no humano de especificidad conocida se injertan en una región estructural de la cadena pesada o ligera humana se denomina en el presente documento un "anticuerpo humanizado". Puede no ser necesario sustituir todas las CDR con las CDR completas del dominio variable del donante para transferir la capacidad de unión al antígeno de un dominio variable a otro. Más bien, puede solo ser necesario transferir aquellos restos que son necesarios para mantener la actividad del sitio de unión diana.

Se reconoce además que las regiones estructurales dentro del dominio variable en una cadena pesada o ligera, o ambas, de un anticuerpo humanizado pueden comprender únicamente restos de origen humano, en cuyo caso estas regiones estructurales del anticuerpo humanizado se denominan "regiones estructurales completamente humanas"

(por ejemplo, MAb VX15/2503, desvelado en la publicación de solicitud de patente de EE.UU. N.º US 2010/0285036 A1 como MAb 2503). Alternativamente, uno o más restos de la(s) región (regiones) estructural(es) del dominio variable del donante pueden manipularse dentro de la posición correspondiente de la(s) región (regiones) estructural(es) de un dominio variable en una cadena pesada o ligera, o ambas, de un anticuerpo humanizado si fuera necesario para mantener la apropiada unión o para potenciar la unión al antígeno SEMA4D. Una región estructural humana que ha sido manipulada de este modo comprendería así una mezcla de restos humanos y de donante de la región estructural, y se denomina en el presente documento una "región estructural parcialmente humana".

Por ejemplo, la humanización de un anticuerpo anti-SEMA4D puede realizarse esencialmente siguiendo el método de Winter y colaboradores (Jones et al., *Nature* 321:522-525 (1986); Riechmann et al., *Nature* 332:323-327 (1988); Verhoeyen et al., *Science* 239:1534-1536 (1988)), sustituyendo CDR de roedor o de roedor mutante o secuencias de CDR con las secuencias correspondientes de un anticuerpo anti-SEMA4D humano. Véanse también las patentes de EE.UU. N.º 5.225.539; 5.585.089; 5.693.761; 5.693.762; 5.859.205. El anticuerpo anti-SEMA4D humanizado resultante comprendería al menos una CDR de roedor o de roedor mutante dentro de las regiones estructurales completamente humanas del dominio variable de la cadena pesada y/o ligera del anticuerpo humanizado. En algunos casos, restos dentro de las regiones estructurales de uno o más dominios variables del anticuerpo anti-SEMA4D humanizado están sustituidos con restos no humanos (por ejemplo, de roedor) correspondientes (véanse, por ejemplo, las patentes de EE.UU. N.º 5.585.089; 5.693.761; 5.693.762; y 6.180.370), en cuyo caso el anticuerpo anti-SEMA4D humanizado resultante comprendería regiones estructurales parcialmente humanas dentro del dominio variable de la cadena pesada y/o ligera.

Además, los anticuerpos humanizados pueden comprender restos que no se encuentran en el anticuerpo receptor o en el anticuerpo donante. Estas modificaciones se hacen para refinar adicionalmente el rendimiento del anticuerpo (por ejemplo, para obtener afinidad deseada). En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todos de al menos uno, y normalmente dos, dominios variables, en los que todas o sustancialmente todas las CDR se corresponden con las de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las regiones estructurales son aquellas de una secuencia de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado también comprenderá opcionalmente al menos una porción de una región constante de inmunoglobulina (Fc), normalmente la de una inmunoglobulina humana. Para más detalles véanse Jones et al., *Nature* 331:522-525 (1986); Riechmann et al., *Nature* 332:323-329 (1988); y Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2:593-596 (1992). Por consiguiente, tales anticuerpos "humanizados" pueden incluir anticuerpos en los que sustancialmente menos de un dominio variable humano intacto ha sido sustituido con la secuencia correspondiente de una especie no humana. En la práctica, los anticuerpos humanizados normalmente son anticuerpos humanos en los que algunos restos de CDR, y posiblemente algunos restos de la región estructural, están sustituidos con restos de sitios análogos en anticuerpos de roedor. Véanse, por ejemplo, las patentes de EE.UU. N.º 5.225.539; 5.585.089; 5.693.761; 5.693.762; 5.859.205. Véanse también la patente de EE.UU. N.º 6.180.370 y la publicación internacional N.º WO 01/27160, donde se desvelan anticuerpos humanizados y técnicas para producir anticuerpos humanizados que tienen afinidad mejorada por un antígeno predeterminado.

II. Barrera hematoencefálica ("BBB")

La barrera hematoencefálica (BBB) es una interfase activa entre la sangre circulante y el sistema nervioso central (SNC). La BBB limita el libre movimiento de diferentes sustancias entre los dos compartimentos y desempeña una función crucial en el mantenimiento de la homeostasis del SNC. La BBB tiene tanto una función de barrera como una función de vehículo. Como una barrera, la BBB limita el movimiento de células y sustancias posiblemente tóxicas o peligrosas de la sangre al cerebro. Como un vehículo, por otra parte, la BBB es responsable de transportar nutrientes al cerebro y eliminar metabolitos.

La BBB está principalmente compuesta de tres componentes: células endoteliales, astrocitos y pericitos. Las células endoteliales forman una hoja continua que cubre la superficie interna de los capilares y vasos sanguíneos en el cerebro (Ransohoff et al., "Three or More Routes for Leukocyte Migration Into the Central Nervous System", *Nature Rev. Immun.* 3:569-581 (2003)). Las células endoteliales están localizadas adyacentes a la membrana basal, que consiste principalmente en colágeno IV, fibronectina, laminina y proteoglicanos, y están interconectadas por zonas de oclusión que forman una estructura de tipo cinturón en la región apical de las células. Las células endoteliales limitan la difusión de objetos microscópicos (por ejemplo, bacterias) y moléculas grandes o hidrófilas en el parénquima cerebral y líquido cefalorraquídeo (LCR), mientras que permiten la difusión de moléculas hidrófobas pequeñas (O₂, hormonas, CO₂). Las células de la barrera transportan activamente productos metabólicos tales como glucosa a través de la barrera con proteínas específicas.

Las células endoteliales que forman los capilares del cerebro son diferentes de aquellas encontradas en otros tejidos en el cuerpo. Las células endoteliales de capilares cerebrales se unen juntas por zonas de oclusión intercelulares que forman una pared continua contra la difusión pasiva de moléculas de la sangre al cerebro y otras partes del SNC (incluyendo líquido cefalorraquídeo, LCR). Estas células también son diferentes por que tienen pocas vesículas pinocíticas que en otros tejidos permiten el transporte algo no selectivo a través de la pared del capilar. También carecen de huecos o canales continuos que transcurren entre las células que permitirían el paso no limitado.

Además de las células endoteliales, la BBB también está compuesta de pericitos y astrocitos. Los pericitos se localizan dentro de la membrana basal, interactúan con células endoteliales y desempeñan una función importante en la regulación de la proliferación endotelial, angiogénesis y procesos inflamatorios. Los astrocitos son células de la glía con forma de estrella características en el cerebro y la médula espinal y son las células más abundantes del cerebro humano. Realizan muchas funciones, que incluyen soporte bioquímico de células endoteliales que forman la barrera hematoencefálica, provisión de nutrientes al tejido nervioso, mantenimiento del equilibrio de iones extracelulares, y una función en el proceso de reparación y cicatrización del cerebro y la médula espinal tras lesiones traumáticas.

La barrera hematoencefálica funciona garantizando que el entorno del cerebro esté constantemente controlado. Los niveles de diversas sustancias en la sangre, tales como hormonas, aminoácidos e iones, experimentan frecuentes fluctuaciones pequeñas que pueden ser provocadas por actividades tales como comer y hacer ejercicio (Goldstein et al., "The Blood-Brain Barrier", *Scientific American* 255:74-83 (1986); Pardridge, "Receptor-Mediated Peptide Transport Through the Blood-Brain Barrier", *Endocrin. Rev.* 7:314-330 (1986)). Si el cerebro no se protegió por la barrera hematoencefálica de estas variaciones en la composición de suero, el resultado podría ser actividad neural no controlada.

El aislamiento del cerebro de la circulación sanguínea no es completo. Si esto fuera el caso, el cerebro sería incapaz de funcionar adecuadamente debido a la falta de nutrientes y debido a la necesidad de intercambios químicos con el resto del cuerpo. La presencia de sistemas de transporte específicos dentro de las células endoteliales capilares asegura que el cerebro reciba, de una manera controlada, todos los compuestos requeridos para el crecimiento y la función normal. En muchos casos, estos sistemas de transporte consisten en proteínas asociadas a la membrana, que se unen y transportan selectivamente ciertas moléculas a través de las membranas de barrera. Estas proteínas transportadoras son conocidas como vehículos transportadores de solutos.

Aunque la BBB sirve para proteger el cerebro y el sistema nervioso central del daño de moléculas y células extrañas o externas, moléculas y células extrañas o externas pueden frecuentemente cruzar la BBB y, en números limitados, pueden incluso ser beneficiosas, tal como para la supervivencia inmunitaria del SNC. Sin embargo, cuando células altamente activas, tales como, por ejemplo, linfocitos B, linfocitos T, leucocitos y macrófagos, cruzan la BBB en exceso y llegan al cerebro, pueden producir daño al cerebro. Pacientes que padecen edema, traumatismos cerebrales, accidente cerebrovascular y esclerosis múltiple, por ejemplo, presentan una rotura de la BBB.

Se ha estudiado el efecto de la BBB sobre diversos trastornos neuroinflamatorios (Zlokovic BV, "The Blood-Brain Barrier in Health and Chronic Neurodegenerative Disorders", *Neuron* 57: 178-201 (2008); Zhong Z et al., "ALS-causing SOD1 mutants generate vascular changes prior to motor neuron degeneration", *Nature Neuroscience* 11(4): 420-422 (2008); Hawkins BT et al., "The Blood-Brain Barrier/neurovascular Unit in Health and Disease", *Pharmacological Rev* 57 (2): 173-185 (2005); Oby E et al., "The Blood-Brain Barrier and Epilepsy", *Epilepsia* 47(11): 1761-1774 (2006)). Además, existen indicios cada vez mayores de que la inflamación y la barrera hematoencefálica (BBB) (Banks y Erickson, 2010; Lochhead et al., 2010) participan en la patogénesis de enfermedades neurológicas tales como meningitis (van der et al., 2004), edema cerebral (Stamatovic et al., 2006), enfermedad de Alzheimer (Kalaria, 1992), enfermedad de Parkinson (Westin, J.E., et. al., "Endothelial Proliferation and Increased Blood-Brain Barrier Permeability in the Basal Ganglia in a Rat Model of 3,4-Dihydroxyphenyl-L-Alanine-Induced Dyskinesia", *The Journal of Neuroscience* 26(37): 9448-9461 (2006)) y esclerosis múltiple (Minagar y Alexander, 2003).

En el caso de esclerosis múltiple, por ejemplo, se ha mostrado usando imagen por resonancia magnética ("IRM"), que cuando una persona está experimentando un "ataque" de EM, la BBB se ha roto en una sección del cerebro o médula espinal, permitiendo que los linfocitos T crucen y ataquen la mielina que protege y aísla las neuronas de los sistemas nerviosos centrales en tanto el cerebro como la médula espinal (Zlokovic 2008; Waubant E., "Biomarkers indicative of blood-brain barrier disruption in multiple sclerosis". *Disease Markers* 22 (4): 235-44 (2006)).

La meningitis, por otra parte, se produce cuando hay una inflamación de las membranas que rodean el cerebro y la médula espinal (estas membranas se conocen como meninges). Cuando las meninges están inflamadas, la barrera hematoencefálica puede romperse, permitiendo que tanto las células inflamatorias como diversas sustancias (incluyendo ya sea toxinas o antibióticos) entren en el cerebro (Beam, TR Jr., et al. (diciembre de 1977). "Blood, brain, and cerebrospinal fluid concentrations of several antibiotics in rabbits with intact and inflamed meninges". *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 12 (6): 710-6).

Similarmente, en el caso de enfermedad de Parkinson (EP), se ha sugerido que la absorción o metabolismo de toxinas de EP putativas, y su defectuosa eliminación a través de la BBB, debido a la baja actividad de la P-glucoproteína transportadora (P-gp), una bomba de salida dependiente de ATP que media en la rápida eliminación de metabolitos lipófilos tóxicos ingeridos, puede desempeñar una función en la patogénesis de EP (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). La neuroinflamación también parece ser un hallazgo ubicuo en pacientes con EP y modelos experimentales de EP. Se han descrito la activación de fagocitos, elevada síntesis y liberación de procitocinas inflamatorias, la activación del complemento, activación de la microglía y liberación de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Whitton, P.S. Inflammation as a causative factor in the aetiology of Parkinson's disease. *Br. J. Pharmacol.* 150, 963-976, 2007).

En epilepsia, estudios han implicado el fallo de la función de la barrera hematoencefálica en desencadenar convulsiones crónicas o agudas debido a ciertas interacciones entre una proteína común de la sangre, la albúmina, y los astrocitos. Estos hallazgos sugieren que las convulsiones agudas son un resultado de la rotura de la BBB por ya sea mecanismos artificiales o inflamatorios (Oby, E; et al. (2006). "The Blood-Brain Barrier and Epilepsy" (PDF). Epilepsia 47 (11): 161-1774).

En pacientes con enfermedad de Alzheimer (EA), los indicios indican a la rotura de la barrera hematoencefálica en permitir que el plasma sanguíneo que contiene amiloide beta ($A\beta$) entre en el cerebro a través de RAGE, un transportador de la entrada importante para $A\beta$ a través de la BBB. Los estudios han mostrado que la interacción $A\beta$ /RAGE produce la transcitosis de $A\beta$ circulante a través de la BBB en el parénquima cerebral y su unión a neuronas, activación endotelial mediada por NF- κ B que produce la secreción de procitocinas inflamatorias, la expresión de moléculas de adhesión y la generación de endotelina-1, que suprime CBF (circulación sanguínea cerebral). Además, se ha mostrado que la interacción $A\beta$ /RAGE contribuye a la destrucción neuronal, produciendo daño oxidativo a neuronas que expresan RAGE y que activan la microglía (Zlokovic, B.V. The Blood-Brain Barrier in Health and Chronic Neurodegenerative Disorders. Neuron 57, 178-201, 2008). La defectuosa salida de $A\beta$ fuera del parénquima cerebral y en la microvasculatura mediante la BBB también se ha encontrado en el marco de la patogénesis de EA y se ha atribuido, en parte, a función de la proteína 1 relacionada con el receptor de lipoproteína de baja densidad (LRP1) comprometido. LRP1 es una proteína de la membrana BBB abluminal que se une y transporta diferentes conformeros estructurales de $A\beta$ (Deane et al., "LRP/amyloid beta-peptide interaction mediates differential brain efflux of A β isoforms." Neuron 43, 333-344, 2004). La exposición de $A\beta$ desplaza los patrones de expresión de la superficie celular de proteínas de la zona de oclusión, que incluyen claudina-5 y ZO-2, de células endoteliales microvasculares del cerebro al citoplasma (Marco et al., "Amyloid β -peptide 1-42 alters tight junction protein distribution and expression in brain microvessel endothelial cells." Neurosci. Lett. 401, 219-224, 2006), y compromete gravemente la resistencia eléctrica transendotelial (TEER) de monocapas de estas células (Gonzalez-Velasquez et al., "Soluble aggregates of the amyloid-beta protein selectively stimulate permeability in human brain microvascular endothelial monolayers." J. Neurochem. 107, 466-477, 2008).

En esclerosis lateral amiotrófica (ELA), los estudios han sugerido que la rotura de BBB puede producir la fuga de proteínas del suero que interaccionan con neuronas motoras para producir ROS (especies reactivas de oxígeno) e iniciar una respuesta autoinmunitaria, causando desmielinización, rotura de la transmisión neuronal y muerte celular (Zlokovic 2008).

Un estudio reciente sugiere que el debilitamiento de la BBB puede resultar de una perturbación en células endoteliales mediadas mediante su receptor de VEGF-A (Argaw AT et al., "VEGF-mediated disruption of endothelial CLN-5 promotes blood-brain barrier breakdown", PNAS 106(6): 1977-1982 (2009)). Según ese estudio, VEGF-A, que deriva de astrocitos, se dirige a y rompe la expresión de tanto las proteínas de la zona de oclusión transmembranaria endotelial claudina-5 (CLN-5) como ocludina (OCLN). Como la expresión de tanto CLN-5 como OCLN disminuye, aumenta la rotura de la BBB.

Como se muestra en los presentes ejemplos, otro posible mecanismo para el debilitamiento de la BBB es el resultado de la perturbación de células endoteliales mediante el receptor de alta afinidad de plexina-B1 (1 nM) por SEMA4D. La plexina-B1 puede ser expresada por células endoteliales. En presencia de SEMA4-D, las células endoteliales pueden experimentar una transformación que altera la morfología o función de las células endoteliales, produciendo un debilitamiento de la BBB, por ejemplo, mediante la modificación de zonas de oclusión. Este debilitamiento de la BBB puede, a su vez, aumentar la permeabilidad de la BBB a células y moléculas y permitir que tales células y moléculas entren y alteren la actividad del cerebro y el sistema nervioso central. La adición de cualquier anti-SEMA4D o anti-plexina-B1, por consiguiente, puede prevenir que las células endoteliales experimenten una transformación y reducir el debilitamiento de la BBB.

III. Descripción de polipéptidos diana

Como se usa en el presente documento, los términos "semaforina-4D", "SEMA4D" y "polipéptido SEMA4D" se usan intercambiamente, ya que son "SEMA4D" y "Sema4D". En ciertas realizaciones, SEMA4D se expresa sobre la superficie de o es secretada por una célula. En otra realización, SEMA4D está unida a membrana. En otras realizaciones, SEMA4D es soluble, por ejemplo, SEMA4Ds. En otras realizaciones, SEMA4D puede incluir una SEMA4D de tamaño completo o un fragmento de la misma, o un polipéptido de variante SEMA4D, en el que el fragmento de SEMA4D o polipéptido de variante SEMA4D retiene alguna o todas las propiedades funcionales de SEMA4D de tamaño completo.

La proteína humana SEMA4D de tamaño completo es una proteína transmembranaria homodimérica que consiste en dos cadenas de polipéptidos de 150 kDa. SEMA4D pertenece a la familia de la semaforina de los receptores de la superficie celular y también se denomina CD100. Tanto SEMA4D/Sema4D humana como de ratón son escindidas proteolíticamente de su forma transmembranaria para generar formas solubles de 120 kDa, que indica la existencia de dos isoformas de Sema4D (Kumanogoh et al., J. Cell Science 116(7):3464 (2003)). Las semaforinas incluyen proteínas solubles y unidas a membrana que fueron originalmente definidas como factores de orientación axonal que desempeñan una función importante en el establecimiento de conexiones precisas entre neuronas y su diana apropiada. Estructuralmente considerada una semaforina de clase IV, la SEMA4D de tamaño completo incluye una

secuencia señal del extremo amino seguida de un dominio 'Sema' característico que contiene 17 restos de cisteína conservados, un dominio similar a Ig, un tramo rico en lisina, una región transmembranaria hidrófoba y una cola citoplásmica.

Cada cadena de polipéptidos de SEMA4D incluye una secuencia señal de aproximadamente 13 aminoácidos seguida de un dominio de semaforina de aproximadamente 512 aminoácidos, un dominio similar a inmunoglobulina (similar a Ig) de aproximadamente 65 aminoácidos, tramo rico en lisina de 104 aminoácidos, una región transmembranaria hidrófoba de aproximadamente 19 aminoácidos y una cola citoplásmica de 110 aminoácidos. Un sitio consenso para la fosforilación de tirosina en la cola citoplásmica soporta la asociación predicha de SEMA4D con una tirosina cinasa (Schlossman, et al., Eds. (1995) Leucocyte Typing V (Oxford University Press, Oxford)).

Se sabe que SEMA4D tiene al menos dos receptores. Uno de los receptores, plexina-B1, se expresa en tejidos no linfoides y se ha mostrado que es un receptor de alta afinidad (1 nM) por SEMA4D (Tamagnone et al., Cell 99:71-80 (1999)). Se ha mostrado que la estimulación por SEMA4D de la señalización de plexina-B1 induce el colapso del cono de crecimiento de neuronas, e induce el colapso de la extensión del proceso y la apoptosis de oligodendrocitos (Giraudon et al., J. Immunol. 172:1246-1255 (2004); Giraudon et al., NeuroMolecular Med. 7:207-216 (2005)). Después de la unión a SEMA4D, la señalización de plexina B1 media en la inactivación de R-Ras, que conduce a una disminución en la unión mediada por integrina a la matriz extracelular, además de a la activación de RhoA, que conduce a la reorganización del citoesqueleto y migración celular. Véanse Kruger et al., Nature Rev. Mol. Cell Biol. 6:789-800 (2005); Pasterkamp, TRENDS in Cell Biology 15:61-64 (2005)).

En tejidos linfoides se utiliza CD72 como un receptor de baja afinidad (300 nM) de SEMA4D (Kumanogoh et al., Immunity 13:621-631 (2000)). Los linfocitos B y las APC expresan CD72, y los anticuerpos anti-CD72 tienen muchos de los mismos efectos que SEMA4Ds, tales como el potenciamiento de las respuestas de linfocitos B inducidas por CD40 y la eliminación por linfocito B de CD23. Se cree que CD72 actúa de regulador negativo de las respuestas de linfocitos B reclutando la tirosina fosfatasa SHP-1, que puede asociarse con muchos receptores inhibidores. La interacción de SEMA4D con CD72 produce la disociación de SHP-1, y la pérdida de esta señal de activación negativa. Se ha mostrado que SEMA4D promueve la estimulación de linfocitos T y la agregación de linfocitos B y la supervivencia *in vitro*. La adición de células que expresan SEMA4D o SEMA4Ds potencia la proliferación de linfocitos B inducida por CD40 y la producción de inmunoglobulina *in vitro*, y acelera las respuestas *in vivo* de anticuerpos (Ishida et al., Inter. Immunol. 15:1027-1034 (2003); Kumanogoh y H. Kukutani, Trends in Immunol. 22:670-676 (2001)). La SEMA4Ds potencia la maduración inducida por CD40 de DC, que incluye la regulación por incremento de moléculas coestimulantes y la elevada secreción de IL-12. Además, SEMA4Ds puede inhibir la migración de células inmunitarias, que puede ser invertida mediante la adición de anticuerpos anti-SEMA4D bloqueantes (Elhabazi et al., J. Immunol. 166:4341-4347 (2001); Delaire et al., J. Immunol. 166:4348-4354 (2001)).

Sema4D se expresa a altos niveles en órganos linfoides, que incluye el bazo, timo y los ganglios linfáticos, y en órganos no linfoides, tales como el cerebro, corazón y riñón. En los órganos linfoides, Sema4D se expresa abundantemente en linfocitos T en reposo, pero solo se expresa débilmente en linfocitos B en reposo y células presentadoras de antígeno (APC), tales como células dendríticas (DC). La activación celular aumenta la expresión superficial de SEMA4D, además de la generación de SEMA4D soluble (SEMA4Ds).

El patrón de expresión de SEMA4D sugiere que desempeña una función fisiológica importante, además de patológica, en el sistema inmunitario. Se ha mostrado que SEMA4D promueve la activación, agregación y supervivencia de linfocitos B; potencia la proliferación inducida por CD40 y la producción de anticuerpos; potencia la respuesta de anticuerpos a antígenos dependientes de linfocitos T; aumenta la proliferación de linfocitos T; potencia la maduración de células dendríticas y la capacidad para estimular linfocitos T; y está directamente implicada en la desmielinización y degeneración axonal (Shi et al., Immunity 13:633-642 (2000); Kumanogoh et al., J Immunol 169:1175-1181 (2002); y Watanabe et al., J Immunol 167:4321-4328 (2001)).

Ratones inactivados en SEMA4D (SEMA4D^{-/-}) han proporcionado evidencia adicional de que SEMA4D desempeña una función importante en tanto las respuestas inmunitarias humores como celulares. No se conocen anomalías importantes de tejidos no linfoides en ratones SEMA4D^{-/-}. Células dendríticas (DC) de los ratones SEMA4D^{-/-} tienen mala capacidad aloestimulante y muestran defectos en la expresión de moléculas coestimulantes, que pueden ser rescatadas mediante la adición de SEMA4Ds. Ratones deficientes en SEMA4D (SEMA4D^{-/-}) dejan de desarrollar encefalitis autoinmunitaria experimental inducida por el péptido de glucoproteína de oligodendrocitos de mielina, debido a que los linfocitos T específicos de la glucoproteína de oligodendrocitos de mielina son poco generados en ausencia de SEMA4D (Kumanogoh et al., J Immunol 169:1175-1181 (2002)). También se detecta una cantidad significativa de SEMA4D soluble en los sueros de ratones MRL/lpr propensos a la autoinmunidad (modelo de enfermedades autoinmunitarias sistémicas tales como LES), pero no en ratones normales. Además, los niveles de SEMA4Ds se correlacionan con niveles de auto-anticuerpos y aumentan con la edad (Wang et al., Blood 97:3498-3504 (2001)). También se ha mostrado que SEMA4D soluble se acumula en el líquido cefalorraquídeo cerebral y los sueros de pacientes con enfermedad desmielinizante, y SEMA4Ds induce la apoptosis de precursores neurales pluripotentes humanos (células de Dev), y tanto inhibe la extensión del proceso como induce la apoptosis de oligodendrocitos de rata *in vitro* (Giraudon et al., J Immunol 172(2):1246-1255 (2004)). Esta apoptosis se bloqueó por un MAb anti-SEMA4D.

IV. Anticuerpos anti-SEMA4D

Se han descrito en la materia anticuerpos que se unen SEMA4D. Véanse, por ejemplo, las publicaciones de EE.UU. N.º 2008/0219971 A1, US 2010/0285036 A1 y US 2006/0233793 A1, las solicitudes de patente internacional WO 93/14125, WO 2008/100995 y WO 2010/129917, y Herold et al., Int. Immunol. 7(1): 1-8 (1995).

La presente solicitud generalmente se basa en un método de disminución de la permeabilidad de la barrera hematoencefálica en un sujeto, por ejemplo, un paciente humano, que tiene un trastorno neuroinflamatorio, por ejemplo, un trastorno inflamatorio o trastorno neurodegenerativo del SNC, que comprende la administración de un anticuerpo que se une específicamente a SEMA4D, o un fragmento de unión al antígeno, del mismo. El anticuerpo bloquea la interacción de SEMA4D con plexina-B1. Los anticuerpos anti-SEMA4D que tienen estas propiedades pueden usarse en los métodos proporcionados en el presente documento. Los anticuerpos que pueden usarse incluyen, pero no se limitan a, MAb VX15/2503, 67, y 76 y fragmentos de unión al antígeno, variantes, o derivados de los mismos que se describen completamente en el documento US 2010/0285036 A1. Anticuerpos adicionales que pueden usarse en los métodos proporcionados en el presente documento incluyen los anticuerpos BD16 y BB18 descritos en el documento US 2006/0233793 A1, además de fragmentos de unión al antígeno, de los mismos; o cualquiera de MAb 301, MAb 1893, MAb 657, MAb 1807, MAb 1656, MAb 1808, MAb 59, MAb 2191, MAb 2274, MAb 2275, MAb 2276, MAb 2277, MAb 2278, MAb 2279, MAb 2280, MAb 2281, MAb 2282, MAb 2283, MAb 2284 y MAb 2285, además de cualquier fragmento, de los mismos, como se describen en el documento US 2008/0219971 A1. En ciertas realizaciones, un anticuerpo anti-SEMA4D para su uso en los métodos proporcionados en el presente documento se une a SEMA4D humana, murina, o tanto humana como murina. También son útiles anticuerpos que se unen al mismo epítipo como cualquiera de los anticuerpos anteriormente mencionados y/o anticuerpos que inhiben competitivamente que cualquiera de los anticuerpos anteriormente mencionados se unan a SEMA4D.

En ciertas realizaciones, un anticuerpo anti-SEMA4D o fragmento de unión al antígeno útil en los métodos proporcionados en el presente documento tiene una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente el 80 %, aproximadamente el 85 %, aproximadamente el 88 %, aproximadamente el 89 %, aproximadamente el 90 %, aproximadamente el 91 %, aproximadamente el 92 %, aproximadamente el 93 %, aproximadamente el 94 %, o aproximadamente el 95 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos para una molécula de anticuerpo anti-SEMA4D de referencia, por ejemplo aquellos descritos anteriormente. En una realización adicional, la molécula de unión comparte al menos aproximadamente el 96 %, aproximadamente el 97 %, aproximadamente el 98 %, aproximadamente el 99 %, o el 100 % de identidad de secuencia con un anticuerpo de referencia.

En otra realización, un anticuerpo anti-SEMA4D o fragmento de unión al antígeno del mismo útil en los métodos proporcionados en el presente documento comprende, consiste esencialmente en, o consiste en un dominio variable de la cadena pesada de inmunoglobulina (dominio VH), donde al menos una de las CDR del dominio VH tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente el 80 %, aproximadamente el 85 %, aproximadamente el 90 %, aproximadamente el 95 %, aproximadamente el 96 %, aproximadamente el 97 %, aproximadamente el 98 %, aproximadamente el 99 %, o idéntica a CDR1, CDR2 o CDR3 de SEQ ID NO: 9 o 10.

En otra realización, un anticuerpo anti-SEMA4D o fragmento de unión al antígeno del mismo útil en los métodos proporcionados en el presente documento comprende, consiste esencialmente en, o consiste en un dominio variable de la cadena pesada de inmunoglobulina (dominio VH), donde al menos una de las CDR del dominio VH tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente el 80 %, aproximadamente el 85 %, aproximadamente el 90 %, aproximadamente el 95 %, aproximadamente el 96 %, aproximadamente el 97 %, aproximadamente el 98 %, aproximadamente el 99 %, o idéntica a SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7 o SEQ ID NO: 8.

En otra realización, un anticuerpo anti-SEMA4D o fragmento de unión al antígeno del mismo útil en los métodos proporcionados en el presente documento comprende, consiste esencialmente en, o consiste en un dominio variable de la cadena pesada de inmunoglobulina (dominio VH), donde al menos una de las CDR del dominio VH tiene una secuencia de aminoácidos idéntica, excepto por 1, 2, 3, 4 o 5 sustituciones de aminoácidos conservativas, a SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7 o SEQ ID NO: 8.

En otra realización, un anticuerpo anti-SEMA4D o fragmento de unión al antígeno del mismo útil en los métodos proporcionados en el presente documento comprende, consiste esencialmente en, o consiste en un dominio VH que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente el 80 %, aproximadamente el 85 %, aproximadamente el 90 %, aproximadamente el 91 %, aproximadamente el 92 %, aproximadamente el 93 %, aproximadamente el 94 %, aproximadamente el 95 %, aproximadamente el 96 %, aproximadamente el 97 %, aproximadamente el 98 %, aproximadamente el 99 % o el 100 % idéntica a SEQ ID NO: 9 o SEQ ID NO: 10, en la que el anticuerpo anti-SEMA4D que comprende el dominio VH codificado se une específicamente, preferencialmente, o competitivamente a SEMA4D.

En otra realización, un anticuerpo anti-SEMA4D o fragmento de unión al antígeno del mismo útil en los métodos proporcionados en el presente documento comprende, consiste esencialmente en, o consiste en un dominio variable de la cadena ligera de inmunoglobulina (dominio VL), donde al menos una de las CDR del dominio VL tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente el 80 %, aproximadamente el 85 %, aproximadamente el 90 %, aproximadamente el 91 %, aproximadamente el 92 %, aproximadamente el 93 %, aproximadamente el 94 %, aproximadamente el 95 %, aproximadamente el 96 %, aproximadamente el 97 %, aproximadamente el 98 %, aproximadamente el 99 %, o el 100 % idéntica a SEQ ID NO: 11 o SEQ ID NO: 12, en la que el anticuerpo anti-SEMA4D que comprende el dominio VL codificado se une específicamente, preferencialmente, o competitivamente a SEMA4D.

aproximadamente el 90 %, aproximadamente el 95 %, aproximadamente el 96 %, aproximadamente el 97 %, aproximadamente el 98 %, aproximadamente el 99 %, o idéntica a CDR1, CDR2 o CDR3 de SEQ ID NO: 17 o 18.

- 5 En otra realización, un anticuerpo anti-SEMA4D o fragmento de unión al antígeno del mismo útil en los métodos proporcionados en el presente documento comprende, consiste esencialmente en, o consiste en un dominio variable de la cadena ligera de inmunoglobulina (dominio VL), donde al menos una de las CDR del dominio VL tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente el 80 %, aproximadamente el 85 %, aproximadamente el 90 %, aproximadamente el 95 %, aproximadamente el 96 %, aproximadamente el 97 %, aproximadamente el 98 %, aproximadamente el 99 %, o idéntica a SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15 o SEQ ID NO: 16.
- 10 En otra realización, un anticuerpo anti-SEMA4D o fragmento de unión al antígeno del mismo útil en los métodos proporcionados en el presente documento comprende, consiste esencialmente en, o consiste en un dominio variable de la cadena ligera de inmunoglobulina (dominio VL), donde al menos una de las CDR del dominio VL tiene una secuencia de aminoácidos idéntica, excepto por 1, 2, 3, 4 o 5 sustituciones de aminoácidos conservativas, a SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, o SEQ ID NO: 16.
- 15 En otra realización, un anticuerpo anti-SEMA4D o fragmento de unión al antígeno del mismo útil en los métodos proporcionados en el presente documento comprende, consiste esencialmente en, o consiste en un dominio VL que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente el 80 %, aproximadamente el 85 %, aproximadamente el 90 %, aproximadamente el 91 %, aproximadamente el 92 %, aproximadamente el 93 %, aproximadamente el 94 %, aproximadamente el 95 %, aproximadamente el 96 %, aproximadamente el 97 %, aproximadamente el 98 %, aproximadamente el 99 %, o el 100 % idéntica a SEQ ID NO: 17 o SEQ ID NO: 18, en la que el anticuerpo anti-SEMA4D que comprende el dominio VL codificado se une específicamente, preferencialmente o competitivamente a SEMA4D.
- 20 En otra realización, un anticuerpo anti-SEMA4D o fragmento de unión al antígeno del mismo útil en los métodos proporcionados en el presente documento comprende, consiste esencialmente en, o consiste en un dominio variable de la cadena pesada de inmunoglobulina (dominio VH) y un dominio variable de la cadena ligera de inmunoglobulina (dominio VL), donde al menos una de las CDR del dominio VH tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente el 80 %, aproximadamente el 85 %, aproximadamente el 90 %, aproximadamente el 95 %, aproximadamente el 96 %, aproximadamente el 97 %, aproximadamente el 98 %, aproximadamente el 99 %, o idéntica a CDR1, CDR2 o CDR3 de SEQ ID NO: 9 o 10 y al menos una de las CDR del dominio VL tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente el 80 %, aproximadamente el 85 %, aproximadamente el 90 %, aproximadamente el 95 %, aproximadamente el 96 %, aproximadamente el 97 %, aproximadamente el 98 %, aproximadamente el 99 %, o idéntica a CDR1, CDR2 o CDR3 de SEQ ID NO: 17 o 18.
- 25 En otra realización, un anticuerpo anti-SEMA4D o fragmento de unión al antígeno del mismo útil en los métodos proporcionados en el presente documento comprende, consiste esencialmente en, o consiste en un dominio variable de la cadena pesada de inmunoglobulina (dominio VH) y un dominio variable de la cadena ligera de inmunoglobulina (dominio VL), donde al menos una de las CDR del dominio VH tiene una secuencia de aminoácidos idéntica, excepto por 1, 2, 3, 4 o 5 sustituciones de aminoácidos conservativas, a SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7 o SEQ ID NO: 8 y donde al menos una de las CDR del dominio VL tiene una secuencia de aminoácidos idéntica, excepto por 1, 2, 3, 4 o 5 sustituciones de aminoácidos conservativas, a SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15 o SEQ ID NO: 16.
- 30 En otra realización, un anticuerpo anti-SEMA4D o fragmento de unión al antígeno del mismo útil en los métodos proporcionados en el presente documento comprende, consiste esencialmente en, o consiste en un dominio VH que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente el 80 %, aproximadamente el 85 %, aproximadamente el 90 %, aproximadamente el 91 %, aproximadamente el 92 %, aproximadamente el 93 %, aproximadamente el 94 %, aproximadamente el 95 %, aproximadamente el 96 %, aproximadamente el 97 %, aproximadamente el 98 %, aproximadamente el 99 % o el 100 % idéntica a SEQ ID NO: 9 o SEQ ID NO: 10, y un dominio VL que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente el 80 %, aproximadamente el 85 %, aproximadamente el 90 %, aproximadamente el 91 %, aproximadamente el 92 %, aproximadamente el 93 %, aproximadamente el 94 %, aproximadamente el 95 %, aproximadamente el 96 %, aproximadamente el 97 %, aproximadamente el 98 %, aproximadamente el 99 % o el 100 % idéntica a SEQ ID NO: 17 o SEQ ID NO: 18, en la que el anticuerpo anti-SEMA4D que comprende los dominios VH y VL codificados se unen específicamente, preferencialmente o competitivamente a SEMA4D.
- 35 En otra realización, un anticuerpo anti-SEMA4D o fragmento de unión al antígeno del mismo útil en los métodos proporcionados en el presente documento comprende, consiste esencialmente en, o consiste en las tres CDR del dominio VL y las tres CDR del dominio VH de MAb VX15/2503, 67, o 76, que se describen completamente en el documento US 2010/0285036 A1. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-SEMA4D útil en los métodos proporcionados en el presente documento comprende el MAb VX15/2503 o 67.
- 40 En otra realización, un anticuerpo anti-SEMA4D o fragmento de unión al antígeno del mismo útil en los métodos proporcionados en el presente documento comprende, consiste esencialmente en, o consiste en las tres CDR del dominio VL y las tres CDR del dominio VH de MAb VX15/2503, 67, o 76, que se describen completamente en el documento US 2010/0285036 A1. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-SEMA4D útil en los métodos proporcionados en el presente documento comprende el MAb VX15/2503 o 67.
- 45 En otra realización, un anticuerpo anti-SEMA4D o fragmento de unión al antígeno del mismo útil en los métodos proporcionados en el presente documento comprende, consiste esencialmente en, o consiste en las tres CDR del dominio VL y las tres CDR del dominio VH de MAb VX15/2503, 67, o 76, que se describen completamente en el documento US 2010/0285036 A1. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-SEMA4D útil en los métodos proporcionados en el presente documento comprende el MAb VX15/2503 o 67.
- 50 En otra realización, un anticuerpo anti-SEMA4D o fragmento de unión al antígeno del mismo útil en los métodos proporcionados en el presente documento comprende, consiste esencialmente en, o consiste en las tres CDR del dominio VL y las tres CDR del dominio VH de MAb VX15/2503, 67, o 76, que se describen completamente en el documento US 2010/0285036 A1. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-SEMA4D útil en los métodos proporcionados en el presente documento comprende el MAb VX15/2503 o 67.
- 55 En otra realización, un anticuerpo anti-SEMA4D o fragmento de unión al antígeno del mismo útil en los métodos proporcionados en el presente documento comprende, consiste esencialmente en, o consiste en las tres CDR del dominio VL y las tres CDR del dominio VH de MAb VX15/2503, 67, o 76, que se describen completamente en el documento US 2010/0285036 A1. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-SEMA4D útil en los métodos proporcionados en el presente documento comprende el MAb VX15/2503 o 67.

Variantes biológicamente activas adecuadas de los anticuerpos anti-SEMA4D útiles en la invención pueden usarse en los métodos de la presente invención. Tales variantes retendrán las propiedades de unión deseadas del

anticuerpo anti-SEMA4D original. Métodos de producción de variantes de anticuerpo están generalmente disponibles en la materia.

Métodos para mutagénesis y alteraciones de secuencias de nucleótidos son muy conocidos en la técnica. Véanse, por ejemplo, Walker y Gaastra, eds. (1983) *Techniques in Molecular Biology* (MacMillan Publishing Company, New York); Kunkel, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:488-492 (1985); Kunkel et al., *Methods Enzymol.* 154:367-382 (1987); Sambrook et al. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor, N.Y.); la patente de EE.UU. N.º 4.873.192. Orientación en cuanto a sustituciones de aminoácidos apropiadas que no afectan la actividad biológica del polipéptido de interés pueden encontrarse en el modelo de Dayhoff et al. (1978) en *Atlas of Protein Sequence and Structure* (Natl. Biomed. Res. Found., Washington, D.C.), pp. 345-352, incorporado en el presente documento por referencia en su totalidad. El modelo de Dayhoff et al. usa la matriz de similitud de aminoácidos de mutación puntual aceptada (PAM) (matriz PAM 250) para determinar sustituciones de aminoácidos conservativas adecuadas. Pueden preferirse sustituciones conservativas, tales como intercambio de un aminoácido con otro que tiene propiedades similares. Ejemplos de sustituciones de aminoácidos conservativas como se enseñan por la matriz PAM 250 del modelo de Dayhoff et al. incluyen, pero no se limitan a, Gly↔Ala, Val↔Ile↔Leu, Asp↔Glu, Lys↔Arg, Asn↔Gln y Phe↔Trp↔Tyr.

En la construcción de variantes de la molécula de unión a anti-SEMA4D, por ejemplo, un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo, polipéptidos de interés, se hacen modificaciones de forma que las variantes continúen poseyendo las propiedades deseadas, por ejemplo, siendo capaces de unirse específicamente a una SEMA4D, por ejemplo, SEMA4D humana, murina, o tanto humana como murina, por ejemplo, expresada sobre la superficie de o secretada por una célula y que tiene actividad de bloqueo de SEMA4D, como se describe en el presente documento. Obviamente, cualquier mutación hecha en el ADN que codifica el polipéptido de variante no debe poner la secuencia fuera del marco de lectura y preferentemente no creará regiones complementarias que pudieran producir estructura de ARNm secundaria. Véase la publicación de solicitud de patente EP N.º 75.444.

Métodos de medición de la especificidad de unión de la molécula de unión anti-SEMA4D, por ejemplo, un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno, variante o derivado del mismo, incluyen, pero no se limitan a, ensayos de unión competitiva estándar, ensayos para monitorizar la secreción de inmunoglobulinas por linfocitos T o linfocitos B, ensayos de proliferación de linfocitos T, ensayos de apoptosis, ensayos de ELISA, y similares. Véanse, por ejemplo, tales ensayos desvelados en el documento WO 93/14125; Shi et al., *Immunity* 13:633-642 (2000); Kumanogoh et al., *J Immunol* 169:1175-1181 (2002); Watanabe et al., *J Immunol* 167:4321-4328 (2001); Wang et al., *Blood* 97:3498-3504 (2001); y Giraudon et al., *J Immunol* 172(2):1246-1255 (2004).

Cuando se trata en el presente documento si cualquier polipéptido particular, que incluye las regiones constantes, CDR, dominios VH, o dominios VL desvelados en el presente documento, es o no al menos aproximadamente el 65 %, aproximadamente el 70 %, aproximadamente el 75 %, aproximadamente el 80 %, aproximadamente el 85 %, aproximadamente el 90 %, aproximadamente el 91 %, aproximadamente el 92 %, aproximadamente el 93 %, aproximadamente el 94 %, aproximadamente el 95 %, aproximadamente el 96 %, aproximadamente el 97 %, aproximadamente el 98 %, aproximadamente el 99 %, o incluso aproximadamente el 100 % idéntico a otro polipéptido, el % de identidad puede determinarse usando métodos y programas informáticos/software conocidos en la técnica tales como, pero no se limitan a, el programa BESTFIT (Wisconsin Sequence Analysis Package, Versión 8 for Unix, Genetics Computer Group, University Research Park, 575 Science Drive, Madison, Wis. 53711). BESTFIT usa el algoritmo de homología local de Smith y Waterman (1981) *Adv. Appl. Math.* 2:482-489, para encontrar el mejor segmento de homología entre dos secuencias. Si se usa BESTFIT o cualquier otro programa de alineamiento de secuencias para determinar si una secuencia particular es o no, por ejemplo, el 95 % idéntica a una secuencia de referencia según la presente invención, los parámetros están establecidos, por supuesto, de forma que el porcentaje de identidad se calcule con respecto a la longitud completa de la secuencia de polipéptidos de referencia y que se dejen huecos en la homología de hasta el 5 % del número total de aminoácidos en la secuencia de referencia.

Para los fines de la presente invención, el porcentaje de identidad de secuencia puede determinarse usando el algoritmo de búsqueda de homología de Smith-Waterman usando una búsqueda de huecos afín con una penalización por abertura de hueco de 12 y una penalización por extensión de hueco de 2, matriz BLOSUM de 62. El algoritmo de búsqueda de homología de Smith-Waterman se enseña en Smith y Waterman (1981) *Adv. Appl. Math.* 2:482-489. Una variante puede, por ejemplo, diferenciarse de un anticuerpo anti-SEMA4D de referencia (por ejemplo, MAb VX15/2503, 67 o 76) por tan solo 1 a 15 restos de aminoácidos, tan solo 1 a 10 restos de aminoácidos, tales como 6-10, tan solo 5, tan solo 4, 3, 2, o incluso 1 resto de aminoácido.

La región constante de un anticuerpo anti-SEMA4D puede ser mutada para alterar la función efectora de varias formas. Por ejemplo, véanse la patente de EE.UU. N.º 6.737.056B1 y la publicación de solicitud de patente de EE.UU. N.º 2004/0132101A1, que desvelan mutaciones de Fc que optimizan la unión del anticuerpo a receptores de Fc.

En ciertos anticuerpos anti-SEMA4D o fragmentos de los mismos útiles en los métodos proporcionados en el presente documento, la porción Fc puede ser mutada para reducir la función efectora usando técnicas conocidas en la técnica. Por ejemplo, la delección o inactivación (mediante mutaciones puntuales u otros medios) de un dominio de la región constante puede reducir la unión al receptor de Fc del anticuerpo modificado circulante aumentando así la

localización tumoral. En otros casos, modificaciones de la región constante de acuerdo con la presente invención moderan la unión del complemento y así reducen la semivida en suero. Pueden usarse aún otras modificaciones de la región constante para modificar los enlaces disulfuro o restos de oligosacárido que permiten la localización potenciada debido a la elevada especificidad por antígenos o flexibilidad del anticuerpo. El perfil fisiológico resultante, la biodisponibilidad y otros efectos bioquímicos de las modificaciones, tales como la localización del tumor, biodistribución y semivida en suero, pueden medirse y cuantificarse fácilmente usando técnicas inmunológicas muy conocidas sin excesiva experimentación. Los anticuerpos anti-SEMA4D para uso en los métodos proporcionados en el presente documento incluyen derivados que se modifican, por ejemplo, por la unión covalente de cualquier tipo de molécula al anticuerpo de forma que la unión covalente no prevenga que el anticuerpo se una específicamente al epítipo relacionado. Por ejemplo, pero no a modo de limitación, los derivados de anticuerpo incluyen anticuerpos que han sido modificados, por ejemplo, por glucosilación, acetilación, pegilación, fosforilación, amidación, derivatización por grupos protectores / de bloqueo conocidos, escisión proteolítica, enlace a un ligando celular u otra proteína, etc. Cualquiera de las numerosas modificaciones químicas puede llevarse a cabo por técnicas conocidas, que incluyen, pero no se limitan a, escisión química específica, acetilación, formilación, etc. Adicionalmente, el derivado puede contener uno o más aminoácidos no clásicos.

Una "sustitución de aminoácidos conservativa" es una en la que el resto de aminoácido se sustituye por un resto de aminoácido que tiene una cadena lateral con una carga similar. Familias de restos de aminoácidos que tienen cadenas laterales con cargas similares se han definido en la materia. Estas familias incluyen aminoácidos con cadenas laterales básicas (por ejemplo, lisina, arginina, histidina), cadenas laterales ácidas (por ejemplo, ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales polares sin carga (por ejemplo, glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína), cadenas laterales no polares (por ejemplo, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano), cadenas laterales beta-ramificadas (por ejemplo, treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (por ejemplo, tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina). Alternativamente, pueden introducirse mutaciones al azar a lo largo de toda o parte de la secuencia codificante, tal como por mutagénesis por saturación, y los mutantes resultantes pueden cribarse para actividad biológica para identificar mutantes que retienen la actividad (por ejemplo, la capacidad de unirse a un polipéptido anti-SEMA4D, de bloquear la interacción de SEMA4D con su receptor, o de reducir la permeabilidad de BBB en un sujeto, por ejemplo, un paciente con un trastorno neuroinflamatorio).

Por ejemplo, es posible introducir mutaciones solo en regiones estructurales o solo en regiones CDR de una molécula de anticuerpo. Las mutaciones introducidas pueden ser mutaciones silenciosas o de aminoácidos neutros, es decir, no tienen, o tienen poco efecto sobre la capacidad de un anticuerpo para unirse al antígeno. Estos tipos de mutaciones pueden ser útiles para optimizar el uso de codones, o mejorar la producción de anticuerpos del hibridoma. Alternativamente, mutaciones de aminoácidos no neutros pueden alterar la capacidad de un anticuerpo para unirse al antígeno. Un experto en la materia sería capaz de diseñar y probar moléculas mutantes con propiedades deseadas tales como sin alteración en la actividad de unión al antígeno o alteración en la actividad de unión (por ejemplo, mejoras en la actividad de unión al antígeno o cambio en la especificidad del anticuerpo). Tras la mutagénesis, la proteína codificada puede expresarse rutinariamente y la actividad funcional y/o biológica de la proteína codificada (por ejemplo, la capacidad para unirse inmunoespecíficamente a al menos un epítipo de un polipéptido SEMA4D) puede determinarse usando técnicas descritas en el presente documento o modificando rutinariamente técnicas conocidas en la técnica.

En ciertas realizaciones, los anticuerpos anti-SEMA4D para su uso en los métodos proporcionados en el presente documento comprenden al menos una región determinante de la complementariedad (CDR) optimizada. Por "CDR optimizada" está previsto que la CDR se haya modificado y optimizado para mejorar la afinidad de unión y/o actividad anti-SEMA4D que es conferida a un anticuerpo anti-SEMA4D que comprende la CDR optimizada. "Actividad anti-SEMA4D" o "actividad de bloqueo de SEMA4D" puede incluir actividad que modula una o más de las siguientes actividades asociadas a SEMA4D: activación, agregación y supervivencia de linfocitos B; proliferación inducida por CD40 y producción de anticuerpos; respuesta de anticuerpos a antígenos dependientes de linfocitos T; proliferación de linfocitos T u otras células inmunitarias; maduración de células dendríticas; desmielinización y degeneración axonal; apoptosis de precursores neurales pluripotentes y/u oligodendrocitos; inducción de migración de células endoteliales; inhibición de la migración espontánea de monocitos; unión a plexina-B1 de la superficie celular u otro receptor; o cualquier otra actividad asociada a SEMA4D soluble o SEMA4D que se expresa sobre la superficie de células SEMA4D+. La actividad anti-SEMA4D también puede atribuirse a una disminución en la incidencia o gravedad de enfermedades asociadas a la expresión o expresión en exceso de SEMA4D, que incluyen, pero no se limitan necesariamente a, enfermedades neuroinflamatorias que incluyen enfermedades inflamatorias del sistema nervioso central (SNC) y sistema nervioso periférico (SNP).

Ejemplos de anticuerpos optimizados basados en los MAbs anti-SEMA4D BD16 y BB18 murinos se describieron en la publicación de EE.UU. N.º 2008/0219971 A1, la solicitud de patente internacional WO 93/14125 y Herold et al., Int. Immunol. 7(1): 1-8 (1995). Las modificaciones pueden implicar la sustitución de restos de aminoácidos dentro de la CDR de forma que un anticuerpo anti-SEMA4D retenga la especificidad por el antígeno SEMA4D y tenga afinidad de unión mejorada y/o actividad anti-SEMA4D mejorada.

V. Métodos de tratamiento que usan anticuerpos anti-SEMA4D y anti-plexinaB1 terapéuticos

Métodos empleados en la invención se refieren al uso de anticuerpos anti-SEMA4D, que incluyen fragmentos de unión al antígeno de los mismos, para reducir la permeabilidad de la barrera hematoencefálica en un sujeto que tiene un trastorno neuroinflamatorio. En ciertas realizaciones, el trastorno neuroinflamatorio es, por ejemplo, esclerosis múltiple, esclerosis lateral amiotrófica, epilepsia, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, meningitis, edema cerebral, traumatismo cerebral o accidente cerebrovascular. En ciertas realizaciones, las células endoteliales expresan un receptor de SEMA4D; y en ciertas realizaciones, el receptor es plexina-B1. Aunque la siguiente discusión se refiere a la administración de un anticuerpo anti-SEMA4D, un anticuerpo anti-plexinaB1, y combinación de los mismos, los métodos descritos en el presente documento también son aplicables a los fragmentos de unión al antígeno de estos anticuerpos anti-SEMA4D o anti-plexinaB1 que retienen las propiedades deseadas de los anticuerpos anti-SEMA4D o anti-plexinaB1, por ejemplo, capaces de unirse específicamente a SEMA4D, por ejemplo, SEMA4D humana, de ratón, o humana y de ratón, que tienen actividad neutralizante de SEMA4D, y/o bloquear la interacción de SEMA-4D con su receptor, por ejemplo, plexina-B1.

En una realización, el tratamiento incluye la aplicación o administración de un anticuerpo anti-SEMA4D o fragmento de unión al antígeno del mismo como se describe en el presente documento a un paciente, donde el paciente tiene, o tiene el riesgo de desarrollar un trastorno neuroinflamatorio. En otra realización, el tratamiento también pretende incluir la aplicación o administración de una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo anti-SEMA4D o fragmento de unión al antígeno del mismo a un paciente, donde el paciente tiene, o tiene el riesgo de desarrollar un trastorno neuroinflamatorio. Debe apreciarse que debido a la interacción de SEMA4D con un receptor en células endoteliales, se espera que la aplicación o administración de una molécula de unión anti-SEMA4D, una molécula de unión anti-plexinaB1, o combinación de las mismas, se produzca sobre el lado de la sangre de la barrera hematoencefálica. Por la administración de una molécula de unión anti-SEMA4D, una molécula de unión anti-plexinaB1, o combinaciones de las mismas, por una vía que la expone al lado de la sangre, por ejemplo, que incluye, pero no se limita a, administración intravenosa, se permitirá que la molécula de unión anti-SEMA4D, las moléculas de unión anti-plexinaB1, o combinaciones de las mismas, inhiban la interacción de SEMA4D con el receptor de SEMA4D que es expresado por las células endoteliales.

Las moléculas de unión anti-SEMA4D, moléculas de unión anti-plexinaB1, o combinación de las mismas, por ejemplo, anticuerpos o fragmentos de unión de los mismos como se describen en el presente documento, son útiles para el tratamiento de diversos trastornos neuroinflamatorios. En algunas realizaciones, el tratamiento de un trastorno neuroinflamatorio pretende incluir una reducción, o disminución, en la permeabilidad de la BBB. En otras realizaciones, el tratamiento de un trastorno neuroinflamatorio pretende incluir un aumento en la resistividad de la BBB. En otras realizaciones, el tratamiento de un trastorno neuroinflamatorio pretende incluir un aumento en el número, densidad y/o concentración de células endoteliales presentes en la BBB. En otras realizaciones, el tratamiento de un trastorno neuroinflamatorio pretende incluir un cambio en la morfología o función o células endoteliales, o en las interacciones entre células endoteliales o astrocitos o entre células endoteliales y astrocitos que forman la BBB.

En una realización, la invención se basa en el uso de anticuerpos anti-SEMA4D o fragmentos de unión al antígeno, de los mismos, como un medicamento, en particular para su uso en el tratamiento o la profilaxis de trastornos neuroinflamatorios para inhibir, reducir, prevenir o minimizar una rotura en la BBB, o un aumento en la permeabilidad de la BBB.

Según los métodos desvelados en el presente documento, puede usarse al menos una molécula de unión anti-SEMA4D o molécula de unión anti-plexinaB1, por ejemplo, un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno, variante, o derivado del mismo, como se define en cualquier parte en el presente documento, para promover una respuesta terapéutica positiva con respecto al trastorno neuroinflamatorio. Una "respuesta terapéutica positiva" con respecto al trastorno neuroinflamatorio pretende incluir una mejora en la enfermedad en asociación con la actividad antiinflamatoria, actividad antiapoptótica, o similares, de estos anticuerpos, y/o una mejora en los síntomas asociados a la enfermedad. Es decir, puede observarse un efecto antiproliferativo, la prevención de proliferación adicional de la célula que expresa SEMA4D, una reducción en la respuesta inflamatoria que incluye, pero no se limita a, secreción reducida de citocinas inflamatorias, moléculas de adhesión, proteasas, inmunoglobulinas (en casos donde la célula que lleva SEMA4D es un linfocito B), combinaciones de los mismos, y similares, elevada producción de proteínas antiinflamatorias, una reducción en el número de células autorreactivas, un aumento en la tolerancia inmunitaria, inhibición de la supervivencia celular autorreactiva, reducción en la apoptosis, reducción en la migración de células endoteliales, aumento en la migración espontánea de monocitos, reducción en y/o una disminución en uno o más síntomas mediados por la estimulación de células de que expresan SEMA4Ds o SEMA4D. Tales respuestas terapéuticas positivas no se limitan a la vía de administración y pueden comprender la administración al donante, el tejido de donante (tal como, por ejemplo, perfusión de órgano), el hospedador, cualquier combinación de los mismos, y similares. En particular, los métodos en el presente documento se proporcionan dirigidos a inhibir, prevenir, reducir, aliviar o disminuir el desarrollo de un trastorno neuroinflamatorio en un paciente. Así, por ejemplo, una mejora en la enfermedad puede caracterizarse como una ausencia de síntomas clínicamente observables, una disminución en la permeabilidad de BBB, un aumento en el número, densidad o concentración de células endoteliales presentes en la BBB, un cambio en la morfología o función de las células

endoteliales, o un cambio en las interacciones entre células endoteliales y pericitos o astrocitos o entre células endoteliales, pericitos y astrocitos que forman la BBB.

Los cambios en la permeabilidad de la BBB pueden medirse usando modelos *in vitro*. En ciertas realizaciones, puede emplearse un modelo de DIV-BBB *in vitro* dinámico. Cucullo et al. han presentado un modelo de DIV-BBB compuesto de células endoteliales microvasculares de cerebro humano adulto normal y astrocitos adultos humanos para estudiar cómo los cambios hemodinámicos y la inflamación sistémica afectan la integridad de la microvasculatura del cerebro. Específicamente, este modelo usa un cartucho, o tubo hueco, para representar la barrera hematoencefálica representando el interior del cartucho el lado de la sangre de la barrera hematoencefálica y representando el exterior del cartucho el lado del cerebro de la barrera hematoencefálica. El interior del cartucho se reviste de células endoteliales microvasculares de cerebro humano adulto y el exterior se reviste con astrocitos adultos humanos. A medida que un agente modificador de la barrera hematoencefálica, tal como SEMA4D, se introduce en la luz del cartucho, se monitoriza la corriente eléctrica entre el interior y el exterior del tubo usando medición de resistencia eléctrica transendotelial, descrita a continuación. Una realización de este modelo tiene la novedad de que tiene micro-orificios transcapilares para permitir el tráfico de células transendoteliales entre el compartimento vascular y el parenquimal. Una descripción en profundidad del modelo de DIV-BBB *in vitro* y la derivación y cultivo de las células endoteliales microvasculares humanas y astrocitos adultos empleados puede encontrarse en, por ejemplo, Cucullo et al., Brain Research. 951 243-254 (2002); y Cucullo et al., Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism. 2:767-77 (2011). Debe apreciarse que los expertos en la materia reconocerán que se han descrito otros modelos de BBB y se emplearon útilmente para estudios de la función de BBB en enfermedad en el estado de la técnica y que la presente divulgación no debe limitarse a un modelo particular cualquiera.

La permeabilidad de la BBB puede monitorizarse usando medición de la resistencia eléctrica transendotelial (TEER). Se usa TEER para monitorizar la integridad de la BBB en tiempo real, que se ha mostrado que se correlaciona con la permeabilidad de la BBB. El sistema de TEER usa multiplexado electrónico para medir múltiples cartuchos en rápida sucesión y evalúa la integridad y viabilidad de bicapas de cultivo de tejido rápidamente y de forma fiable (Cucullo et al., 2002; Cucullo et al., 2010; Santaguida et al., 2006). En operación, el sistema aplica un voltaje de excitación (0,06 V) a través de los electrodos de excitación insertados en cada cartucho en los compartimentos luminal y extraluminal. Un microcontrolador calcula la resistividad y capacitancia (por cm^2) de la barrera a partir de parámetros físicos. Los valores de capacitancia se calculan por comparación de las formas de onda de voltaje y corriente. El retraso de pico a pico de las dos formas de onda es proporcional al valor de capacitancia, que se expresa como la tensión de arco. La TEER puede medirse desde la configuración inicial durante todo el transcurso de cada experimento.

Las moléculas de unión anti-SEMA4D, moléculas de unión anti-plexinaB1, o combinación de las mismas, por ejemplo, anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno, variantes, o derivados de los mismos, pueden usarse en combinación con al menos uno o varios de otros tratamientos para trastornos neuroinflamatorios; donde la terapia adicional se administra antes de, durante, o posterior a la molécula de unión anti-SEMA4D, moléculas de unión anti-plexinaB1, o combinación de las mismas, por ejemplo, anticuerpo o fragmento de unión al antígeno, variante, o derivado del mismo, terapia. Así, donde las terapias combinadas comprenden la administración de una molécula de unión anti-SEMA4D, moléculas de unión anti-plexinaB1, o combinación de las mismas, por ejemplo, un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno, variante, o derivado del mismo, en combinación con la administración de otro agente terapéutico, los métodos usados en la invención engloban la coadministración, usando formulaciones separadas o una única formulación farmacéutica, con administración simultánea o consecutiva en cualquier orden.

VI. Composiciones farmacéuticas y métodos de administración

Métodos de preparación y administración de moléculas de unión anti-SEMA4D, moléculas de unión anti-plexinaB1, o combinación de las mismas, por ejemplo, anticuerpos, o fragmentos de unión al antígeno, variantes, o derivados de los mismos a un sujeto en necesidad de los mismos son muy conocidos o son fácilmente determinados por aquellos expertos en la materia. La vía de administración de la molécula de unión anti-SEMA4D, la molécula de unión anti-plexinaB1, o combinación de los mismos, por ejemplo, anticuerpo o fragmento de unión al antígeno, variante, o derivado del mismo, puede ser, por ejemplo, oral, parenteral, por inhalación o tópica. El término parenteral, como se usa en el presente documento incluye, por ejemplo, administración intravenosa, intrarterial, intraperitoneal, intramuscular, subcutánea, rectal o vaginal. Aunque todas estas formas de administración son claramente contempladas como que están dentro del alcance de la invención, un ejemplo de una forma para administración sería una disolución para inyección, en particular para inyección intravenosa o intrarterial o goteo. Una composición farmacéutica adecuada para inyección puede comprender un tampón (por ejemplo, tampón acetato, fosfato o citrato), un tensioactivo (por ejemplo, polisorbato), opcionalmente un agente estabilizador (por ejemplo, albúmina humana), etc. Sin embargo, en otros métodos compatibles con las enseñanzas en el presente documento, pueden administrarse moléculas de unión anti-SEMA4D, moléculas de unión anti-plexinaB1, o combinación de las mismas, por ejemplo, anticuerpos, o fragmentos de unión al antígeno, variantes, o derivados de los mismos, directamente al sitio de la población celular adversa, aumentando así la exposición del tejido enfermo al agente terapéutico.

Como se trata en el presente documento, moléculas de unión anti-SEMA4D, moléculas de unión anti-plexinaB1, o combinación de las mismas, por ejemplo, anticuerpos, o fragmentos de unión al antígeno, variantes, o derivados de los mismos, pueden administrarse en una cantidad farmacéuticamente eficaz para el tratamiento *in vivo* de

trastornos neuroinflamatorios. A este respecto, se apreciará que las moléculas de unión desveladas pueden formularse para facilitar la administración y promover la estabilidad del agente activo. En ciertas realizaciones, las composiciones farmacéuticas según la presente invención comprenden un vehículo estéril farmacéuticamente aceptable no tóxico tal como solución salina fisiológica, tampones no tóxicos, conservantes y similares. Para los fines de la presente solicitud, debe mantenerse una cantidad farmacéuticamente eficaz de una molécula de unión anti-SEMA4D, una molécula de unión anti-plexinaB1, o combinación de las mismas, por ejemplo, un anticuerpo, o fragmento de unión al antígeno, variante, o derivado del mismo, que significa una cantidad suficiente para lograr la unión eficaz a una diana y para lograr un beneficio, por ejemplo, reducir la permeabilidad de la BBB en un paciente con un trastorno neuroinflamatorio.

Las composiciones farmacéuticas usadas en la presente invención comprenden vehículos farmacéuticamente aceptables que incluyen, por ejemplo, intercambiadores iónicos, alúmina, estearato de aluminio, lecitina, proteínas del suero, tales como albúmina de suero humano, sustancias tampón tales como fosfatos, glicina, ácido sórbico, sorbato de potasio, mezclas de glicéridos parciales de ácidos grasos vegetales saturados, agua, sales o electrolitos, tales como sulfato de protamina, hidrogenofosfato de disodio, hidrogenofosfato de potasio, cloruro sódico, sales de cinc, sílice coloidal, trisilicato de magnesio, polivinilpirrolidona, sustancias basadas en celulosa, polietilenglicol, carboximetilcelulosa de sodio, poliacrilatos, ceras, polímeros de bloque de polietileno-polioxipropileno, polietilenglicol y lanolina.

Preparaciones para administración parenteral incluyen disoluciones, suspensiones y emulsiones estériles acuosas o no acuosas. Ejemplos de disolventes no acuosos son propilenglicol, polietilenglicol, aceites vegetales tales como aceite de oliva, y ésteres orgánicos inyectables tales como oleato de etilo. Vehículos acuosos incluyen, por ejemplo, agua, disoluciones alcohólicas/acuosas, emulsiones o suspensiones, que incluyen solución salina y medios tamponados. En la invención objeto, vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen, pero no se limitan a, tampón fosfato 0,01-0,1 M y preferentemente 0,05 M o 0,8 % de solución salina. Otros vehículos parenterales comunes incluyen disoluciones de fosfato de sodio, dextrosa de Ringer, dextrosa y cloruro sódico, Ringer con lactato, o aceites no volátiles. Vehículos intravenosos incluyen reforzadores de fluidos y de nutrientes, reforzadores de electrolitos, tales como aquellos basados en dextrosa de Ringer, y similares. También pueden estar presentes conservantes y otros aditivos tales como, por ejemplo, antimicrobianos, antioxidantes, agentes quelantes y gases inertes, y similares.

Más particularmente, composiciones farmacéuticas adecuadas para uso inyectable incluyen disoluciones o dispersiones acuosas estériles (donde son solubles en agua) y polvos estériles para la preparación extemporánea de disoluciones o dispersiones inyectables estériles. En tales casos, la composición debe ser estéril y debe ser fluida hasta el punto de que exista fácil inyectabilidad. Debe ser estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento y preferentemente se preservará contra la acción contaminante de microorganismos, tales como bacterias y hongos. El vehículo puede ser un disolvente o medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido, y similares), y mezclas adecuadas de los mismos. La fluidez apropiada puede mantenerse, por ejemplo, usando un recubrimiento tal como lecitina, por el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersión y usando tensioactivos. Formulaciones adecuadas para su uso en los métodos terapéuticos desvelados en el presente documento se describen en Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Publishing Co.) 16ª ed. (1980).

La prevención de la acción de microorganismos pueden lograrse por diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido ascórbico, timerosal y similares. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes, tales como manitol, sorbitol, o cloruro sódico en la composición. Puede provocarse la absorción prolongada de las composiciones inyectables incluyendo en la composición un agente que retrasa la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

En cualquier caso, pueden prepararse disoluciones inyectables estériles incorporando un compuesto activo (por ejemplo, un anticuerpo anti-SEMA4D, o fragmento de unión al antígeno, variante, o derivado del mismo, por sí mismo o en combinación con otros agentes activos) en la cantidad requerida en un disolvente apropiado con uno o una combinación de componentes enumerados en el presente documento, según se requiera, seguido de esterilización por filtración. Generalmente, se preparan dispersiones incorporando el compuesto activo en un vehículo estéril, que contiene un medio de dispersión básico y los otros componentes requeridos de aquellos enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de disoluciones inyectables estériles, los métodos preferidos de preparación son secado a vacío y liofilización, que da un polvo de un principio activo más cualquier componente deseado adicional a partir de una disolución previamente esterilizada por filtración del mismo. Las preparaciones para inyecciones se procesan, envasan en recipientes tales como ampollas, bolsas, botellas, jeringas o viales, y se sellan bajo condiciones asépticas según métodos conocidos en la técnica. Además, las preparaciones pueden envasarse y comercializarse en forma de un kit. Tales artículos de fabricación pueden tener etiquetas o prospectos que indican que las composiciones asociadas son útiles para tratar un sujeto que padece, o predispuesto a una enfermedad o trastorno.

Las formulaciones parenterales pueden ser una dosis en bolo única, una infusión o una dosis de bolo de carga seguida de una dosis de mantenimiento. Estas composiciones pueden administrarse a intervalos fijos o variables específicos, por ejemplo, una vez al día, o en una base "según se necesite".

Ciertas composiciones farmacéuticas usadas en la presente invención pueden administrarse por vía oral en una forma de dosificación aceptable que incluye, por ejemplo, cápsulas, comprimidos, suspensiones o disoluciones acuosas. Ciertas composiciones farmacéuticas también pueden administrarse por aerosol nasal o inhalación. Tales composiciones pueden prepararse como disoluciones en solución salina, empleando alcohol bencílico u otros conservantes adecuados, promotores de la absorción para potenciar la biodisponibilidad, y/u otros agentes solubilizantes o dispersantes convencionales.

La cantidad de una molécula de unión anti-SEMA4D, una molécula de unión anti-plexinaB1, o combinación de las mismas, por ejemplo, anticuerpo, o fragmento, variante, o derivado del mismo, que va a combinarse con los materiales de vehículo para producir una forma de dosificación única variará dependiendo del hospedador tratado y el modo de administración particular. La composición puede administrarse como una dosis única, dosis múltiple o durante un periodo de tiempo establecido en una infusión. Los regímenes de dosificación también pueden ajustarse para proporcionar la respuesta deseada óptima (por ejemplo, una respuesta terapéutica o profiláctica).

De acuerdo con el alcance de la presente divulgación, pueden administrarse anticuerpos anti-SEMA4D, o fragmentos de unión al antígeno, de los mismos, a un ser humano u otro animal según los métodos anteriormente mencionados de tratamiento en una cantidad suficiente para producir un efecto terapéutico. Los anticuerpos anti-SEMA4D, o fragmentos de unión al antígeno, de los mismos, pueden administrarse a tal ser humano u otro animal en una forma de dosificación convencional preparada combinando el anticuerpo de la invención con un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable convencional según técnicas conocidas. Se reconocerá por un experto en la materia que la forma y carácter del vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable está impuesto por la cantidad de principio activo con la que va a combinarse, la vía de administración y otras variables muy conocidas. Aquellos expertos en la materia apreciarán además que puede usarse una mezcla que comprende una o más especies de moléculas de unión anti-SEMA4D, moléculas de unión anti-plexina B1, o combinaciones de las mismas, por ejemplo, anticuerpos, o fragmentos de unión al antígeno, variantes, o derivados de los mismos, de la invención.

Por "dosis o cantidad terapéuticamente eficaz" o "cantidad eficaz" está prevista una cantidad de molécula de unión anti-SEMA4D, molécula de unión anti-plexinaB1, o combinación de las mismas, por ejemplo, anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo, que cuando se administra provoca una respuesta terapéutica positiva con respecto al tratamiento de un paciente con una enfermedad que va a tratarse, por ejemplo, una disminución en la permeabilidad de la BBB, un aumento en la resistividad de la BBB, un aumento en el número, densidad o concentración de células endoteliales presentes en la BBB, un cambio en la morfología o función en las células endoteliales, o un cambio en las interacciones entre células endoteliales o astrocitos o entre células endoteliales y astrocitos que forman la BBB.

Dosis terapéuticamente eficaces de las composiciones para la disminución en la permeabilidad de BBB varían dependiendo de muchos factores diferentes, que incluyen medios de administración, sitio diana, estado fisiológico del paciente, si el paciente es humano o un animal, otras medicaciones administradas, y si tratamiento es profiláctico o terapéutico. En ciertas realizaciones, el paciente es un ser humano, pero también pueden tratarse mamíferos no humanos que incluyen mamíferos transgénicos. Pueden valorarse dosificaciones de tratamiento usando métodos rutinarios conocidos para aquellos expertos en la materia para optimizar la seguridad y eficacia.

La cantidad de al menos una molécula de unión anti-SEMA4D, molécula de unión anti-plexinaB1, o combinación de las mismas, por ejemplo, anticuerpo o fragmento de unión, variante, o derivado del mismo, que va a administrarse es fácilmente determinada por un experto habitual en la materia sin excesiva experimentación dada la divulgación de la presente invención. Factores que influyen en el modo de administración y la cantidad respectiva de al menos una molécula de unión anti-SEMA4D, molécula de unión anti-plexinaB1, o combinación de las mismas, por ejemplo, anticuerpo, fragmento de unión al antígeno, variante o derivado del mismo, incluyen, pero no se limitan a, la gravedad de la enfermedad, la historia de la enfermedad, y la edad, altura, peso, salud y estado físico del individuo que recibe la terapia. Similarmente, la cantidad de molécula de unión anti-SEMA4D, molécula de unión anti-plexinaB1, o combinación de las mismas, por ejemplo, anticuerpo, o fragmento, variante, o derivado del mismo, que va a administrarse dependerá del modo de administración y si el sujeto recibirá una dosis única o dosis múltiples de este agente.

La invención también permite el uso de una molécula de unión anti-SEMA4D, una molécula de unión anti-plexinaB1, o combinación de las mismas, por ejemplo, anticuerpo de la invención, o fragmento de unión al antígeno, variante, o derivado del mismo, en la fabricación de un medicamento para tratar un sujeto para tratar un trastorno neuroinflamatorio, en la que el medicamento se usa en un sujeto que ha sido pretratado con al menos otra terapia. Por "pretratado" o "pretratamiento" se pretende que el sujeto haya recibido una o varias de otras terapias (por ejemplo, ha sido tratado con al menos otra terapia neuroinflamatoria) antes de recibir el medicamento que comprende la molécula de unión anti-SEMA4D, una molécula de unión anti-plexinaB1, o combinación de las mismas, por ejemplo, anticuerpo o fragmento de unión al antígeno, variante, o derivado del mismo. "Pretratado" o "pretratamiento" incluye sujetos que han sido tratados con al menos otra terapia en el plazo de 2 años, en el plazo de 18 meses, en el plazo de 1 año, en el plazo de 6 meses, en el plazo de 2 meses, en el plazo de 6 semanas, en el plazo de 1 mes, en el plazo de 4 semanas, en el plazo de 3 semanas, en el plazo de 2 semanas, en el plazo de 1 semana, en el plazo de 6 días, en el plazo de 5 días, en el plazo de 4 días, en el plazo de 3 días, en el plazo de 2 días, o incluso en el plazo de 1 día antes del inicio del tratamiento con el medicamento que comprende la molécula

de unión anti-SEMA4D, por ejemplo, el anticuerpo monoclonal VX15/2503 desvelado en el presente documento, o fragmento de unión al antígeno, variante, o derivado del mismo. No es necesario que el sujeto sea un respondedor al pretratamiento con la terapia o terapias previas. Así, el sujeto que recibe el medicamento que comprende la molécula de unión anti-SEMA4D, una molécula de unión anti-plexinaB1, o combinación de las mismas, por ejemplo, un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno, variante, o derivado del mismo, podría haber respondido, o podría haber dejado de responder al pretratamiento con la terapia previa, o a una o más de las terapias previas donde el pretratamiento comprendió terapias múltiples.

La práctica de la presente invención empleará, a menos que se indique lo contrario, técnicas convencionales de biología celular, cultivo celular, biología molecular, biología transgénica, microbiología, ADN recombinante e inmunología, que están dentro de la experiencia de la materia. Tales técnicas se explican completamente en la bibliografía. Véase, por ejemplo, Sambrook et al., ed. (1989) *Molecular Cloning A Laboratory Manual* (2ª ed.; Cold Spring Harbor Laboratory Press); Sambrook et al., ed. (1992) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, (Cold Springs Harbor Laboratory, NY); D. N. Glover ed., (1985) *DNA Cloning*, Volúmenes I y II; Gait, ed. (1984) *Oligonucleotide Synthesis*; Mullis et al., patente de EE.UU. N.º 4.683.195; Hames and Higgins, eds. (1984) *Nucleic Acid Hybridization*; Hames and Higgins, eds. (1984) *Transcription And Translation*; Freshney (1987) *Culture Of Animal Cells* (Alan R. Liss, Inc.); *Immobilized Cells And Enzymes* (IRL Press) (1986); Perbal (1984) *A Practical Guide To Molecular Cloning*; el tratado *Methods In Enzymology* (Academic Press, Inc., N.Y.); Miller and Calos eds. (1987) *Gene Transfer Vectors For Mammalian Cells*, (Cold Spring Harbor Laboratory); Wu et al., eds., *Methods In Enzymology*, Vols. 154 and 155; Mayer and Walker, eds. (1987) *Immunochemical Methods In Cell And Molecular Biology* (Academic Press, London); Weir and Blackwell, eds., (1986) *Handbook Of Experimental Immunology*, Volumes I-IV; *Manipulating the Mouse Embryo*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., (1986); y en Ausubel et al. (1989) *Current Protocols in Molecular Biology* (John Wiley and Sons, Baltimore, Md.).

Principios generales de la manipulación de anticuerpos se exponen en Borrebaeck, ed. (1995) *Antibody Engineering* (2nd ed.; Oxford Univ. Press). Principios generales de la manipulación de proteínas se exponen en Rickwood et al., eds. (1995) *Protein Engineering, A Practical Approach* (IRL Press at Oxford Univ. Press, Oxford, Eng.). Principios generales de anticuerpos y unión de anticuerpo-hapteno se exponen en: Nisonoff (1984) *Molecular Immunology* (2ª ed.; Sinauer Associates, Sunderland, Mass.); y Steward (1984) *Antibodies, Their Structure and Function* (Chapman and Hall, New York, N.Y.). Adicionalmente, métodos estándar en inmunología conocidos en la técnica y no descritos específicamente son generalmente seguidos como en *Current Protocols in Immunology*, John Wiley & Sons, New York; Stites et al., eds. (1994) *Basic and Clinical Immunology* (8ª ed; Appleton & Lange, Norwalk, Conn.) y Mishell and Shiigi (eds) (1980) *Selected Methods in Cellular Immunology* (W.H. Freeman and Co., NY).

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

Los siguientes ejemplos se ofrecen a modo de ilustración y no a modo de limitación.

EJEMPLOS

Los siguientes ejemplos demuestran la eficacia del anticuerpo anti-SEMA4D (VX15/2503) en reducir o prevenir la rotura de la BBB, es decir, una disminución en la permeabilidad de la BBB, en un modelo de DIV-BBB *in vitro* además de en un modelo de EAE *in vivo*. Un experimento de modelo de la enfermedad de Alzheimer *in vivo* también se desvela en el presente documento. Una descripción en profundidad sobre el modelo de DIV-BBB *in vitro* puede encontrarse en, por ejemplo, Cucullo et al., *Brain Research*. 951 243-254 (2002); y Cucullo et al., *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*. 1-11 (2010). Los modelos de EAE y enfermedad de Alzheimer *in vivo* se desvelan, por ejemplo, en Miller et al., *Curr Protoc Immunol*. CAPÍTULO: Unidad-15,1, 2007; Colton et al., *J Alzheimers Dis* 15:571-587, 2008 y Wilcock et al., *J. Neuroscience*, 29:7957-7965, 2009, respectivamente.

Ejemplo 1: Prueba de la capacidad de una molécula de unión anti-SEMA4D, por ejemplo, un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno, variante, o derivado del mismo, por ejemplo, VX15/2503, para restaurar la integridad de la BBB tras la rotura de la BBB inducida por SEMA4D en un modelo de DIV-BBB *in vitro*

Diseño experimental. Se realizó un modelo de BBB *in vitro* dinámico ("DIV-BBB") para estudiar el efecto de SEMA4D humana recombinante (huSEMA4D-his) y VX15/2503 (descrito en detalle en el documento US 2010/0285036 A1, incorporado en el presente documento por referencia en su totalidad) sobre la integridad de la BBB. Se probaron dos cartuchos de DIV-BBB en el modelo. El diseño experimental básico se muestra en la FIG. 1. Se añadieron

concentraciones crecientes de SEMA4D recombinante (SEMA4Dr) en la luz a intervalos de 12 horas, permitiendo el equilibrio (aproximadamente 12 horas/concentración). SEMA4Dr se añadió inicialmente en la luz a una concentración de 0,05 µg/ml en el tiempo 0. La concentración de SEMA4Dr aumentó 10 veces en cada intervalo, por ejemplo, 0,5 µg/ml a 12 horas, 5,0 µg/ml a 24 horas y 50,0 µg/ml a 36 horas. Las mediciones de TEER se tomaron entre cada intervalo como una reflexión de los cambios en la permeabilidad de la BBB a concentraciones variables de SEMA4Dr. Tras la adición de la dosis final de SEMA4Dr a 50,0 µg/ml a las 36 horas, se añadió VX15/2503 en la luz a una concentración de 250 µg/ml a las 48 horas. A las 72 horas, 24 horas después de la adición de VX15/2503, se midió otra vez la permeabilidad de la BBB.

Se usó medición de la resistencia eléctrica transendotelial (TEER) para monitorizar la integridad de la BBB en tiempo real. Como se ha mencionado anteriormente, el sistema de TEER usa multiplexado electrónico para medir múltiples cartuchos en sucesión rápida y evalúa la integridad y viabilidad de bicapas de cultivo de tejido rápidamente y de forma fiable (Cucullo et al., 2002; Santaguida et al., 2006). En este modelo *in vitro* dinámico, los cartuchos, o tubos huecos, se configuraron para representar la barrera hematoencefálica representando el interior del cartucho el lado de la sangre de la barrera hematoencefálica y representando el exterior del cartucho el lado del cerebro de la barrera hematoencefálica. El interior del cartucho se revistió con células endoteliales microvasculares de cerebro humano adulto y el exterior se revistió con astrocitos adultos humanos. A medida que un agente modificador de la barrera hematoencefálica, tal como SEMA4D, se introdujo en la luz del cartucho, se monitorizó la corriente eléctrica entre el interior y exterior del tubo usando TEER. En operación, el sistema de TEER aplica un voltaje de excitación (0,06 V) a través de los electrodos de excitación insertados en cada cartucho en los compartimentos lumenales y extraluminales. Un microcontrolador calcula la resistividad y capacitancia (por cm²) de la barrera a partir de parámetros físicos. Los valores de capacitancia se calculan por comparación de las formas de onda de voltaje y corriente. El retraso de pico a pico de las dos formas de onda es proporcional al valor de capacitancia, que se expresa como la tensión de arco. La TEER se midió desde la configuración inicial durante todo el transcurso de cada uno experimento.

Aumento inducido por SEMA4Dr en la permeabilidad de la BBB. Tras la formación de la BBB, se midió el efecto de SEMA4Dr sobre la integridad de la BBB añadiendo concentraciones crecientes de SEMA4D recombinante (SEMA4Dr) en la luz de los dos cartuchos. Se añadió inicialmente SEMA4Dr en la luz a una concentración de 0,05 µg/ml a tiempo 0. La concentración de SEMA4Dr se aumentó 10 veces cada intervalo de 12 horas, por ejemplo, 0,5 µg/ml a las 12 horas, 5 µg/ml a las 24 horas y 50,0 µg/ml a las 36 horas. Se tomaron mediciones de TEER entre y durante cada intervalo como una reflexión de los cambios en la permeabilidad de la BBB a concentraciones variables de SEMA4Dr. En general, la permeabilidad de la BBB siguió siendo relativamente estable a 0,05 µg/ml de SEMA4Dr. A partir de 0,5 µg/ml, concentraciones crecientes de SEMA4Dr (es decir, 0,5 µg/ml, 5 µg/ml y 50 µg/ml) produjeron medición de TEER reducida, que refleja la elevada permeabilidad de la capa de células endoteliales. Estos resultados se muestran en la FIG. 2.

Disminución inducida por anticuerpos en la permeabilidad de BBB tratada con SEMA4Dr. Para medir el efecto de un anticuerpo anti-SEMA4D sobre la BBB tras la exposición a dosificación creciente de SEMA4Dr, se añadió VX15/2503 a una concentración de 250 µg/ml a 48 horas. Se tomaron mediciones de TEER a las 72 horas. El tratamiento con VX15/2503 produjo una disminución global en la permeabilidad (o aumento en la resistividad) de la BBB en los dos cartuchos. Esta disminución en la permeabilidad refleja la restauración de la BBB. Los resultados se muestran en la FIG. 2.

Ejemplo 2: Prueba de la capacidad de una molécula de unión anti-SEMA4D, por ejemplo, un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno, variante, o derivado del mismo, por ejemplo, VX15/2503, para restaurar la integridad de la BBB tras la rotura de la BBB inducida por SEMA4D en un modelo de DIV-BBB *in vitro*

Diseño experimental. Se realizó un segundo experimento empleando el modelo de DIV-BBB *in vitro* para estudiar el efecto de SEMA4D y VX15/2503 sobre la integridad de la BBB. El diseño experimental básico fue similar al mostrado en el Ejemplo 1, y la FIG. 1, anteriormente. Durante dos semanas, los cartuchos de DIV-BBB se sometieron a la formación de BBB en compartimentos de células endoteliales y astrocíticas. La formación de la BBB como se refleja en TEER se muestra en las FIG. 3 y 4.

Aumento inducido por SEMA4Dr en la permeabilidad de la BBB. Tras la formación de la BBB, se midió el efecto de SEMA4Dr sobre la integridad de la BBB añadiendo concentraciones crecientes de SEMA4D recombinante (SEMA4Dr) en la luz del primer cartucho de un conjunto de tres cartuchos a intervalos de 12 horas, permitiendo el equilibrio (aproximadamente 12 horas/concentración). Se añadió inicialmente SEMA4Dr en la luz a una concentración de 0,5 µg/ml a tiempo 0. La concentración de SEMA4Dr se aumentó 10 veces cada intervalo, por ejemplo, 5 µg/ml a las 12 horas y 50,0 µg/ml a las 24 horas. Se tomaron mediciones de TEER entre cada intervalo como una reflexión de cambios en la permeabilidad de la BBB a concentraciones variables de SEMA4Dr. En general, concentraciones crecientes de SEMA4Dr produjeron medición de TEER reducida, que refleja la elevada permeabilidad de la BBB. Estos resultados se muestran en la FIG. 3.

Para probar la integridad de la BBB en presencia de un antígeno que no elige como diana la capa de células endoteliales, se añadió un control de proteína recombinante similarmente preparada (CTRL, proteína C35) a concentraciones equimolares a los mismos intervalos de 12 horas (es decir, 0,25 µg/ml en el tiempo 0, 2,5 µg/ml a

12 horas y 25,0 µg/ml a 24 horas) a dos cartuchos de control adicionales. A diferencia del efecto de SEMA4Dr, la proteína CTRL no indujo un cambio significativo en TEER, reflejando cambio no significativo en la permeabilidad de la BBB. Si, sin embargo, se añadieron 50,0 µg/ml de SEMA4Dr 12 horas después de la adición de la concentración más alta de la proteína CTRL, se indujo una rápida disminución en TEER similar a la observada con dosis crecientes de SEMA4Dr. Los resultados se muestran en la FIG. 4.

Disminución inducida por anticuerpos en la permeabilidad de la BBB tratada con SEMA4Dr. Tras la adición de la dosis final de SEMA4Dr a 50,0 µg/ml a las 24 horas, se midió el efecto de VX15/2503 sobre TEER y la permeabilidad de la BBB. En la FIG. 3, se añadió el anticuerpo VX15/2503 a una concentración de 250 µg/ml a las 36 horas a dos de los tres cartuchos que recibieron dosis crecientes de SEMA4Dr, mientras que la misma concentración de un anticuerpo de control de isotipo se añadió al cartucho restante que había recibido dosis crecientes de SEMA4Dr. Se tomaron mediciones de TEER en diversos momentos de tiempo posteriores. El tratamiento con VX15/2503 produjo un aumento en TEER de nuevo a los niveles pico al comienzo del experimento, reflejando una disminución global en la permeabilidad de la BBB (es decir, restauración de la BBB). En el cartucho que recibió el anticuerpo de control de isotipo, los niveles de TEER siguieron estando a niveles relativamente reducidos inducidos mediante el tratamiento con SEMA4Dr, que no indica disminución significativa en la permeabilidad de la BBB. Se muestran resultados similares en la FIG. 4. En la FIG. 4, se añadió anticuerpo VX15/2503 a una concentración de 250 µg/ml a las 48 horas a los dos cartuchos que recibieron la proteína C35 recombinante de control inicial, seguido de 50 µg/ml de SEMA4Dr durante 12 horas. El tratamiento con VX15/2503 produjo un aumento en TEER de nuevo a los niveles pico al comienzo del experimento, reflejando una disminución global en la permeabilidad de la BBB (es decir, restauración de la BBB).

Ejemplo 3: Prueba de la capacidad de una molécula de unión anti-plexina-B1, por ejemplo, un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno, variante, o derivado del mismo, para restaurar la integridad de la BBB tras la rotura de la BBB inducida por SEMA4D en un modelo de DIV-BBB *in vitro*

Se realizó otro estudio para medir los efectos del anticuerpo anti-plexina-B1 (MAb contra plexina-B1 humana MAB37491 (Clon 559830), R&D Systems) sobre la integridad de la BBB. Este anticuerpo bloquea la unión de SEMA4D al receptor de plexina-B1. Los resultados de este estudio se muestran en la FIG. 5. Como se muestra en la FIG. 5, células endoteliales humanas y astrocitos en cuatro cartuchos de DIV-BBB experimentaron formación de BBB similar a los experimentos descritos anteriormente. Después de la formación de BBB, se añadió SEMA4Dr a una concentración de 50,0 µg/ml, que indujo un aumento en la permeabilidad de BBB (es decir, destrucción de la BBB). Tras la adición de SEMA4Dr, se añadió anticuerpo anti-plexina-B1 a una concentración de 125 µg/ml a las 6 horas a dos de los cuatro cartuchos, el anticuerpo VX15/2503 se añadió a una concentración de 250 µg/ml a uno de los cuatro cartuchos, y el anticuerpo de control de isotipo se añadió a una concentración de 250 µg/ml al cartucho restante. Se tomaron mediciones de TEER en diversos momentos de tiempo posteriores. El tratamiento con cualquiera de anticuerpo VX15/2503 o anti-plexina-B1 produjo un aumento en los niveles de TEER con ambos agentes. El tratamiento con VX15/2503 produjo un aumento algo mayor en TEER que el tratamiento con anticuerpo anti-plexina-B1 en el último momento de tiempo. El efecto de los dos anticuerpos es indistinguible en todos los otros momentos de tiempo. El aumento en TEER refleja una disminución global en la permeabilidad de la BBB (es decir, restauración de la BBB) en presencia de cualquiera del anticuerpo VX15/2503 o anti-plexina-B1. En un cartucho que recibió anticuerpo de control de isotipo, los niveles de TEER siguieron estando a niveles relativamente reducidos inducidos por el tratamiento con SEMA4Dr, que indica disminución no significativa en la permeabilidad de la BBB. Debe apreciarse que el tratamiento también puede realizarse usando una combinación de VX15/2503 y anti-plexina-B1.

Ejemplo 4: Prueba de la capacidad de una molécula de unión anti-SEMA4D, por ejemplo, un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno, variante, o derivado del mismo, por ejemplo, VX15/2503, para restaurar la integridad de la BBB tras la rotura de la BBB inducida por CMSP activadas y cese de flujo en un modelo de DIV-BBB *in vitro*

Diseño experimental. Se realizó otro experimento empleando el modelo de DIV-BBB *in vitro* para estudiar el efecto de VX15/2503 sobre la restauración de la integridad de la BBB tras la rotura de la BBB inducida por células mononucleares de sangre periférica (CMSP) activadas y cese de flujo. Durante dos semanas, dos cartuchos de DIV-BBB experimentaron formación de BBB en compartimentos de células endoteliales y astrocíticas.

Aumento inducido por CMSP activadas en la permeabilidad de la BBB. Tras la formación de la BBB, se midió el efecto de CMSP activadas sobre la integridad de la BBB. Se activaron CMSP con PMA/ionomicina durante 2 horas y luego se añadieron a una concentración de 10^6 /ml en la luz de los dos cartuchos. Se tomaron mediciones de TEER antes y después de la adición de las CMSP activadas como una reflexión de los cambios en la permeabilidad de la BBB. En general, la adición de CMSP activadas a los cartuchos a 10^6 /ml produjo la disminución de la medición de TEER que refleja la elevada permeabilidad de la BBB. Estos resultados se muestran en la FIG. 6.

A aproximadamente 2-4 horas tras la adición de las CMSP activadas a los cartuchos, se realizó el cese de flujo durante 1 hora. Se tomaron mediciones de TEER antes y después del cese de flujo como una reflexión de cambios en la permeabilidad de la BBB. En general, el cese de flujo produjo una disminución adicional en la medición de TEER que refleja la elevada permeabilidad de la BBB. Estos resultados también se muestran en la FIG. 6.

Disminución inducida por anticuerpos en la permeabilidad de la BBB expuesta a CMSP activadas. Tras la exposición a CMSP activadas y el cese de flujo, se midió el efecto de VX15/2503 sobre TEER y la permeabilidad de la BBB. Se añadió anticuerpo VX15/2503 a una concentración de 250 µg/ml a uno de los dos cartuchos que recibieron CMSP activadas, mientras que la misma concentración de un anticuerpo de control de isotipo (Ig de control de isotipo, 2269) se añadió al cartucho restante. Se tomaron mediciones de TEER en diversos momentos de tiempo posteriores. Como se muestra en la FIG. 6, el tratamiento con VX15/2503 produjo un aumento en TEER de nuevo a los niveles pico al comienzo del experimento, reflejando una disminución global en la permeabilidad de la BBB (es decir, restauración de la BBB). En el cartucho que recibió anticuerpo de control de isotipo, los niveles de TEER siguieron a niveles relativamente reducidos inducidos mediante el tratamiento con CMSP activadas y cese de flujo, que indica distinción no significativa en la permeabilidad de la BBB.

Ejemplo 5: Prueba de la capacidad de una molécula de unión anti-SEMA4D, por ejemplo, un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno, variante, o derivado del mismo, por ejemplo, VX15/2503, para proteger la integridad de la BBB en un modelo de EAE *in vivo*

Se probaron moléculas de unión anti-SEMA4D, por ejemplo, anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno, variantes o derivados de los mismos, por ejemplo, VX15/2503, en el modelo de encefalomielitis autoinmune experimental (EAE) *in vivo*.

En un modelo de EAE *in vivo*, se investigó la rotura de la BBB examinando cambios en la permeabilidad del cerebro como se refleja en la penetración de fibrinógeno de la sangre en el parénquima cerebral y mediante examen de las proteínas de la zona de oclusión endoteliales, que incluyen claudina-5. En este modelo, se indujo EAE en ratones por inmunización con péptido PLP (139-151). Por supuesto, aquellos expertos en la materia apreciarán que también pueden usarse otras proteínas inductoras de EAE (por ejemplo, un antígeno de mielina, por ejemplo péptido de glucoproteína de mielina-oligodendrocito 35-55) y que, para la mayor eficiencia, estas proteínas o péptidos inductores pueden variar de una especie a otra y de una cepa de ratones a otra, Steinman, L. *Neuron* 24:511-514 (1999). Entonces se inmunotifieron secciones de tejido del sistema nervioso central (SNC) de animales en diferentes etapas de enfermedad para proteínas (fibrinógeno y claudina-5, que sirven de marcadores para la rotura de BBB).

Diseño experimental. En un modelo de EAE *in vivo*, se indujo EAE en ratones SJL/J de 12 semanas (10 ratones por grupo) por inmunización con el péptido PLP (139-151) en CFA (adyuvante completo de Freund). Los ratones se trataron entonces una vez por semana a partir de 7 días después de la inducción con 600 µg de anticuerpo anti-SEMA4D (anticuerpo VX15/2503) o IgG de control. Se observaron primero los signos neurológicos 11 d después de la inducción (dpi). 13 días después de la inducción, durante la fase de enfermedad aguda, se sacrificaron 4 ratones por grupo y se prepararon muestras de la médula espinal lumbar para análisis histopatológico. Para detectar la rotura de la BBB en las muestras, estas muestras se inmunotifieron para fibrinógeno y claudina-5. El procedimiento para inmunotinción es del siguiente modo: Se aclararon secciones dos veces en PBS, luego se incubaron en PBS-0,1 % de glicina 10 min, se bloquearon en PBS-0,3 % de Triton X-100-10 % de suero de cabra durante 1 h, y se incubaron con Ab primarios en tampón de bloqueo durante la noche a 4 °C. Para claudina-5 (CLN-5), antes del bloqueo, se empaparon secciones en EDTA, pH 8, 100 °C. Los anticuerpos primarios usados fueron anti-CLN-5 (1:50) y anti-fibrinógeno (1:1.000). Después de lavar tres veces en PBS 0,3 %, entonces se incubaron secciones de Triton X-100 en anticuerpos secundarios específicos de especie relevantes conjugados con AlexaFluor 488 y/o AlexaFluor 594 (1/100; Molecular Probes) en tampón de bloqueo durante 1 h a 25 °C, se lavaron otra vez tres veces, y se contratiñeron con 4,6-diamidino-2-fenilindol (DAPI). Todas las muestras se examinaron y se fotografiaron usando un sistema confocal de barrido láser Zeiss LSM 510 META unido a un microscopio de fluorescencia invertido Axiovert 200.

Se puntuó la enfermedad clínica en los ratones del siguiente modo: 0= sin síntomas; 1= cola caída; 2= debilidad de las extremidades traseras; 4= debilidad de las extremidades delanteras y traseras; 5= muerte. Se observaron primero los signos neurológicos 11 días después de la inducción. En los ratones tratados con el anticuerpo VX15/2503, la enfermedad clínica alcanzó una puntuación de gravedad media de 0,75, indicativa de debilidad de la cola leve, mientras que la enfermedad clínica en ratones del grupo de control alcanzó un alcance de la gravedad medio de 2,25, indicativo de paraparesia.

Los resultados de la inmunotinción 13 días después de la inducción se muestran en las FIG. 7A-7C. El fibrinógeno normalmente no penetra en la barrera hematoencefálica (BBB). En EAE, con la BBB comprometida, se detectó tinción de fibrinógeno verde en materia del cerebro (panel izquierdo). Además, se redujo la expresión de claudina-5 (CLN-5, tinción roja), un componente de las zonas de oclusión que constituyen la BBB. Ratones en el grupo de control mostraron expresión reducida de claudina-5 y elevados niveles de fuga extravascular de fibrinógeno, que se correlacionaron con una rotura en la BBB. En ratones tratados con el anticuerpo VX15/2503, por otra parte, se mantuvo la expresión de claudina-5 y la fuga de fibrinógeno fue significativamente reducida. Estos resultados demostraron el efecto protector del anticuerpo VX15/2503 contra la rotura de la BBB en estos ratones tratados, y específicamente demostraron cómo el anticuerpo anti-SEMA4D previene la rotura de la BBB, previene la fuga extravascular de fibrinógeno (7A panel izquierdo y cuantificación en 7B), y preserva la claudina-5 como se detecta por tinción roja (7A panel derecho y cuantificación en 7C).

Ejemplo 6: Efecto de SEMA4D sobre las proteínas de la zona de oclusión en cultivos de células endoteliales cerebrales

Diseño experimental. Se investigó la expresión de la proteína de la zona de oclusión endotelial clave claudina-5 tras el tratamiento de células endoteliales derivadas del SNC con SEMA4D recombinante soluble. En este modelo, se aislaron cultivos endoteliales del sistema nervioso central (SNC) de ratón primario y se dispusieron en una placa recubierta de Matrigel de 6 pocillos (se resuspendieron mBCEC aisladas de 10 cerebros en 3 ml de medio de cultivo de células endoteliales primarias y se sembraron a 250 ul por pocillo). Se usaron cultivos en el día 7 después del aislamiento. Se trataron cultivos con 1 ng/ml, 10 ng/ml o 100 ng/ml de SEMA4D de ratón recombinante o 100 ng/ml de VEGF-A de ratón (control positivo) durante 24 horas. Los cultivos endoteliales de los animales se sometieron entonces a electroforesis en SDS-gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) y se realizaron inmunotransferencias para la proteína de la zona de oclusión claudina-5 y control de carga de actina. Se barrieron los datos y se sometieron a densitometría usando el software ImageJ (NIH).

Los resultados de inmunotransferencia se muestran en la FIG. 8. Como se proporciona en la Fig. 8, cultivos de células endoteliales tratados con 100 ng/ml de SEMA4D recombinante mostraron una reducción significativa en la expresión de la proteína claudina-5. Se probaron cultivos de células endoteliales con 100 ng/ml de VEGF-A como control positivo para la regulación por disminución de claudina-5. Esto demuestra una función importante de SEMA4D en regular la expresión de una proteína de la zona de oclusión clave de la BBB.

Ejemplo 7: Prueba de la capacidad de una molécula de unión anti-SEMA4D o anti-plexina B1, por ejemplo, un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno, variante, o derivado del mismo, para reducir la permeabilidad de la BBB en un modelo de enfermedad de Alzheimer (EA) *in vivo*

Se prueban moléculas de unión anti-SEMA4D o anti-plexina B1, por ejemplo, anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno, variantes o derivados de los mismos, por ejemplo, MAb 67 (descrito en detalle en el documento US 2010/0285036 A1, incorporado en el presente documento por referencia en su totalidad), en diversos sistemas modelo de trastornos neuroinflamatorios, que incluyen, pero no se limitan a, un modelo de ratón transgénico con enfermedad de Alzheimer (EA) experimental *in vivo* APPSwDI/NOSC^{-/-}. Estos ratones se generaron cruzando ratón mutante APP-Swedish-Dutch-Iowa con ratón inactivado en la óxido nítrico sintasa 2 (Colton et al., J Alzheimers Dis, 15:571-587, 2008; Van Nostrand et al., Stroke 41:S135-S138, 2010). Los ratones APPSwDI/NOSC^{-/-} desarrollan amiloidosis neurovascular senil con función de BBB perturbada, placas de amiloide intraparenquimales, hiperfosforilación de tau de ratón, neuroinflamación, muerte celular neuronal y déficits cognitivos. Wilcock et al. han mostrado que el tratamiento de ratones APPSwDI/NOSC^{-/-} con inmunoterapia activa dirigida a amiloide-beta conduce a una marcada reducción en la deposición de amiloide, pero con elevada incidencia de microhemorragias (Wilcock et al., J Neurosci. 29:7957-7965, 2009).

En el modelo de EA *in vivo*, se investiga la progresión de EA examinando distintivos inmunohistoquímicos de deposición de amiloide, hiperfosforilación de tau y fuga de BBB (fibrinógeno), además de evaluando las capacidades cognitivas en los paradigmas del comportamiento basados en la memoria espacial. En este modelo, los ratones transgénicos se administran con MAb 67 o Ig de control (Mab 2B8) por vía intravenosa a una concentración de 30 mg/kg de la edad 26 a 38 semanas durante un total de 13 dosis.

Los ratones se sometieron inicialmente a prueba de comportamiento inicial a la edad de 10-12 semanas, por ejemplo, pruebas de campo abierto, de RAWn y de laberinto de Barnes, y los ratones que alcanzaron los criterios de actividad y aprendizaje/memoria se incluyen en el seguimiento. Los déficits de comportamiento son otra vez medidos a la edad de 38, 39 y 40 semanas y se registra el peso corporal. Los ratones que no alcanzan los criterios para el enrolamiento en el estudio se sacrificarán. En la semana 41 del criterio de valoración de la edad, los animales se sacrificarán y los cerebros se procesarán para análisis bioquímicos e inmunohistológicos para niveles de amiloide-beta soluble e insoluble y depósitos. Se recoge suero antes de la dosis, durante la dosis y en el momento final para PC a la edad 10, 25 y 41 semanas. Pueden inmunotefiarse secciones de tejido del sistema nervioso central (SNC) de animales en diferentes etapas de la enfermedad para fibrinógeno, que pueden usarse como marcadores para la rotura de BBB.

Muchas modificaciones y otras realizaciones de las invenciones expuestas en el presente documento vendrán a la mente de un experto en la materia a la que se refieren estas invenciones que tienen el beneficio de las enseñanzas presentadas en las anteriores descripciones y los dibujos asociados. Por tanto, debe entenderse que las invenciones no deben limitarse a las realizaciones específicas desveladas y que modificaciones y otras realizaciones pretenden estar incluidas dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas y lista de realizaciones desveladas en el presente documento. Aunque se emplean términos específicos en el presente documento, se usan en un sentido genérico y descriptivo solo y no para fines de limitación.

-LISTADO DE SECUENCIAS

	<110> Vaccinex, Inc. SMITH, Ernest S. ZAUDERER, Maurice
5	<120> USO DE MOLÉCULAS DE UNIÓN A SEMAFORINA-4D PARA LA MODULACIÓN DE LA PERMEABILIDAD DE LA BARRERA HEMATOENCEFÁLICA
	<130> 1843.068PC03/EJH/BNC
10	<140> Por ser asignado <141> Con la presente
	<150>US 61/593.641 <151> 01-02-2012
15	<150>US 61/555.726 <151> 04-11-2011
20	<150>US 61/545.809 <151> 11-10-2011 <160> 40 <170> PatentIn versión 3.3
25	<210> 1 <211> 862 <212> PRT <213> Homo sapiens
30	<400> 1

ES 2 669 209 T3

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

ES 2 669 209 T3

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					
		210				215					220									
Asp	Gly	Glu	Asp	Asp	Arg	Val	Tyr	Phe	Phe	Phe	Thr	Glu	Val	Ser	Val					
225					230					235					240					
Glu	Tyr	Glu	Phe	Val	Phe	Arg	Val	Leu	Ile	Pro	Arg	Ile	Ala	Arg	Val					
				245					250					255						
Cys	Lys	Gly	Asp	Gln	Gly	Gly	Leu	Arg	Thr	Leu	Gln	Lys	Lys	Trp	Thr					
			260					265					270							
Ser	Phe	Leu	Lys	Ala	Arg	Leu	Ile	Cys	Ser	Arg	Pro	Asp	Ser	Gly	Leu					
		275					280					285								
Val	Phe	Asn	Val	Leu	Arg	Asp	Val	Phe	Val	Leu	Arg	Ser	Pro	Gly	Leu					
		290				295					300									
Lys	Val	Pro	Val	Phe	Tyr	Ala	Leu	Phe	Thr	Pro	Gln	Leu	Asn	Asn	Val					
305					310					315					320					

ES 2 669 209 T3

Gly Leu Ser Ala Val Cys Ala Tyr Asn Leu Ser Thr Ala Glu Glu Val
 325 330 335
 Phe Ser His Gly Lys Tyr Met Gln Ser Thr Thr Val Glu Gln Ser His
 340 345 350
 Thr Lys Trp Val Arg Tyr Asn Gly Pro Val Pro Lys Pro Arg Pro Gly
 355 360 365
 Ala Cys Ile Asp Ser Glu Ala Arg Ala Ala Asn Tyr Thr Ser Ser Leu
 370 375 380
 Asn Leu Pro Asp Lys Thr Leu Gln Phe Val Lys Asp His Pro Leu Met
 385 390 395 400
 Asp Asp Ser Val Thr Pro Ile Asp Asn Arg Pro Arg Leu Ile Lys Lys
 405 410 415
 Asp Val Asn Tyr Thr Gln Ile Val Val Asp Arg Thr Gln Ala Leu Asp
 420 425 430
 Gly Thr Val Tyr Asp Val Met Phe Val Ser Thr Asp Arg Gly Ala Leu
 435 440 445
 His Lys Ala Ile Ser Leu Glu His Ala Val His Ile Ile Glu Glu Thr
 450 455 460
 Gln Leu Phe Gln Asp Phe Glu Pro Val Gln Thr Leu Leu Leu Ser Ser
 465 470 475 480
 Lys Lys Gly Asn Arg Phe Val Tyr Ala Gly Ser Asn Ser Gly Val Val
 485 490 495
 Gln Ala Pro Leu Ala Phe Cys Gly Lys His Gly Thr Cys Glu Asp Cys
 500 505 510
 Val Leu Ala Arg Asp Pro Tyr Cys Ala Trp Ser Pro Pro Thr Ala Thr
 515 520 525
 Cys Val Ala Leu His Gln Thr Glu Ser Pro Ser Arg Gly Leu Ile Gln
 530 535 540
 Glu Met Ser Gly Asp Ala Ser Val Cys Pro Asp Lys Ser Lys Gly Ser
 545 550 555 560
 Tyr Arg Gln His Phe Phe Lys His Gly Gly Thr Ala Glu Leu Lys Cys
 565 570 575

ES 2 669 209 T3

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
 705 710 715 720
 His Ser Glu Lys Thr Met Tyr Leu Lys Ser Ser Asp Asn Arg Leu Leu
 725 730 735
 Met Ser Leu Phe Leu Phe Phe Phe Val Leu Phe Leu Cys Leu Phe Phe
 740 745 750
 Tyr Asn Cys Tyr Lys Gly Tyr Leu Pro Arg Gln Cys Leu Lys Phe Arg
 755 760 765
 Ser Ala Leu Leu Ile Gly Lys Lys Lys Pro Lys Ser Asp Phe Cys Asp
 770 775 780
 Arg Glu Gln Ser Leu Lys Glu Thr Leu Val Glu Pro Gly Ser Phe Ser
 785 790 795 800
 Gln Gln Asn Gly Glu His Pro Lys Pro Ala Leu Asp Thr Gly Tyr Glu
 805 810 815
 Thr Glu Gln Asp Thr Ile Thr Ser Lys Val Pro Thr Asp Arg Glu Asp
 820 825 830
 Ser Gln Arg Ile Asp Asp Leu Ser Ala Arg Asp Lys Pro Phe Asp Val
 835 840 845
 Lys Cys Glu Leu Lys Phe Ala Asp Ser Asp Ala Asp Gly Asp
 850 855 860

<211> 861

<212> PRT

<213> esp. murina

5 <400> 2

```

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

```


ES 2 669 209 T3

Ser His Ser Pro Leu Arg Thr Glu Tyr Ala Ile Pro Trp Leu Asn Glu
 195 200 205
 Pro Ser Phe Val Phe Ala Asp Val Ile Gln Lys Ser Pro Asp Gly Pro
 210 215 220
 Glu Gly Glu Asp Asp Lys Val Tyr Phe Phe Phe Thr Glu Val Ser Val
 225 230 235 240
 Glu Tyr Glu Phe Val Phe Lys Leu Met Ile Pro Arg Val Ala Arg Val
 245 250 255
 Cys Lys Gly Asp Gln Gly Gly Leu Arg Thr Leu Gln Lys Lys Trp Thr
 260 265 270
 Ser Phe Leu Lys Ala Arg Leu Ile Cys Ser Lys Pro Asp Ser Gly Leu
 275 280 285
 Val Phe Asn Ile Leu Gln Asp Val Phe Val Leu Arg Ala Pro Gly Leu
 290 295 300
 Lys Glu Pro Val Phe Tyr Ala Val Phe Thr Pro Gln Leu Asn Asn Val
 305 310 315 320
 Gly Leu Ser Ala Val Cys Ala Tyr Thr Leu Ala Thr Val Glu Ala Val
 325 330 335
 Phe Ser Arg Gly Lys Tyr Met Gln Ser Ala Thr Val Glu Gln Ser His
 340 345 350
 Thr Lys Trp Val Arg Tyr Asn Gly Pro Val Pro Thr Pro Arg Pro Gly
 355 360 365
 Ala Cys Ile Asp Ser Glu Ala Arg Ala Ala Asn Tyr Thr Ser Ser Leu
 370 375 380
 Asn Leu Pro Asp Lys Thr Leu Gln Phe Val Lys Asp His Pro Leu Met
 385 390 395 400
 Asp Asp Ser Val Thr Pro Ile Asp Asn Arg Pro Lys Leu Ile Lys Lys
 405 410 415
 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

ES 2 669 209 T3

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

ES 2 669 209 T3

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

5

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Polinucleótido anti-CDR1 VH de CD100

10

<400> 3

ggctacagct tcagcgacta ctacatgcac 30

<210> 4

15

<211> 51

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Polinucleótido anti-CDR2 VH de CD100

5

<400> 4

cagattaatc ctaccactgg cggcgctagc tacaaccaga agttcaaggg c 51

<210> 5

10 <211> 27

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

15 <223> Polinucleótido anti-CDR3 VH de CD100

<400> 5

tattactacg gcagacactt cgatgtc 27

20 <210> 6

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial

25 <220>

<223> Polipéptido anti-CDR1 VH de CD100

<400> 6

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

<210> 7

<211> 17

<212> PRT

35 <213> Artificial

<220>

<223> Polipéptido anti-CDR2 VH de CD100

<400> 7

5

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

10

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Polipéptido anti-CDR3 VH de CD100

15

<400> 8

Tyr Tyr Tyr Gly Arg His Phe Asp Val
1 5

20

<210> 9

<211> 118

<212> PRT

<213> Artificial

25

<220>

<223> Polipéptido anti-VH de CD100 2503

<400> 9

ES 2 669 209 T3

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

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Polipéptido anti-VH de CD100 67

10

<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

ES 2 669 209 T3

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

5 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Polinucleótido anti-CDR1 VL de CD100

10

<400> 11

aagccagcc aaagcgtgga ttatgatggc gatagctata tgaac 45

<210> 12

15 <211> 21

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

20 <223> Polinucleótido anti-CDR2 VL de CD100

<400> 12

gctgcatcca atctggaaag c 21

25 <210> 13

<211> 27

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Polinucleótido anti-CDR3 VL de CD100

<400> 13

5 cagcaaagca atgaggatcc ctacacc 27

<210> 14

<211> 15

<212> PRT

10 <213> Artificial

<220>

<223> Polipéptido anti-CDR1 VL de CD100

15 <400> 14

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

<210> 15

20 <211> 7

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

25 <223> Polipéptido anti-CDR2 VL de CD100

<400> 15

Ala	Ala	Ser	Asn	Leu	Glu	Ser
1				5		

30

<210> 16

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

35

<220>

<223> Polipéptido anti-CDR3 VL de CD100

<400> 16

5 Gln Gln Ser Asn Glu Asp Pro Tyr Thr
1 5

<210> 17

<211> 111

<212> PRT

10 <213> Artificial

<220>

<223> Polipéptido anti-VL de CD100 2503

15 <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

20 <210> 18

<211> 111

<212> PRT

<213> Artificial

25 <220>

<223> Polipéptido anti-VL de CD100 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

```

5

<210> 19

<211> 354

<212> ADN

10 <213> Artificial

<220>

<223> Polinucleótido anti-VH de CD100 2503

15 <400> 19

```

caggtgcagc tgggtgcagag cggcgctgag gtgaagaagc ctggcagcag cgtgaaggctc      60
tcctgcaagg ctagcggcta cagcttcagc gactactaca tgcactgggt gagacaggcc      120
cctggccaag gcctggagtg gatgggccag attaatccta ccactggcgg cgctagctac      180
aaccagaagt tcaagggcaa ggccaccatt accgtggaca aaagcaccag cacagcctac      240
atgggagctga gcagcctgag aagcgaggac accgccgtgt attactgtgc cagatattac      300
tacggcagac acttcgatgt ctggggccaa ggcaccacgg tcaccgtctc ttca          354

```

20 <210> 20

<211> 354
 <212> ADN
 <213> Artificial

5 <220>
 <223> Polinucleótido anti-VH de CD100 67

<400> 20

	cagggtccagc tgcagcagtc tggacctgag ctggtgaagc ctggggcttc agtgaagata	60
	tcctgcaagg cttctgggta ctcattcagt gactactaca tgcactgggt gaagcaaagt	120
	cctgaaaata gtcttgagt gattggacag attaatccta ccactggggg tgctagctac	180
	aaccagaagt tcaagggcaa ggccacatta actgtagata aatcctccag cacagcctac	240
	atgcagctca agagcctgac atctgaagag tctgcagtct attactgtac aagatattac	300
10	tacggtagac acttcgatgt ctggggccaa gggaccacgg tcaccgtttc ctca	354

<210> 21
 <211> 333
 <212> ADN
 15 <213> Artificial

<220>
 <223> Polinucleótido anti-VL de CD100 2503

20 <400> 21

	gacatcgtga tgacccagag cccagacagc ctggctgtga gcctgggcca gagggccacc	60
	atcaactgca aggccagcca aagcgtggat tatgatggcg atagctatat gaactggtac	120
	cagcagaaac caggccagcc tcctaagctg ctgatttacg ctgcatccaa tctggaaagc	180
	ggcgtgcctg acagattcag cggcagcggc agcggcacag atttcaactct gaccatcagc	240
	agcctgcagg ctgaagatgt ggcagtgtat tactgtcagc aaagcaatga ggatccctac	300
	accttcgggc aagggaccaa gctcgagatc aaa	333

<210> 22
 25 <211> 333
 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Polinucleótido anti-VL de CD100 67

5

<400> 22

gacattgtga tgaccagtc tccagcttct ttggctgtgt ctctagggca gagggccacc	60
atctcctgca aggccagcca aagtgttgat tatgatggcg atagttatat gaactggtag	120
caacagaaac caggacagcc acccaaaactc ctcatctatg ctgcatccaa tctagaatct	180
gggatcccag ccaggtttag tggcagtggt tctgggacag acttcaccct caacatccat	240
cctgtggagg aggaggatgc tgcaacctat tactgtcagc aaagtaatga ggatccgtac	300
acgttcggag gggggaccaa gctcgagatc aaa	333

10

<210> 23

<211> 2586

<212> ADN

<213> Homo sapiens

15

<400> 23

ES 2 669 209 T3

atgaggatgt gcacccccat tagggggctg ctcatggccc ttgcagtgat gtttgggaca	60
gcgatggcat ttgcacccat acccgggac acctgggagc acagagaggt gcacctggtg	120
cagtttcatg agccagacat ctacaactac tcagccttgc tgctgagcga ggacaaggac	180
acottgtaca taggtgcccg ggaggcggtc ttcgctgtga acgcaactca catctccgag	240
aagcagcatg aggtgtattg gaaggtctca gaagacaaaa aagcaaatg tgcagaaaag	300
gggaaatcaa aacagacaga gtgcctcaac tacatccggg tgctgcagcc actcagcgcc	360
acttcccttt acgtgtgtgg gaccaacgca ttccagccgg cctgtgacca cctgaactta	420
acatccttta agtttctggg gaaaaatgaa gatggcaaaag gaagatgtcc ctttgaccca	480
gcacacagct acacatccgt catggttgat ggagaacttt attcggggac gtogtataat	540
tttttgggaa gtgaacccat catctccga aattcttccc acagtccctc gaggacagaa	600
tatgcaatcc cttggctgaa cgagcctagt ttcgtgtttg ctgacgtgat ccgaaaaagc	660
ccagacagcc ccgacggcga ggatgacagg gtctacttct tcttcacgga ggtgtctgtg	720
gagtatgagt ttgtgttcag ggtgctgac ccacggatag caagagtgtg caagggggac	780
cagggcggcc tgaggacctt gcagaagaaa tggacctcct tcctgaaagc ccgactcatc	840
tgctcccgcc cagacagcgg cttggtcttc aatgtgctgc gggatgtctt cgtgctcagg	900
tccccgggcc tgaaggtgcc tgtgttctat gcactcttca cccacagct gaacaacgtg	960
gggctgtcgg cagtgtgcgc ctacaacctg tccacagccg aggaggtctt ctcccacggg	1020
aagtacatgc agagcaccac agtggagcag tcccacacca agtgggtgcg ctataatggc	1080
ccggtaccca agccgcggcc tggagcgtgc atcgacagcg aggcacgggc cgccaactac	1140
accagctcct tgaatttgcc agacaagacg ctgcagttcg ttaaagacca ccctttgatg	1200
gatgactcgg taacccaat agacaacagg ccaggttaa tcaagaaaga tgtgaactac	1260
acccagatcg tgggtggaccg gaccagggcc ctggatggga ctgtctatga tgtcatgttt	1320
gtcagcacag accggggagc tctgcacaaa gccatcagcc tcgagcacgc tgttcacatc	1380
atcgaggaga ccagctctt ccaggacttt gagccagtc agaccctgct gctgtcttca	1440

ES 2 669 209 T3

```

aagaagggca acaggtttgt ctatgctggc tctaactcgg gcgtgggtcca ggccccgctg 1500
gccttctgtg ggaagcacgg cacctgcgag gactgtgtgc tggcgcggga cccctactgc 1560
gcctggagcc cgccacagc gacctgcgtg gctctgcacc agaccgagag cccagcagg 1620
ggtttgattc aggagatgag cggcgatgct tctgtgtgcc cggataaaag taaaggaagt 1680
taccggcagc attttttcaa gcacggtggc acagcggaac tgaaatgctc ccaaaaatcc 1740
aacctggccc gggctctttg gaagttccag aatggcgtgt tgaaggccga gagccccaag 1800
tacggtctta tgggcagaaa aaacttgctc atcttcaact tgtcagaagg agacagtggg 1860
gtgtaccagt gcctgtcaga ggagaggggt aagaacaaaa cggctctcca agtggtcgcc 1920
aagcacgtcc tggaagtga ggtggttcca aagcccgtag tggcccccac cttgtcagtt 1980
gttcagacag aaggtagtag gattgccacc aaagtgttg tggcatccac ccaaggtct 2040
tctcccccac cccagccgt gcaggccacc tctccgggg ccatcacct tctcccaag 2100
cctgcgcccc ccggcacatc ctgcgaacca aagatcgtca tcaacacggt cccccagctc 2160
cactcggaga aaaccatgta tcttaagtcc agcgacaacc gcctcctcat gtccctcttc 2220
ctcttcttct ttgttctctt cctctgcctc tttttctaca actgctataa gggatacctg 2280
cccagacagt gcttgaaatt ccgctcggtc ctactaattg ggaagaagaa gcccaagtca 2340
gatttctgtg accgtgagca gagcctgaag gagacgttag tagagccagg gagcttctcc 2400
cagcagaatg gggagacccc caagccagcc ctggacaccg gctatgagac cgagcaagac 2460
accatcacca gcaaagtccc cacggatagg gaggactcac agaggatcga cgaccttct 2520
gccagggaca agccctttga cgtcaagtgt gagctgaagt tcgctgactc agacgcagat 2580
ggagac 2586

```

<210> 24

<211> 13

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Epítipe de péptido de la proteína de proteolípido PLP(139-151)

10

<400> 24

```

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

```

15 <210> 25

<211> 118

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Polipéptido anti-VH de CD100 76

5

<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

```

10

<210> 26

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial

15

<220>

<223> Polipéptido anti-CDR1 VH de CD100 76

<400> 26

20

```

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

```

<210> 27

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial

5

<220>

<223> Polipéptido anti-CDR2 VH de CD100 76

<400> 27

10	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

15

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Polipéptido anti-CDR3 VH de CD100 76

20

<400> 28

Asp	Pro	Tyr	Gly	Trp	Thr	Met	Asp	Ser
1				5				

25

<210> 29

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial

30

<220>

<223> Polipéptido anti-VL de CD100 76

<400> 29

ES 2 669 209 T3

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

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Polipéptido anti-CDR1 VL de CD100 76

10

<400> 30

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

15 <210> 31

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial

20 <220>

<223> Polipéptido anti-CDR2 VL de CD100 76

<400> 31

ES 2 669 209 T3

Lys Ala Ser Asn Leu His Thr
1 5

<210> 32

<211> 9

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Polipéptido anti-CDR3 VL de CD100 76

10

<400> 32

Gln Gln Gly Gln Ser Tyr Pro Tyr Thr
1 5

15 <210> 33

<211> 354

<212> ADN

<213> Artificial

20 <220>

<223> Polinucleótido anti-VH de CD100 76

<400> 33

cagggtccagc tgcagcagtc tggggctgaa ctggcaaaac ctggggcctc agtgaagatg 60

tcctgcaagg cttctggcta cacctttact aggtactgga tgcactgggt aaaacagagg 120

cctggacagg gtctggaatg gattggatac attaatccta gcactggtta ttctgattac 180

aatcagaagt tcaaggacaa ggccacattg actgcagaca aatcctccag cacagcctac 240

atgcaactga gcagcctgac atctgaggac tctgcagtct attactgtgc aagagacccc 300

25 tacggctgga ctatggactc ctggggccaa gggactctgg tcaccgtctc ctca 354

<210> 34

<211> 30

<212> ADN

30 <213> Artificial

<220>

<223> Polinucleótido anti-CDR1 VH de CD100 76

<400> 34

5 ggctacacct ttactaggta ctggatgcac 30

<210> 35

<211> 51

<212> ADN

10 <213> Artificial

<220>

<223> Polinucleótido anti-CDR2 VH de CD100 76

15 <400> 35

tacattaatc ctagcactgg ttattctgat tacaatcaga agtcaagga c 51

<210> 36

<211> 27

20 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Polinucleótido anti-CDR3 VH de CD100 76

25

<400> 36

gaccctacg gctggactat ggactcc 27

<210> 37

30 <211> 321

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

35 <223> Polinucleótido anti-VL de CD100 76

<400> 37

ES 2 669 209 T3

gacatccaga tgacccagtc tccatccagt ctgtctgcat cccttggaga cacaattacc	60
atcacttgcc atgccagtca gaacattaat gtttggttaa gctggtacca gcagaaacca	120
ggaaatattc ctaaactatt gatctataag gcttccaact tgcacacagg cgtcccatca	180
aggttttagtg gcagtggatc tggaacaggt ttcacattaa ccatcagcag cctgcagcct	240
gaagacattg ccacttacta ctgtcaacag ggtcaaagtt atccgtacac gttcggaggg	300
gggaccaagc tcgagatcaa a	321

<210> 38

<211> 33

5 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

10 <223> Polinucleótido anti-CDR1 VL de CD100 76

<400> 38

catgccagtc agaacattaa tgttggtta agc 33

<210> 39

15 <211> 21

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

20 <223> Polinucleótido anti-CDR2 VL de CD100 76

<400> 39

aaggctcca acttgcacac a 21

25 <210> 40

<211> 27

<212> ADN

<213> Artificial

30 <220>

<223> Polinucleótido anti-CDR3 VL de CD100 76

ES 2 669 209 T3

<400> 40

caacaggggc aaagtatcc gtacacg 27

REIVINDICACIONES

1. Una cantidad eficaz de un anticuerpo aislado o fragmento de unión al antígeno del mismo que se une específicamente a semaforina-4D (SEMA4D) para su uso en un tratamiento para disminuir la permeabilidad de la barrera hematoencefálica (BBB) en un sujeto con elevada permeabilidad de BBB y un trastorno neuroinflamatorio, en la que el anticuerpo aislado o fragmento de unión al antígeno del mismo inhibe específicamente la interacción de semaforina 4D (SEMA4D) con el receptor de SEMA4D plexina B1.
2. El anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo para el uso de la reivindicación 1, en el que el sujeto es un mamífero.
3. El anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo para el uso de la reivindicación 2, en el que el mamífero es humano.
4. El anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo inhibe competitivamente un anticuerpo monoclonal de referencia que comprende 1) la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada variable (VH) SEQ ID NO: 9 y la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera variable (VL) SEQ ID NO: 17 o 2) la secuencia de aminoácidos de VH SEQ ID NO: 10 y la secuencia de aminoácidos de VL SEQ ID NO: 18.
5. El anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo se une específicamente al mismo epítipo de SEMA4D que un anticuerpo monoclonal de referencia que comprende 1) la secuencia de aminoácidos de VH SEQ ID NO: 9 y la secuencia de aminoácidos de VL SEQ ID NO: 17 o 2) la secuencia de aminoácidos de VH SEQ ID NO: 10 y la secuencia de aminoácidos de VL SEQ ID NO: 18.
6. El anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo es humano o humanizado.
7. El anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo comprende una VH que comprende las VHCDR 1-3 que comprende SEQ ID NO 6, 7 y 8, respectivamente, y una VL que comprende las VLCDR 1-3 que comprende SEQ ID NO 14, 15 y 16, respectivamente.
8. El anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo para el uso de la reivindicación 7, en el que el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo comprende 1) la secuencia de aminoácidos de VH SEQ ID NO: 9 y la secuencia de aminoácidos de VL SEQ ID NO: 17 o 2) la secuencia de aminoácidos de VH SEQ ID NO: 10 y la secuencia de aminoácidos de VL SEQ ID NO: 18.
9. La cantidad eficaz de un anticuerpo aislado o fragmento de unión al antígeno del mismo que se une específicamente a semaforina-4D (SEMA4D) para el uso de la reivindicación 1, y una cantidad eficaz de un anticuerpo aislado o fragmento de unión al antígeno del mismo que se une específicamente a plexina-B1, para el uso en un tratamiento de un sujeto con elevada permeabilidad de BBB y un trastorno neuroinflamatorio, en la que los anticuerpos contra SEMA4D y plexina-B1 o fragmentos de unión al antígeno de los mismos pueden disminuir la permeabilidad de la BBB.
10. El anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en el que el trastorno neuroinflamatorio está seleccionado del grupo que consiste en esclerosis múltiple, esclerosis lateral amiotrófica, epilepsia, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, meningitis, edema cerebral y traumatismo cerebral.
11. El anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en el que la cantidad eficaz del anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo provoca un aumento en la resistividad de la BBB, un aumento en el número, densidad o concentración de células endoteliales presentes en la BBB, un cambio en la morfología o función en las células endoteliales, un cambio en las interacciones entre células endoteliales o astrocitos, un cambio en las interacciones entre células endoteliales y astrocitos que forman la BBB.
12. El anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-11, en el que el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo se usa en combinación con uno o más tratamientos para trastornos neuroinflamatorios, en el que la terapia adicional se administra antes de, durante, o posterior al uso del anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo.

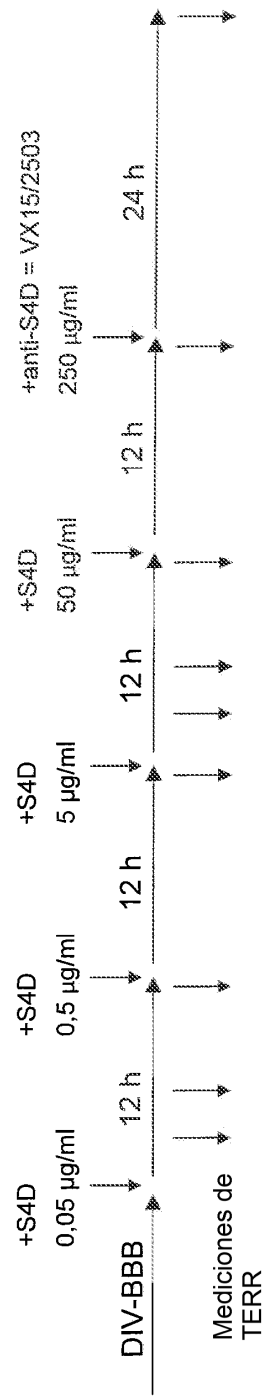


FIG. 1

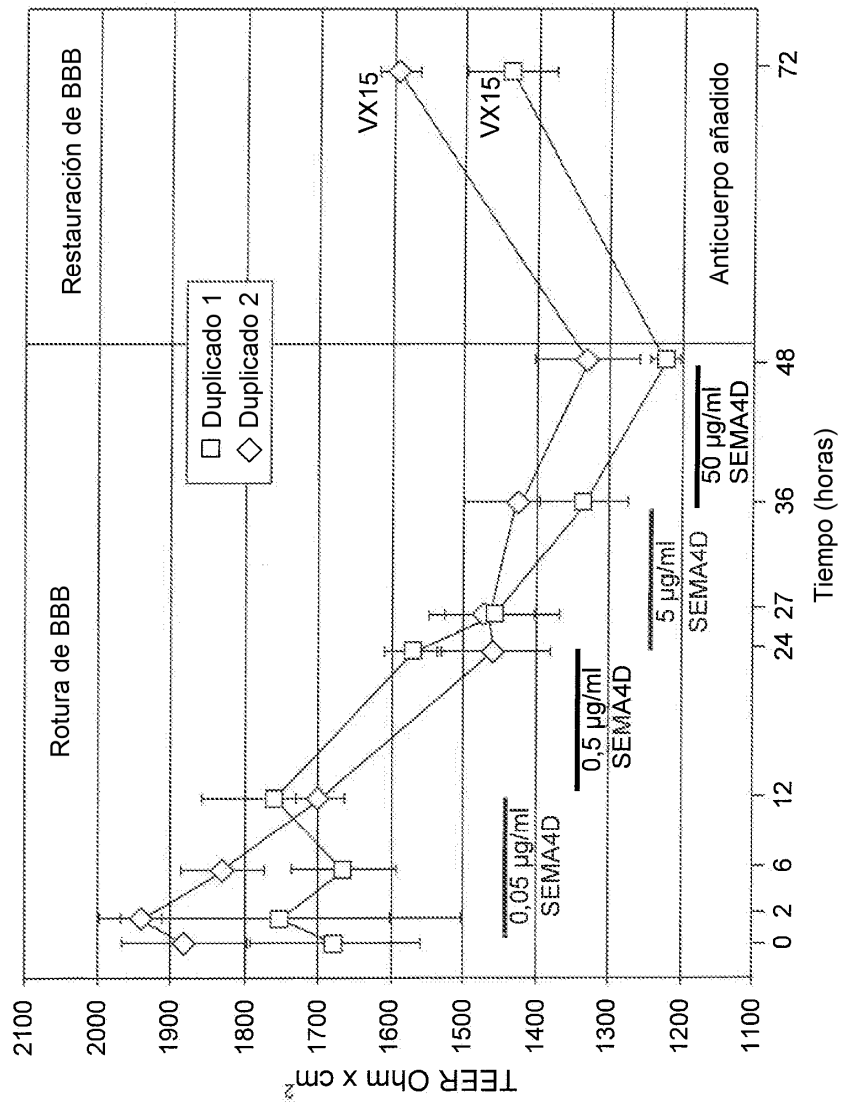


FIG. 2

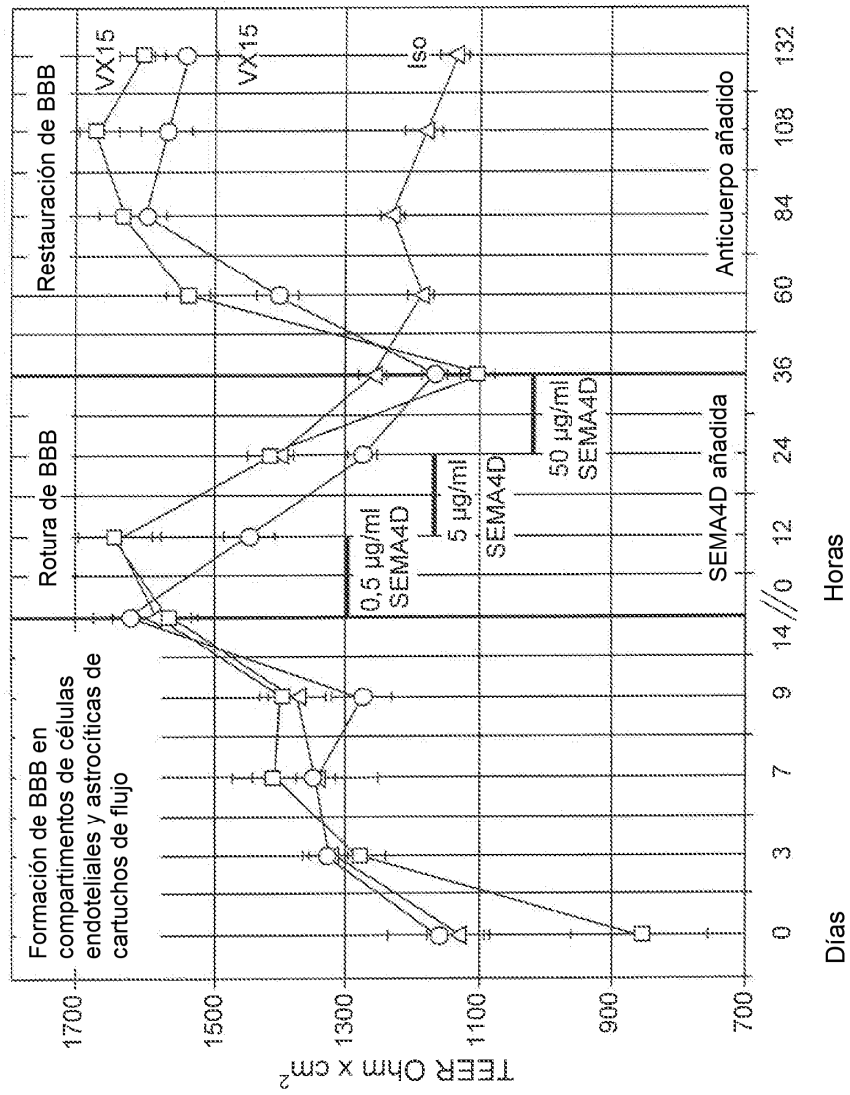


FIG. 3

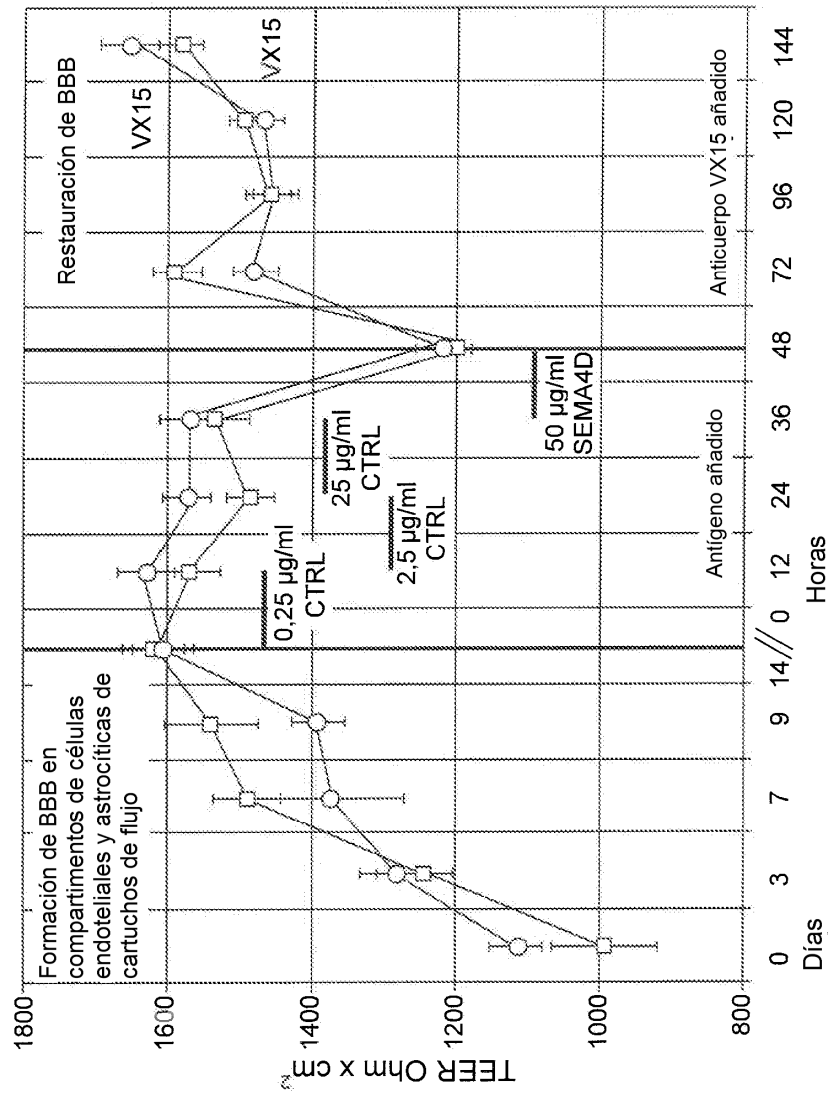


FIG. 4

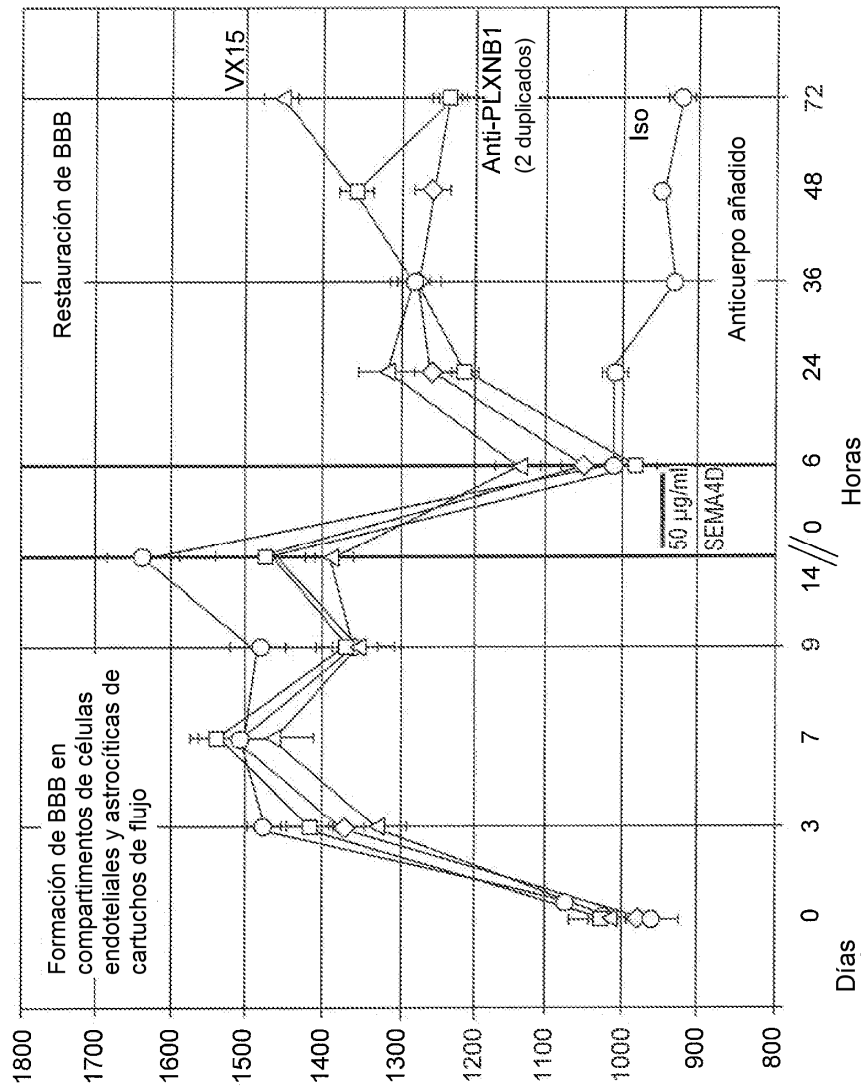


FIG. 5

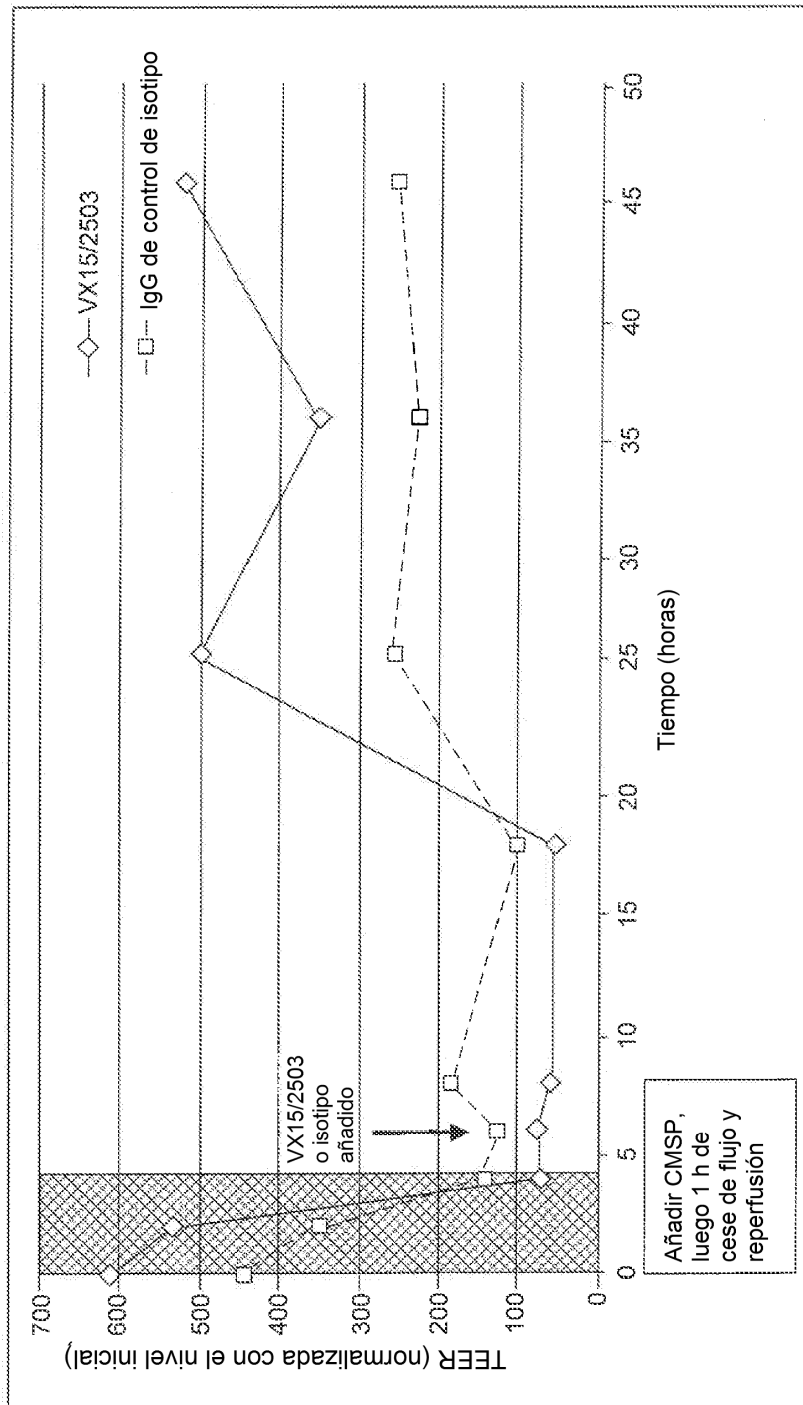
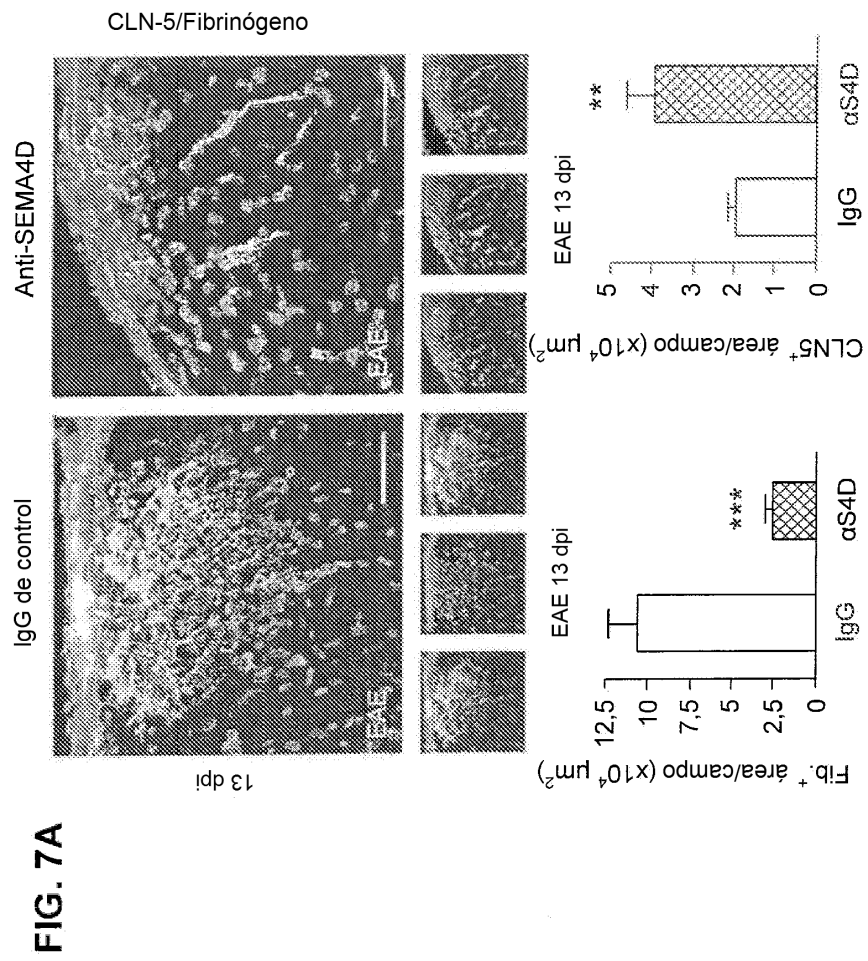


FIG. 6



Endotelio del SNC de ratón

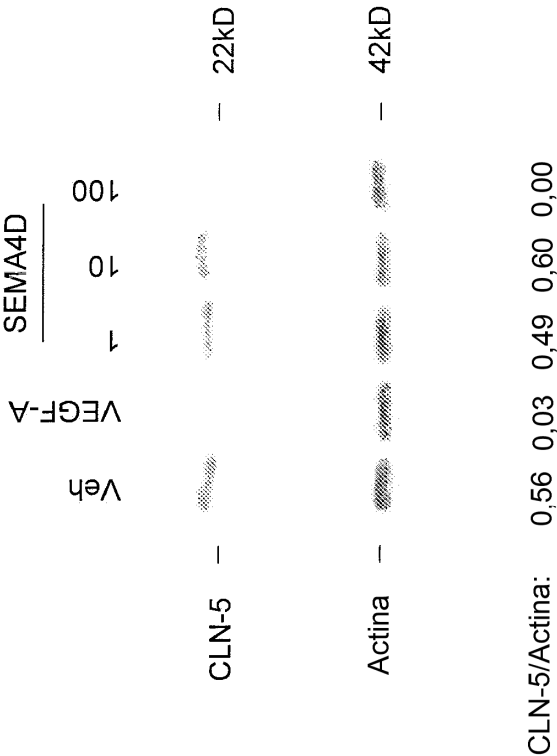


FIG. 8