

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **037551**

(13) **B1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента  
**2021.04.13**

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

(21) Номер заявки  
**201690728**

(22) Дата подачи заявки  
**2014.10.10**

---

(54) **ПРИМЕНЕНИЕ МОЛЕКУЛ, СВЯЗЫВАЮЩИХ СЕМАФОРИН-4D, ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ  
АТЕРОСКЛЕРОЗА**

---

(31) **61/889,421**

(56) US-A1-20060147449  
US-A1-20130095118

(32) **2013.10.10**

(33) **US**

(43) **2016.08.31**

(86) **PCT/US2014/060129**

(87) **WO 2015/054628 2015.04.16**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:  
**ВЭКСИНЕКС, ИНК. (US)**

(72) Изобретатель:  
**Заудерер Морис (US)**

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

---

(57) В настоящем описании предоставлен способ снижения роста атеросклеротических бляшек у субъекта, имеющего атеросклероз, включающий введение субъекту эффективного количества изолированного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которые специфично связываются с семафорином-4D (SEMA4D)); в котором антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит переменную тяжелую цепь (VH), содержащую VHCDR 1-3, содержащие последовательности SEQ ID NO: 6, 7 и 8 соответственно, и переменную легкую цепь (VL), содержащую VLCDR 1-3, содержащие последовательности SEQ ID NO: 14, 15 и 16 соответственно; и в котором антитело или его антигенсвязывающий фрагмент ингибирует SEMA4D-опосредованную трансдукцию сигнала плексина-B1. Изобретение обеспечивает ингибирование, подавление или замедление неоваскуляризации вокруг или в области бляшек у субъекта, имеющего атеросклероз.

**B1**

**037551**

**037551  
B1**

Ссылка на список последовательностей, поданный в электронном виде.

Содержание поданного в электронном виде списка последовательностей в текстовом файле ASCII (название: "Sequence\_Listing\_58008\_136615.txt"; размер: 36964 байт; и дата создания 9 октября 2014), поданного вместе с заявкой, включено в настоящее описание в виде ссылки в полном объеме.

#### Уровень техники

Семафорин 4D (SEMA4D), также известный как CD100, является трансмембранным белком (например, SEQ ID NO: 1 (человек); SEQ ID NO: 2 (мышь)), который относится к семейству генов семафорина класса IV. SEMA4D экспрессируется на клеточной поверхности в виде гомодимера, но при активации клеток SEMA4D может высвобождаться с клеточной поверхности в результате протеолитического расщепления с образованием sSEMA4D, растворимой формы белка, которая также является биологически активной. См. Suzuki et al., *Nature Rev. Immunol.* 3: 159-167 (2003); Kikutani et al., *Nature Immunol.* 9: 17-23 (2008).

SEMA4D экспрессируется на высоких уровнях в лимфоидных органах, включая селезенку, тимус и лимфатические узлы, и в нелимфоидных органах, таких как головной мозг, сердце и почки. В лимфоидных органах SEMA4D обильно экспрессируется на покоящихся Т-клетках и только слабо экспрессируется на покоящихся В-клетках и антигенпрезентирующих клетках (АПК), таких как дендритные клетки (ДК). Однако его экспрессия подвергается повышающей регуляции в таких клетках после активации различными иммунологическими стимулами. Высвобождение растворимого SEMA4D из иммунных клеток также повышается при активации клеток.

Атеросклероз был известен как воспалительное заболевание, при котором иммунные клетки играют ключевые роли в ходе прогрессирования заболевания (Hansson GK et al., *Nat. Rev. Immunol.* 6: 508-519, 2006). Макрофаги экспрессируют молекулы CD40, а Т-клетки имеют лиганд CD40 (CD40L или CD154) на своей клеточной поверхности (Mach F et al., *Circulation* 96: 396-399, 1997; и Mach F et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 1931-36, 1997). Связывание CD40 с CD40L на иммунных клетках внутри бляшек индуцирует секрецию протеаз и провоспалительных медиаторов, которые приводят к распространению воспалительной активации (Mach F et al., *Circulation* 96: 396-399, 1997). Блокада связывания CD40 или нокаут гена CD40L могут задерживать развитие атеросклеротических бляшек у склонных к атеросклерозу мышей (Mach F et al., *Nature* 394: 200-203, 1998; и Lutgens E et al., *Nat Med* 11: 1313-1316, 1999). Сообщалось, что связывание CD40 на иммунных клетках со стимулирующими анти-CD40-антителами индуцирует экспрессию SEMA4D (CD100) (Kumanogoh A et al., *Immunity* 13: 621-31, 2000).

SEMA4D вовлечен в различные процессы, такие как усиление иммунного ответа, ангиогенез, эпителиальный морфогенез и ремоделирование костей (Kruger RP et al., *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6: 789-800, 2005; Pasterkamp R.J., *Nat. Rev. Neurosci.* 13: 605-618, 2012; и Kang S et al., *Seminars in Cell and Dev. Biol.* 24: 163-171, 2013). Лимфоциты, макрофаги, эндотелиальные клетки и тромбоциты в атеросклеротических бляшках экспрессируют плексин-B1 на поверхности своих мембран, высоко аффинный рецептор для SEMA4D (Basile JR et al., *Mol. Cell Biol.* 25: 6889-6898, 2005; Delaire S et al., *J. Immunol.* 166: 4348-4354, 2001; и Chabbert-de Ponnat I et al., *Int. Immunol.* 17: 439-447, 2005). SEMA4D, экспрессированный Т-клетками и высвобожденный из Т-клеточной мембраны, затем может оказывать некоторое влияние на клетки, расположенные в атеросклеротических бляшках (Basile JR et al., *Mol. Cell Biol.* 25: 6889-6898, 2005; Delaire S et al., *J. Immunol.* 166: 4348-4354, 2001; и Chabbert-de Ponnat I et al., *Int. Immunol.* 17: 439-447, 2005). В предыдущих исследованиях выявлена проангиогенная активность SEMA4D в отношении эндотелиальных клеток *in vitro* и *in vivo* (Conrotto P et al., *Blood* 105: 4321-4329, 2005; и Basil JR et al., *Cancer Res.* 64: 5212-5224, 2004.). Кроме того, высокий уровень экспрессии SEMA4D наблюдали в случае некоторых плоскоклеточных карцином, что свидетельствует о важной роли SEMA4D в индуцируемом опухолями ангиогенезе *in vivo* (Basile JR et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103: 9017-9022, 2006.). Таким образом, SEMA4D может влиять на рост бляшек, например, стимулируя процесс неоваскуляризации, происходящий в атероме. Действительно, в одном исследовании обнаружено, что делетирование гена SEMA4D у склонных к атеросклерозу дефицитных по ApoE мышей (ApoE<sup>-/-</sup>) замедляло рост атеросклеротических бляшек и неоваскуляризацию в области бляшек, что свидетельствует о том, что блокирование сигнала SEMA4D во время фазы прогрессирования атеросклероза может предотвращать рост бляшек и неоваскуляризацию (Yukawa K et al., *Int. J. Mol. Med.* 26: 39-44, 2010).

#### Сущность изобретения

В настоящем описании раскрыты способы применения связывающих семафорин 4D молекул для лечения атеросклероза. Согласно аспектам изобретения, проиллюстрированным в настоящем описании, предлагается способ снижения, ингибирования, подавления и/или замедления образования атеросклеротических бляшек у субъекта, имеющего атеросклероз, включающий введение субъекту эффективного количества изолированного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которые специфично связываются и блокируют активность семафорина 4D (SEMA4D), в котором антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит варибельную тяжелую цепь (VH), содержащую VHCDR 1-3, содержащие последовательности SEQ ID NO: 6, 7 и 8 соответственно, и варибельную легкую цепь (VL), содержащую VLCDR 1-3, содержащие последовательности SEQ ID NO: 14, 15 и 16 соответственно; и в котором антитело или его антигенсвязывающий фрагмент ингибирует SEMA4D-опосредованную трансдукцию

сигнала плексина-B1.

Предпочтительно указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент может ингибировать, замедлять или снижать неоваскуляризацию вокруг атеросклеротических бляшек у указанного субъекта. В некоторых вариантах антитело или его антигенсвязывающий фрагмент может ингибировать взаимодействие SEMA4D с его рецептором. В некоторых вариантах рецептором является плексин-B1 или плексин-B2. В некоторых вариантах вышеуказанного способа субъект имеет сердечно-сосудистое заболевание. В некоторых вариантах сердечно-сосудистое заболевание выбрано из группы, состоящей из коронарной болезни сердца (также ишемической болезни сердца или болезни коронарных артерий), кардиомиопатии, гипертензивной кардиопатии, сердечной недостаточности, легочного сердца, сердечных аритмий, воспалительного заболевания сердца эндокардита, воспалительной кардиомегалии, миокардита, порока клапана сердца, цереброваскулярного заболевания, болезни периферических артерий, врожденного порока сердца, ревматической болезни сердца и их сочетания. В некоторых вариантах указанное антитело представляет собой эталонное моноклональное антитело VX15/2503 или 67. В некоторых вариантах вышеуказанного способа VH и VL содержат соответственно последовательности SEQ ID NO: 9 и SEQ ID NO: 17 или SEQ ID NO: 10 и SEQ ID NO: 18.

Также предлагаются способы ингибирования, замедления, снижения или замедления неоваскуляризации вокруг или в области бляшек у субъекта, имеющего атеросклероз, включающие введение субъекту эффективного количества изолированного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которые специфично связываются с семафорин-4D (SEMA4D); в котором антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит переменную тяжелую цепь (VH), содержащую VHCDR 1-3, содержащие последовательности SEQ ID NO: 6, 7 и 8 соответственно, и переменную легкую цепь (VL), содержащую VLCDR 1-3, содержащие последовательности SEQ ID NO: 14, 15 и 16 соответственно; и в котором антитело или его антигенсвязывающий фрагмент ингибирует SEMA4D-опосредованную трансдукцию сигнала плексина-B1. В некоторых вариантах антитело или его антигенсвязывающий фрагмент ингибирует взаимодействие SEMA4D с его рецептором. В некоторых вариантах рецептором является плексин-B1. В некоторых вариантах антитело или его антигенсвязывающий фрагмент ингибирует SEMA4D-опосредованную трансдукцию сигнала плексина-B1. В некоторых вариантах любого из вышеуказанных способов субъект имеет сердечно-сосудистое заболевание. В некоторых вариантах сердечно-сосудистое заболевание выбрано из группы, состоящей из коронарной болезни сердца (также ишемической болезни сердца или болезни коронарных артерий), кардиомиопатии, гипертензивной кардиопатии, сердечной недостаточности, легочного сердца, сердечных аритмий, воспалительного заболевания сердца эндокардита, воспалительной кардиомегалии, миокардита, порока клапана сердца, цереброваскулярного заболевания, болезни периферических артерий, врожденного порока сердца, ревматической болезни сердца и их сочетания. В некоторых вариантах любого из вышеуказанных способов антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляет собой эталонное моноклональное антитело VX15/2503 или 67. В некоторых вариантах любого из вышеуказанных способов VH и VL содержат соответственно последовательности SEQ ID NO: 9 и SEQ ID NO: 17 или SEQ ID NO: 10 и SEQ ID NO: 18.

#### **Краткое описание чертежей**

Фиг. 1A. Ингибированное развитие атеросклеротических бляшек у подвергнутых обработке анти-SEMA4D-антителом спонтанно гиперлипидемических (SHL) мышей с недостаточностью ApoE. На фиг. 1A показано количественное измерение суданофильной области в липидных отложениях при развитии атеросклеротических бляшек у мышей SHL, обработанных анти-SEMA4D-антителом или изотипическим контролем в течение 12 недель, начиная с 14-недельного возраста.

Фиг. 1B и C. Пониженная неоваскуляризация в бляшках у обработанных анти-SEMA4D-антителом мышей SHL. На фиг. 1B показана неоваскуляризация, визуализированная посредством количественного измерения окрашивания изолектином B4 в эндотелиальных клетках в бляшках обработанных анти-SEMA4D-антителом мышей SHL и обработанных контрольным антителом мышей SHL. На фиг. 1C показаны эндотелиальные клетки в бляшках обработанных анти-SEMA4D-антителом мышей SHL и обработанных контрольным антителом мышей SHL, визуализированные способом иммуногистохимии с использованием CD31-антител.

#### **Подробное описание изобретения**

##### **I. Определения.**

Следует отметить, что форма единственного числа в описании объекта относится к одному или нескольким таким объектам; например, следует понимать, что "анти-SEMA4D антитело" означает одно или несколько анти-SEMA4D-антител. По существу, формы единственного числа, "один или несколько" и "по меньшей мере один" могут быть использованы в настоящем описании взаимозаменяемо.

В используемом в настоящем описании смысле термин "атеросклероз" относится к расстройству более крупных артерий, которое лежит в основе большинства болезней коронарных артерий, аневризмы аорты и заболевания артерий нижних конечностей, а также играет основную роль в цереброваскулярном заболевании. Атеросклероз является лидирующей причиной смертности в США, как у людей старше, так и моложе 65 лет обоих полов. E.L. Bierman, "Atherosclerosis and Other Forms of Arteriosclerosis", Ch. 208, p. 1106 в Harrison's Principles of Internal Medicine. 13<sup>th</sup> edition, eds. K.J. Isselbacher, et al. (McGraw-Hill, Inc.

NY 1994). Атеросклероз может поражать любую артерию в организме, включая артерии сердца, головного мозга, рук, ног, таза и почек. Атеросклероз характеризуется инфильтрацией холестерина и появлением вспененных клеток в местах поражений артериальной стенки. Затем следует сложная последовательность изменений, в которые вовлечены тромбоциты, макрофаги, гладкомышечные клетки и факторы роста, которые вызывают пролиферативные поражения. Такие поражения деформируют сосуды и делают их жесткими. У людей с повышенными уровнями холестерина в плазме повышена частота атеросклероза и его осложнений. W.F. Ganong, Review of Medical Physiology, 17<sup>th</sup> edition, p. 281 (Appleton and Lange Norwalk, CT 1995).

В используемом в настоящем описании смысле термин "неоваскуляризация или "ангиогенез" относится к образованию новых кровеносных сосудов от существующих сосудов. Неоваскуляризация имеет место, например, при развитии макулярной дегенерации, опухолей, злокачественной опухоли и атеросклероза.

В используемом в настоящем описании смысле термин "воспалительное расстройство" или "воспалительное заболевание" относится к заболеванию, которое характеризуется воспалением и обычно сопровождается покраснением, опуханием и болью. Воспаление может приводить ко множеству других заболеваний, включая без ограничения сердечно-сосудистое заболевание, ревматоидный артрит, желудочно-кишечное заболевание, нейровоспалительные заболевания (например, рассеянный склероз) и даже злокачественную опухоль (например, карциному желчного пузыря).

В используемом в настоящем описании смысле термин "сердечно-сосудистое заболевание" относится к заболеваниям, в которые вовлечены сердце, кровеносные сосуды (артерии, капилляры и вены) или и то и другое. Примеры сердечнососудистых заболеваний включают без ограничения коронарную болезнь сердца (также ишемическая болезнь сердца или болезнь коронарных артерий), кардиомиопатию, гипертензивную кардиопатию, сердечную недостаточность, легочное сердце, сердечные аритмии, воспалительное заболевание сердца, эндокардит, воспалительную кардиомегалию, миокардит, порок клапана сердца, цереброваскулярное заболевание, болезнь периферических артерий, врожденный порок сердца и ревматическую болезнь сердца.

Термин "терапевтически эффективное количество" относится к количеству антитела, полипептида, полинуклеотида, малой органической молекулы или другого лекарственного средства, эффективному для "лечения" заболевания или расстройства у субъекта или млекопитающего. В случае атеросклероза терапевтически эффективное количество лекарственного средства может замедлять образование атеросклеротических бляшек; снижать, задерживать или останавливать повышение образования новых атеросклеротических бляшек; снижать, подавлять или останавливать воспаление; ингибировать, например, подавлять, задерживать, предотвращать, останавливать или отменять неоваскуляризацию в атеросклеротических бляшках или вблизи них; изменять морфологию или функционирование атеросклеротических бляшек; или в некоторой степени облегчать один или несколько симптомов, ассоциированных с атеросклерозом; снижать заболеваемость и смертность; улучшать качество жизни; или любое сочетание таких эффектов.

Такие термины как "процесс лечения", или "лечение", или "лечить", или "облегчение", или "облегчать" относятся к как к 1) терапевтическим мерам, которые позволяют лечить, замедлять, уменьшать симптомы или отменять и/или останавливать прогрессирование диагностированного патологического состояния или расстройства, так и к 2) профилактическим или превентивным мерам, которые предотвращают и/или замедляют развитие целевого патологического состояния или расстройства. Таким образом, нуждающиеся в лечении включают тех, кто уже имеет расстройство; тех, кто склонен к расстройству; и тех, у которых расстройство необходимо предотвратить. Полезные или желательные клинические результаты включают без ограничения облегчение симптомов, понижение степени заболевания, стабилизацию (т.е. отсутствие ухудшения) заболевания, задержку или замедление прогрессирования заболевания, улучшение или временное облегчение патологического состояния, ремиссию (либо частичную, либо полную), либо регистрируемые, либо не регистрируемые, или любое их сочетание. "Лечение" также может означать продление жизни по сравнению с ожидаемой продолжительностью жизни в случае, если пациент не получает лечения. Нуждающиеся в лечении включают тех, кто уже имеет состояние или расстройство, а также тех, кто склонны к наличию состояния или расстройства, или тех, у кого состояние или расстройство необходимо предотвратить.

Термины "субъект", или "индивидуум", или "животное", или "пациент", или "млекопитающее" означают любого субъекта, в частности млекопитающего, которому требуется диагноз, прогноз или терапия. Млекопитающие включают человека, домашних животных, сельскохозяйственных животных и животных в зоопарке, спортивных животных или комнатных питомцев, таких как собаки, кошки морские свинки, кролики, крысы, мыши, лошади, крупный рогатый скот, коровы, медведи и т.д.

В используемом в настоящем описании смысле такие фразы как "субъект, которому может быть полезно введение анти-SEMA4D-антитела" и "животное, нуждающееся в лечении" включают субъектов, таких как млекопитающие, которым может быть полезно введение анти-SEMA4D-антитела или другой используемой молекулы, связывающей SEMA4D, например, для выявления полипептида SEMA4D (например, для диагностического способа), и/или лечение, т.е. ослабление или предотвращение заболева-

ния, с использованием анти-SEMA4D-антитела или другой молекулы, связывающей SEMA4D.

"Связывающая молекула" или "антигенсвязывающая молекула" согласно настоящему изобретению в наиболее широком смысле относится к молекуле, которая специфично связывает антигенную детерминанту. В одном варианте связывающая молекула специфично связывается с SEMA4D, например с трансмембранным полипептидом SEMA4D с молекулярной массой приблизительно 150 кД или растворимым полипептидом SEMA4D с молекулярной массой приблизительно 120 кД (обычно называемым SSEMA4D). В другом варианте связывающая молекула согласно изобретению представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент. В другом варианте связывающая молекула согласно изобретению содержит по меньшей мере одну CDR тяжелой или легкой цепи молекулы антитела. В другом варианте связывающая молекула согласно изобретению содержит по меньшей мере две CDR из одной или нескольких молекул антител. В другом варианте связывающая молекула согласно изобретению содержит по меньшей мере три CDR из одной или нескольких молекул антител. В другом варианте связывающая молекула согласно изобретению содержит по меньшей мере четыре CDR из одной или нескольких молекул антител. В другом варианте связывающая молекула согласно изобретению содержит по меньшей мере пять CDR из одной или нескольких молекул антител. В другом варианте связывающая молекула согласно изобретению содержит по меньшей мере шесть CDR из одной или нескольких молекул антител.

Настоящее изобретение относится к способу лечения атеросклероза, включающему в себя введение субъекту связывающей анти-SEMA4D-молекулы, например антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, варианта или производного. Если специально не указаны полноразмерные антитела, такие как встречающиеся в природе антитела, термин "анти-SEMA4D-антитело" охватывает полноразмерные антитела, а также антигенсвязывающие фрагменты, варианты, аналоги или производные таких антител, например молекулы встречающихся в природе антител или иммуноглобулинов или сконструированные молекулы антитела или фрагменты, которые связывают антиген подобно молекулам антител.

В используемом в настоящем описании смысле термины "человеческие" или "полностью человеческие" антитела включают антитела, имеющие аминокислотную последовательность иммуноглобулина человека, и включают антитела, выделенные из библиотек иммуноглобулинов человека или из организма животных, трансгенных по одному или нескольким иммуноглобулинам человека, которые описаны выше, и описаны, например, в патенте США № 5939598 Kucherlapati с соавторами. "Человеческие" или "полностью человеческие" антитела также включают антитела, содержащие, по меньшей мере, переменный домен тяжелой цепи или, по меньшей мере, переменные домены тяжелой цепи и легкой цепи, при этом переменный домен(ы) имеет аминокислотную последовательность переменного домена(ов) иммуноглобулина человека или гуманизированных антител.

"Человеческие" или "полностью человеческие" антитела также включают "человеческие" или "полностью человеческие" антитела, которые описаны выше, которые содержат, по существу состоят или состоят из вариантов (включая производные) молекул антител (например, областей VH и/или областей VL), описанных в настоящей публикации, и такие антитела или их фрагменты иммуноспецифично связываются с полипептидом SEMA4D или его фрагментом или вариантом. Стандартные способы, известные специалистам в данной области, можно применять для введения мутаций в нуклеотидную последовательность, кодирующую человеческое анти-SEMA4D-антитело, включая без ограничения сайт-специфичный мутагенез и ПЦР-опосредованный мутагенез, который приводит к аминокислотным заменам. В некоторых аспектах варианты (включая производные) кодируют менее 50 аминокислотных замен, менее 40 аминокислотных замен, менее 30 аминокислотных замен, менее 25 аминокислотных замен, менее 20 аминокислотных замен, менее 15 аминокислотных замен, менее 10 аминокислотных замен, менее 5 аминокислотных замен, менее 4 аминокислотных замен, менее 3 аминокислотных замен или менее 2 аминокислотных замен по сравнению с эталонной областью VH, VHCDR1, VHCDR2, VHCDR3, областью VL, VLCDR1, VLCDR2 или VLCDR3.

В некоторых вариантах аминокислотные замены представляют собой консервативную аминокислотную замену, обсуждаемую далее. Альтернативно мутации могут быть введены случайным образом вдоль всей или части кодирующей последовательности, например посредством насыщающего мутагенеза, и полученные в результате мутанты могут быть подвергнуты скринингу в отношении биологической активности, чтобы идентифицировать мутанты, которые сохраняют активность (например, способность связывать полипептид SEMA4D, например, SEMA4D человека, мыши или человека и мыши). Такие варианты (или их производные) "человеческих" или "полностью человеческих" антител также можно назвать человеческими или полностью человеческими антителами, которые "оптимизированы" или "оптимизированы в отношении связывания антигена", и они включают антитела, которые имеют улучшенную аффинность по отношению к антигену.

Термины "антитело" и "иммуноглобулин" использованы в настоящем описании взаимозаменяемо. Антитело или иммуноглобулин содержит, по меньшей мере, переменный домен тяжелой цепи и в обычно содержит, по меньшей мере, переменные домены тяжелой цепи и легкой цепи. Базовые структуры иммуноглобулинов в системах позвоночных относительно хорошо изучены. См., например, Harlow et al. (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual* (2<sup>nd</sup> ed.; Cold Spring Harbor Laboratory Press).

В используемом в настоящем описании смысле термин "иммуноглобулин" включает различные широкие классы полипептидов, которые можно отличить биохимически. Специалистам в данной области будет понятно, что тяжелые цепи классифицируют как гамма, мю, альфа, дельта или эpsilon, ( $\gamma$ ,  $\mu$ ,  $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ) с некоторыми подклассами среди них (например,  $\gamma 1$ - $\gamma 4$ ). "Класс" антитела как IgG, IgM, IgA IgG или IgE соответственно определяет природа такой цепи. Подклассы иммуноглобулинов (изотипы), например IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и т.д., также хорошо охарактеризованы и, как известно, определяют функциональную специализацию. Модифицированные варианты каждого из таких классов и изотипов легко может отличить специалист в данной области с учетом настоящего описания, и соответственно такие варианты входят в объем настоящего изобретения. Все классы иммуноглобулинов, несомненно, входят в объем настоящего изобретения, а следующее обсуждение, в общем, будет направлено на класс молекул иммуноглобулинов IgG. Что касается IgG, то стандартная молекула иммуноглобулина содержит два идентичных полипептида легкой цепи с молекулярной массой приблизительно 23000 дальтон, и два идентичных полипептида тяжелой цепи с молекулярной массой 53000-70000. Четыре цепи обычно связаны дисульфидными связями в "Y"-конфигурации, при этом легкие цепи охватывают вилкой тяжелые цепи, начиная с горловины "Y" и продолжая на протяжении варибельной области.

Легкие цепи классифицируют либо как каппа, либо как лямбда ( $\kappa$ ,  $\lambda$ ). Тяжелая цепь каждого класса может быть связана с легкой цепью либо каппа, либо лямбда. В общем, легкие и тяжелые цепи ковалентно связаны друг с другом, и "хвостовые" части двух тяжелых цепей связаны друг с другом ковалентными дисульфидными связями или нековалентными связями, когда иммуноглобулины образованы либо гибридами, либо В-клетками, либо генетически сконструированными клетками-хозяевами. В тяжелой цепи аминокислотные последовательности тянутся от N-конца на разветвленных в виде вилки концах Y-конфигурации до C-конца внизу каждой цепи.

И легкие, и тяжелые цепи разделяют на области структурной и функциональной гомологии. Термины "константные" и "варибельные" используют функционально. В этой связи будет понятно, что варибельные домены частей и легкой (VL или VK) и тяжелой (VH) цепей определяют узнавание антигена и специфичность. Наоборот, константные домены легкой цепи (CL) и тяжелой цепи (CH1, CH2 или CH3) придают важные биологические свойства, такие как свойства, определяющие секрецию, прохождение через плаценту, связывание Fc-рецептора, связывание комплемента и тому подобные. Принято, что номера доменов константной области увеличиваются по мере того, как они удаляются от антигенсвязывающего участка или amino-конца антитела. N-концевая часть представляет собой варибельную область, и в C-концевой части находится константная область; домены CH3 и CL фактически содержат карбоксильный конец тяжелой и легкой цепи соответственно.

Как указано выше, варибельная область позволяет антителу избирательно распознавать и специфично связывать эпитопы на антигенах. То есть домен VL и домен VH или подгруппа определяющих комплементарность областей (CDR) в таких варибельных доменах антитела объединяются с образованием варибельной области, которая определяет трехмерный антигенсвязывающий участок. Такая состоящая из четырех частей структура образует антигенсвязывающий участок, присутствующий на конце каждого плеча Y. Более конкретно антигенсвязывающий участок определяется тремя CDR на каждой из VH- и VL-цепей. В некоторых случаях, например в случаях некоторых молекул иммуноглобулинов, полученных от видов верблюдовых или сконструированных на основе иммуноглобулинов верблюдовых, полная молекула иммуноглобулина может состоять только из тяжелых цепей без легких цепей. См., например, Hamers-Casterman et al., Nature 363: 446-448 (1993).

Во встречающихся в природе антителах шесть "определяющих комплементарность областей" или "CDR", присутствующих в каждом антигенсвязывающем домене, представляют собой короткие, состоящие из не смежных участков последовательности аминокислот, которые специфично расположены, образуя антигенсвязывающий домен, когда антитело приобретает свою трехмерную конфигурацию в водной среде. Остальная часть аминокислот в антигенсвязывающих доменах, называемых "каркасными" областями, проявляет меньшую межмолекулярную варибельность. Каркасные области преимущественно принимают конформацию  $\beta$ -слоев, и CDR образуют петли, которые связаны и в некоторых случаях образуют часть структуры  $\beta$ -слоя. Таким образом, каркасные области действуют, образуя каркас, который обеспечивает расположение CDR в правильной ориентации за счет межцепочечных нековалентных взаимодействий. Антигенсвязывающий домен, образованный определенным образом расположенными CDR, определяет комплементарность поверхности эпитопу на иммунореактивном антигене. Такая комплементарная поверхность стимулирует нековалентное связывание антитела с его родственным эпитопом. Аминокислоты, составляющие CDR и каркасные области соответственно, легко могут быть идентифицированы для любого данного варибельного домена тяжелой или легкой цепи специалистов в данной области, так как они были точно определены (см. ниже).

В случае когда имеется два или более определений термина, который используется и/или принят в данной области, предполагается, что определение термина в используемом в настоящем описании смысле включает все такие значения, если специально не указано противоположное. Конкретным примером является использование термина "определяющая комплементарность область" ("CDR") для описания

состоящих из не смежных частей антигенсвязывающих участков, встречающихся в вариабельной области полипептидов как тяжелых, так и легких цепей. Такая особая область была описана Kabat с соавторами (1983) в U.S. Dept. of Health and Human Services, "Sequence of Proteins of Immunological Interest" и Chothia и Lesk в J. Mol. Biol. 196: 901-917 (1987), указанные публикации включены в настоящее описание в виде ссылки, где определения включают перекрытия или подгруппы аминокислотных остатков при сравнении друг с другом. Тем не менее, предполагается, что применение любого из определений по отношению к CDR антитела или его вариантов входит в объем термина, который определен и использован в настоящем описании. Соответствующие аминокислотные остатки, которые охватывают CDR, которые определены в соответствии с каждой из указанных выше публикаций, представлены ниже в табл. 1 в виде сравнения. Точные номера остатков, которые охватывают конкретную CDR, будут варьировать в зависимости от последовательности и размера CDR. Специалисты в данной области могут обычным способом определить, какие остатки составляют конкретную CDR, имея аминокислотную последовательность вариабельной области антитела.

Таблица 1. Определения границ CDR<sup>1</sup>

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

<sup>1</sup>Нумерация в определениях границ всех CDR в табл. 1 соответствует способу нумерации, указанному Kabat с соавторами (см. ниже)

Kabat с соавторами также определили систему нумерации для последовательностей вариабельных доменов, которая применима к любому антителу. Специалист в данной области может однозначно отнести такую систему "нумерации по Кабату" к любой последовательности вариабельного домена независимо от каких-либо экспериментальных данных помимо самой последовательности. В используемом в настоящем описании смысле "нумерация по Кабату" относится к системе нумерации, описанной в публикации Kabat et al. (1983) U.S. Dept. of Health and Human Services, "Sequence of Protins of Immunological Interest". Если специально не указано иное, ссылка на нумерацию конкретных положений аминокислотных остатков в анти-SEMA4D-антителе или его антигенсвязывающем фрагменте, варианте или производном согласно настоящему изобретению приводится в соответствии с системой нумерации по Кабату.

Антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, варианты или производные согласно изобретению включают без ограничения поликлональные, моноклональные, полиспецифичные и биспецифичные антитела, в которых по меньшей мере одно плечо специфично по отношению к SEMA4D, человеческие, гуманизированные, приматизированные или химерные антитела, одноцепочечные антитела, связывающие эпитоп фрагменты, например Fab, Fab' и F(ab')<sub>2</sub>, Fd, Fv, одноцепочечные Fv (scFv), связанные дисульфидными связями Fv (sdFv) фрагменты, содержащие либо VL-, либо VH-домен, фрагменты, полученные в экспрессирующей библиотеке Fab, и антиидиотипические (анти-Id) антитела (включая, например, анти-Id-антитела к анти-SEMA4D-антителам, описанным в настоящей публикации). Молекулы scFv известны в данной области и описаны, например, в патенте США №5892019. Молекулы иммуноглобулинов или антител согласно изобретению могут быть любого типа (например, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA и IgY), класса (например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и IgA2 и т.д.) или подкласса молекул иммуноглобулинов.

В используемом в настоящем описании смысле термин "часть тяжелой цепи" включает аминокислотные последовательности, полученные из тяжелой цепи иммуноглобулина. В некоторых вариантах полипептид, содержащий часть тяжелой цепи, содержит по меньшей мере один из следующих доменов: VH-домен, CH1-домен, шарнирный домен (например, верхнюю, среднюю и/или нижнюю область шарнира), CH2-домен, CH3-домен, или их вариант, или фрагмент. Например, связывающий полипептид для применения в настоящем изобретении может содержать полипептидную цепь, содержащую CH1-домен; полипептидную цепь, содержащую CH1-домен, по меньшей мере часть шарнирного домена и CH2-домен; полипептидную цепь, содержащую CH1-домен и CH3-домен; полипептидную цепь, содержащую CH1-домен, по меньшей мере часть шарнирного домена и CH3-домен, или полипептидную цепь, содержащую CH1-домен, по меньшей мере часть шарнирного домена, CH2-домен и CH3-домен. В другом варианте полипептид согласно изобретению содержит полипептидную цепь, содержащую CH3-домен. Кроме того, в связывающем полипептиде для применения в изобретении может отсутствовать по меньшей мере часть CH2-домена (например, весь или часть CH2-домена). Как указано выше, специалисту в данной области будет понятно, что такие домены (например, части тяжелой цепи) могут быть модифи-

цированы так, что они будут варьировать по аминокислотной последовательности в сравнении со встречающейся в природе молекулой иммуноглобулина.

В некоторых анти-SEMA4D-антителах или их антигенсвязывающих фрагментах, вариантах или производных, раскрытых в настоящем описании, части тяжелой цепи одной полипептидной цепи мультимера идентичны таким частям во второй полипептидной цепи мультимера. Альтернативно содержащиеся части тяжелой цепи мономеры согласно изобретению являются не идентичными. Например, разные мономеры могут содержать разные сайты связывания мишени, образуя, например, биспецифичное антитело.

Части тяжелой цепи связывающей молекулы для применения в способах, раскрытых в настоящем описании, могут быть получены из разных молекул иммуноглобулинов. Например, часть тяжелой цепи полипептида может содержать CH1-домен, полученный из молекулы IgG1, и шарнирную область, полученную из молекулы IgG3. В другом примере часть тяжелой цепи может содержать шарнирную область, полученную частично из молекулы IgG1 и частично из молекулы IgG3. В другом примере часть тяжелой цепи может содержать химерный шарнир, полученный частично из молекулы IgG1 и частично из молекулы IgG4.

В используемом в настоящем описании смысле термин "часть легкой цепи" включает аминокислотные последовательности, полученные из легкой цепи иммуноглобулина, например легкой цепи каппа и лямбда. В одном аспекте часть легкой цепи содержит по меньшей мере один из доменов VL или CL.

Анти-SEMA4D-антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, варианты или производные, раскрытые в настоящем описании, могут быть описаны или определены на основе эпитопа(ов) или части(ей) антигена, например полипептида-мишени, раскрытого в настоящем описании (например, SEMA4D), который они могут распознавать или специфично связывать. Часть полипептида-мишени, которая специфично взаимодействует с антигенсвязывающим доменом антитела, представляет собой "эпитоп" или "антигенную детерминанту". Полипептид-мишень может содержать один эпитоп, но обычно содержит по меньшей мере два эпитопа, и может включать в себя любое количество эпитопов, в зависимости от размера, конформации и типа антигена. Кроме того, следует отметить, что "эпитоп" в полипептиде-мишени может представлять собой или может включать в себя неполипептидные элементы, например, эпитоп может содержать углеводную боковую цепь.

Полагают, что минимальный размер пептидного или полипептидного эпитопа для антитела составляет приблизительно от четырех до пяти аминокислот. Пептидные или полипептидные эпитопы могут содержать по меньшей мере семь, по меньшей мере девять или по меньшей мере приблизительно от 15 до 30 аминокислот. Так как CDR может узнавать антигенный пептид или полипептид в его третичной форме, то аминокислоты, составляющие эпитоп, не должны непрерывно следовать друг за другом и в некоторых случаях могут находиться в двух или более разных пептидных цепях. Пептидный или полипептидный эпитоп, узнаваемый анти-SEMA4D-антителами согласно настоящему изобретению, может содержать последовательность, состоящую по меньшей мере из 4, по меньшей мере из 5, по меньшей мере из 6, по меньшей мере из 7, по меньшей мере из 8, по меньшей мере из 9, по меньшей мере из 10, по меньшей мере из 15, по меньшей мере из 20, по меньшей мере из 25, или приблизительно от 15 до приблизительно 30 непрерывно следующих друг за другом или не следующих непрерывно друг за другом аминокислот SEMA4D.

Под термином "специфично связывает" обычно подразумевают, что антитело связывается с эпитопом посредством своего антигенсвязывающего домена и что связывание влечет за собой некоторую комплементарность между антигенсвязывающим доменом и эпитопом. Согласно такому определению говорят, что антитело "специфично связывается" с эпитопом, когда оно связывается с таким эпитопом посредством своего антигенсвязывающего домена более легко, чем могло бы связываться со случайным, неродственным эпитопом. Термин "специфично" использован в настоящем описании для определения относительной аффинности, с которой определенное антитело связывается с определенным эпитопом. Например, полагают, что антитело "А" может иметь более высокую специфичность по отношению к данному эпитопу, чем антитело "В", или можно говорить, что антитело "А" связывается с эпитопом "С" с более высокой специфичностью, чем с родственным эпитопом "D".

Под термином "предпочтительно связывается" подразумевают, что антитело специфично связывается с эпитопом более легко, чем оно могло бы связываться с родственным, сходным, гомологичным или аналогичным эпитопом. Таким образом, антитело, которое "предпочтительно связывается" с данным эпитопом, может более вероятно связываться с таким эпитопом, чем с родственным эпитопом, даже несмотря на то, что такое антитело может перекрестно взаимодействовать с родственным эпитопом.

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



В другом неограничивающем примере можно считать, что антитело связывает первый эпитоп предпочтительно, если оно связывает первый эпитоп с константой скорости распада ( $k(\text{off})$ ), которая меньше, чем  $k(\text{off})$  антитела для второго эпитопа. В другом неограничивающем примере можно считать, что антитело связывает первый эпитоп предпочтительно, если оно связывает первый эпитоп с аффинностью, которая по меньшей мере на один порядок величины меньше, чем  $k(\text{off})$  антитела для второго эпитопа. В другом неограничивающем примере можно считать, что антитело связывает первый эпитоп предпочтительно, если оно связывает первый эпитоп с аффинностью, которая по меньшей мере на два порядка величин меньше, чем  $k(\text{off})$  антитела для второго эпитопа. Можно сказать, что антитело или антигенсвязывающий фрагмент, вариант или производное, раскрытые в настоящем описании, связывают полипептид-мишень, раскрытый в настоящем описании (например, SEMA4D, например, SEMA4D человека, мыши или и человека, и мыши), или его фрагмент, или вариант с константой скорости распада ( $k(\text{off})$ ), меньшей или равной  $5 \times 10^{-2} \text{ c}^{-1}$ ,  $10^{-2} \text{ c}^{-1}$ ,  $5 \times 10^{-3} \text{ c}^{-1}$  или  $10^{-3} \text{ c}^{-1}$ . В некоторых аспектах можно сказать, что антитело согласно изобретению связывает полипептид-мишень, раскрытый в настоящем описании (например, SEMA4D, например, SEMA4D человека, мыши или и человека, и мыши), или его фрагмент, или вариант с константой скорости распада ( $k(\text{off})$ ), меньшей или равной  $5 \times 10^{-4} \text{ c}^{-1}$ ,  $10^{-4} \text{ c}^{-1}$ ,  $5 \times 10^{-5} \text{ c}^{-1}$  или  $10^{-5} \text{ c}^{-1}$ ,  $5 \times 10^{-6} \text{ c}^{-1}$ ,  $10^{-6} \text{ c}^{-1}$ ,  $5 \times 10^{-7} \text{ c}^{-1}$  или  $10^{-7} \text{ c}^{-1}$ .

Можно сказать, что антитело или антигенсвязывающий фрагмент, вариант или производное, раскрытые в настоящем описании, связывают полипептид-мишень, раскрытый в настоящем описании (например, SEMA4D, например, SEMA4D человека, мыши или и человека, и мыши), или его фрагмент, или вариант с константой скорости образования комплекса ( $k(\text{on})$ ), большей или равной  $10^3 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$ ,  $5 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$ ,  $10^4 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$  или  $5 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$ . В некоторых аспектах можно сказать, что антитело согласно изобретению связывает полипептид-мишень, раскрытый в настоящем описании (например, SEMA4D, например, SEMA4D человека, мыши или и человека, и мыши), или его фрагмент, или вариант с константой скорости образования комплекса ( $k(\text{on})$ ) большей или равной  $10^5 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$ ,  $5 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$ ,  $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$ , или  $5 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$ , или  $10^7 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$ .

Говорят, что антитело конкурентно ингибирует связывание эталонного антитела с данным эпитопом, если оно предпочтительно связывается с таким эпитопом в такой степени, что оно блокирует в некоторой степени связывание эталонного антитела с эпитопом. Конкурентное ингибирование можно определить любым способом, известным в данной области, например в анализах конкурентного ELISA. Можно сказать, что антитело конкурентно ингибирует связывание эталонного антитела с данным эпитопом по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 60% или по меньшей мере на 50%.

В используемом в настоящем описании смысле термин "аффинность" относится к мере силы связывания отдельного эпитопа с CDR молекулы иммуноглобулина. См., например, Harlow et al. (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed.), страницы 27-28. В используемом в настоящем описании смысле термин "авидность" относится к общей стабильности комплекса между популяцией иммуноглобулинов и антигеном, то есть силе функционального связывания смеси иммуноглобулинов с антигеном. См., например, публикацию Harlow на страницах 29-34. Авидность связана как с аффинностью отдельных молекул иммуноглобулинов в популяции по отношению к конкретным эпитопам, так и с валентностью иммуноглобулинов и антигена. Например, взаимодействие между бивалентным моноклональным антителом и антигеном со структурой эпитопа, имеющей высокую степень повторяемости, такой как полимер, может быть взаимодействием с высокой авидностью.

Анти-SEMA4D-антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, варианты или производные согласно изобретению также могут быть описаны или определены с точки зрения их перекрестной реактивности. В используемом в настоящем описании смысле термин "перекрестная реактивность" относится к способности антитела, специфичного по отношению к одному антигену, взаимодействовать со вторым антигеном; мере родства между двумя разными антигенными веществами. Таким образом, антитело перекрестно взаимодействует, если оно связывается с другим эпитопом, отличным от эпитопа, который индуцировал его образование. Перекрестно реактивный эпитоп, в общем, содержит много тех же самых комплементарных структурных признаков, как и индуцирующий эпитоп, и в некоторых случаях может фактически лучше подходить, чем оригинал.

Например, некоторые антитела имеют некоторую степень перекрестной реактивности, в том смысле, что они связывают родственные, но не идентичные эпитопы, например эпитопы по меньшей мере с 95%, по меньшей мере с 90%, по меньшей мере с 85%, по меньшей мере с 80%, по меньшей мере с 75%, по меньшей мере с 70%, по меньшей мере с 65%, по меньшей мере с 60%, по меньшей мере с 55% и по меньшей мере с 50% идентичностью (которую вычисляют, используя способы, известные в данной области и описанные в настоящей публикации) по отношению с эталонному эпитопу. Можно сказать, что антитело обладает небольшой или не имеет перекрестной реактивности, если оно не связывает эпитопы с менее чем 95%, менее чем 90%, менее чем 85%, менее чем 80%, менее чем 75%, менее чем 70%, менее чем 65%, менее чем 60%, менее чем 55% и менее чем 50% идентичностью (которую вычисляют, используя способы, известные в данной области и описанные в настоящей публикации) с эталонным эпитопом.

Антитело можно считать "высоко специфичным" в отношении в определенном эпитопу, если он не связывает какой-либо другой аналог, ортолог или гомолог данного эпитопа.

Связывающие анти-SEMA4D-молекулы, например антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, варианты или производные согласно изобретению также могут быть описаны или определены в отношении аффинности их связывания с полипептидом согласно изобретению, например SEMA4D, например SEMA4D человека, мыши или и человека, и мыши. Аффинности связывания могут включать аффинности с константой диссоциации или  $K_d$  менее чем  $5 \times 10^{-2}$  М,  $10^{-2}$  М,  $5 \times 10^{-3}$  М,  $10^{-3}$  М,  $5 \times 10^{-4}$  М,  $10^{-4}$  М,  $5 \times 10^{-5}$  М,  $10^{-5}$  М,  $5 \times 10^{-6}$  М,  $10^{-6}$  М,  $5 \times 10^{-7}$  М,  $10^{-7}$  М,  $5 \times 10^{-8}$  М,  $10^{-8}$  М,  $5 \times 10^{-9}$  М,  $10^{-9}$  М,  $5 \times 10^{-10}$  М,  $10^{-10}$  М,  $5 \times 10^{-11}$  М,  $10^{-11}$  М,  $5 \times 10^{-12}$  М,  $10^{-12}$  М,  $5 \times 10^{-13}$  М,  $10^{-13}$  М,  $5 \times 10^{-14}$  М,  $10^{-14}$  М,  $5 \times 10^{-15}$  М или  $10^{-15}$  М. В некоторых вариантах связывающая анти-SEMA4D-молекула, например антитело или его антигенсвязывающий фрагмент согласно изобретению, связывает SEMA4D человека с  $K_d$  приблизительно от  $5 \times 10^{-9}$  до приблизительно  $6 \times 10^{-9}$ . В другом варианте связывающая анти-SEMA4D-молекула, например антитело или его антигенсвязывающий фрагмент согласно изобретению, связывает SEMA4D мыши с  $K_d$  приблизительно от  $1 \times 10^{-9}$  до приблизительно  $2 \times 10^{-9}$ .

В используемом в настоящем описании смысле термин "химерное антитело" будет означать любое антитело, в котором иммунореактивная область или участок получен или происходит от первого вида, а константная область (которая может быть интактной, неполной или модифицированной согласно настоящему изобретению) получена от второго вида. В некоторых вариантах область или участок связывания мишени будет из источника, отличного от организма человека (например, мыши или примата), а константная область является человеческой.

В используемом в настоящем описании смысле термин "сконструированное антитело" относится к антителу, в котором варибельный домен либо в тяжелой, либо в легкой, либо в обеих цепях изменен, по меньшей мере, частичной заменой одной или нескольких CDR в сравнении с антителом с известной специфичностью и при необходимости частичной заменой и изменением последовательности в каркасной области. Хотя CDR могут быть получены из антитела того же класса или даже подкласса, что и антитело, из которого получены каркасные области, предполагается, что CDR будут получены из антитела другого класса, например из антитела от другого вида. Сконструированное антитело, в котором одна или несколько "донорных" CDR из антитела животного, отличного от человека с известной специфичностью, привиты в каркасную область тяжелой и легкой цепи человека, называют в настоящем описании "гуманизированным антителом". В некоторых вариантах не обязательно заменять все CDR полными CDR из донорного варибельного домена, чтобы перенести способность к связыванию антигена одного варибельного домена к другому. Напротив, можно перенести только такие остатки, которые необходимы для поддержания активности участка связывания мишени.

Кроме того, известно, что каркасные области в варибельном домене в тяжелой или легкой цепи или в обеих цепях гуманизированного антитела могут содержать только остатки человеческого происхождения, и в таком случае такие каркасные области гуманизированного антитела называют "полностью человеческими каркасными областями" (например, мАТ VX15/2503, описанное в публикации заявки на выдачу патента США № US 2010/0285036 A1 в виде мАТ 2503, при этом публикация включена в настоящее описание в виде ссылки в полном объеме). Альтернативно один или несколько остатков каркасной области(ей) донорного варибельного домена могут быть сконструированы в соответствующем положении каркасной области(ей) человека варибельного домена в тяжелой или легкой цепи или в обеих цепях гуманизированного антитела, если это необходимо для того, чтобы сохранить правильное связывание или усилить связывание с антигеном SEMA4D. Человеческая каркасная область, которая была сконструирована таким образом, может при этом содержать смесь человеческих и донорных каркасных остатков, и ее называют в настоящем описании "частично человеческой каркасной областью".

Например, гуманизацию анти-SEMA4D-антитела можно, по существу, осуществить, следуя способу Winter и соавторов (Jones et al., Nature 321: 522-525 (1986); Riechmann et al., Nature 332:323-327 (1988); Verhoeven et al., Science 239: 1534-1536 (1988)), путем замены CDR грызунов или мутантными CDR грызунов, или последовательностями CDR соответствующих последовательностей анти-SEMA4D-антитела человека. См. также патенты США № 5225539, 5585089, 5693761, 5693762, 5859205, включенные в настоящее описание в виде ссылки. Полученное в результате гуманизированное анти-SEMA4D-антитело может содержать по меньшей мере одну CDR грызуна или мутантную CDR грызуна в полностью человеческих каркасных областях варибельного домена тяжелой и/или легкой цепи гуманизированного антитела. В некоторых случаях остатки в каркасных областях одного или нескольких варибельных доменов гуманизированного анти-SEMA4D-антитела заменяют соответствующими остатками животного, отличного от человека (например, грызуна) (см., например, патенты США № 5585089, 5693761, 5693762 и 6180370), и в таком случае полученное в результате гуманизированное анти-SEMA4D-антитело может содержать частично человеческие каркасные области в варибельном домене тяжелой и/или легкой цепи.

Кроме того, гуманизированные антитела могут содержать остатки, которые не встречаются ни в реципиентном антителе, ни в донорном антителе. Такие модификации осуществляют для дополнительного улучшения эффективности антитела (например, чтобы получить требуемую аффинность). В общем, гу-

манизованное антитело будет содержать по существу все из по меньшей мере одного и обычно двух переменных доменов, в которых все или по существу все CDR соответствуют CDR иммуноглобулина животного, отличного от человека, и все или по существу все каркасные области представляют собой каркасные области из последовательности иммуноглобулина человека. Гуманизированное антитело обязательно также будет содержать по меньшей мере часть константной области иммуноглобулина (Fc), обычно иммуноглобулина человека. Более подробные детали см. в публикациях Jones et al., *Nature* 331: 522-525 (1986); Riechmann et al., *Nature* 332: 323-329 (1988) и Presta, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2: 593-596 (1992), которые включены в настоящее описание в виде ссылки. Соответственно такие "гуманизированные" антитела могут включать антитела, в которых значительно меньшая часть, чем интактный переменный домен человека, была заменена соответствующей последовательностью вида, отличного от человека. На практике гуманизированные антитела обычно представляют собой человеческие антитела, в которых некоторые остатки CDR и, возможно, некоторые каркасные остатки заменены остатками из аналогичных участков антител грызунов. См., например, патенты США № 5225539, 5585089, 5693761, 5693762, 5859205. См. также патент США № 6180370 и международную публикацию № WO 01/27160, в которых раскрыты гуманизированные антитела и способы получения гуманизированных антител, имеющих улучшенную аффинность по отношению к предварительно определяемому антигену.

## II. Описание полипептида-мишени.

В используемом в настоящем описании смысле термины "семафорин-4D", "SEMA4D" и "полипептид SEMA4D" используют взаимозаменяемо, как и "SEMA4D" и "Sema4D". В некоторых вариантах SEMA4D экспрессируется на поверхности или секретируется клеткой. В другом варианте SEMA4D связан с мембраной. В других вариантах SEMA4D является растворимым, например, SSEMA4D. В других вариантах SEMA4D может включать полноразмерный SEMA4D или его фрагмент или вариант полипептида SEMA4D, при этом фрагмент SEMA4D или вариант полипептида SEMA4D сохраняет некоторые или все функциональные свойства полноразмерного SEMA4D.

Полноразмерный белок SEMA4D человека представляет собой гомодимерный трансмембранный белок, состоящий из двух полипептидных цепей с молекулярной массой 150 кД. SEMA4D относится к семафориновому семейству рецепторов клеточной поверхности и также называется CD100. SEMA4D/Sema4D человека и мыши протеолитически отщепляются от своей трансмембранной формы с образованием растворимых форм 120 кД, что свидетельствует о существовании двух изоформ Sema4D (Kumanogoh et al., *J. Cell Science* 116(7): 3464 (2003)). Семафорины состоят из растворимых и связанных с мембранами белков, которые исходно были определены как факторы проведения по аксонам во время развития, которые играют важную роль в установлении точных связей между нейронами и их соответствующей мишенью. Структурно считаемый семафорин класса IV, SEMA4D состоит из аминоконцевой сигнальной последовательности, за которой следует характерный домен "Sema", который состоит из 17 консервативных остатков цистеина, Ig-подобный домен, богатый лизином участок, гидрофобная трансмембранная область и цитоплазматический хвост.

Каждая полипептидная цепь SEMA4D содержит сигнальную последовательность длиной приблизительно 13 аминокислот, за которой следует домен семафорина длиной приблизительно 512 аминокислот, иммуноглобулин-подобный (Ig-подобный) домен длиной приблизительно 65 аминокислот, богатый лизином участок длиной 104 аминокислоты, гидрофобная трансмембранная область длиной приблизительно 19 аминокислот и цитоплазматический хвост длиной 110 аминокислот. Консенсусный участок для фосфорилирования тирозина в цитоплазматическом хвосте подтверждает предполагаемую ассоциацию SEMA4D с тирозинкиназой (Schlossman, et al., Eds. (1995) *Leucocyte Typing V* (Oxford University Press, Oxford).

Известно, что SEMA4D имеет по меньшей мере три функциональных рецептора, плексин-B1, плексин-B2 и CD72. Один из рецепторов, плексин-B1, экспрессируется в нелимфоидных тканях и, как было показано, является высокоаффинным (1 нМ) рецептором для SEMA4D (Tamagnone et al., *Cell* 99: 71-80 (1999)). Было показано, что стимуляция под действием SEMA4D передачи сигнала плексина-B1 индуцирует коллапс конусов роста нейронов и индуцирует коллапс удлинения отростков и апоптоз олигодендроцитов (Giraudon et al., *J. Immunol.* 172: 1246-1255 (2004); Giraudon et al., *NeuroMolecular Med.* 7: 207-216 (2005)). После связывания с SEMA4D передача сигнала плексина-B1 опосредует инактивацию R-Ras, приводя к снижению опосредованного интегрином связывания с внеклеточным матриксом, а также активацию RhoA, приводя к реорганизации цитоскелета и клеточной миграции. См. Kruger et al., *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 6: 789-800 (2005); Pasterkamp, *TRENDS in Cell Biology* 15: 61-64 (2005)). С другой стороны, плексин-B2 обладает промежуточной аффинностью по отношению к SEMA4D, и в недавнем сообщении показано, что плексин-B2 экспрессируется на кератиноцитах и активирует SEMA4D-позитивные Т-клетки  $\gamma\delta$ , внося вклад в репарацию эпителия (Witherden et al., *Immunity.* 2012 Aug 24;37 (2):314-25).

В лимфоидных тканях CD72 используется как низкоаффинный (300 нМ) рецептор SEMA4D (Kumanogoh et al., *Immunity* 13: 621-631 (2000)). В-клетки и АПК экспрессируют CD72, и анти-CD72-антитела имеют много эффектов, сходных с эффектами SSEMA4D, таких как усиление CD40-индуцированных В-клеточных ответов и сбрасывание В-клетками CD23. Считается, что CD72 действует в качестве негативного регулятора В-клеточных ответов за счет привлечения тирозинфосфатазы SHP-1,

которая может ассоциировать со многими ингибирующими рецепторами. Взаимодействие SEMA4D с CD72 приводит к диссоциации SHP-1 и утрате такого негативного сигнала активации. Было показано, что SEMA4D способствует стимуляции Т-клеток и агрегации и жизнеспособности В-клеток *in vitro*. Добавление SEMA4D-экспрессирующих клеток или sSEMA4D усиливает CD40-индуцированную пролиферацию В-клеток и продукцию иммуноглобулина *in vitro* и усиливает гуморальные ответы *in vivo* (Ishida et al., *Inter. Immunol.* 15: 1027-1034 (2003); Kumanogoh and H. Kikutani, *Trends in Immunol.* 22: 670-676 (2001)). SSEMA4D усиливает CD40-индуцированное созревание ДК, включая повышающую регуляцию костимулирующих молекул и повышенную секрецию IL-12. Кроме того, sSEMA4D может ингибировать миграцию иммунных клеток, что может быть обратимо при добавлении блокирующих анти-SEMA4D-антител (Elhabazi et al., *J. Immunol.* 166: 4341-4347 (2001); Delaire et al., *J. Immunol.* 166: 4348-4354 (2001)).

Sema4D экспрессируется на высоких уровнях в лимфоидных органах, включая селезенку, тимус и лимфатические узлы, и в нелимфоидных органах, таких как головной мозг, сердце и почки. В лимфоидных органах SEMA4D обильно экспрессируется на покоящихся Т-клетках и только слабо экспрессируется на покоящихся В-клетках и антигенпрезентирующих клетках (АПК), таких как дендритные клетки (ДК). Активация клеток повышает поверхностную экспрессию SEMA4D, а также образование растворимого SEMA4D (sSEMA4D).

Картина экспрессии SEMA4D свидетельствует, что он играет важную физиологическую, а также патологическую роль в иммунной системе. Было показано, что SEMA4D стимулирует активацию, агрегацию и жизнеспособность В-клеток; усиливает CD40-индуцированную пролиферацию и продукцию антител; усиливает гуморальный ответ на зависимые от Т-клеток антигены; повышает пролиферацию Т-клеток; усиливает созревание дендритных клеток и способность стимулировать Т-клетки; и непосредственно вовлечен в демиелинизацию и дегенерацию аксонов (Shi et al., *Immunity* 13: 633-642 (2000); Kumanogoh et al., *J. Immunol.* 169: 1175-1181 (2002); и Watanabe et al., *J. Immunol.* 167: 4321-4328 (2001)).

На мышцах с нокаутом SEMA4D (SEMA4D<sup>-/-</sup>) было получено дополнительное свидетельство того, что SEMA4D играет важную роль как в гуморальном, так и клеточном иммунных ответах. У мышцей SEMA4D<sup>-/-</sup> нет основных известных аномалий нелимфоидных тканей. Дендритные клетки (ДК) от мышцей SEMA4D<sup>-/-</sup> обладают плохой аллостимулирующей способностью и имеют нарушения экспрессии костимулирующих молекул, которые могут быть восстановлены при добавлении sSEMA4D. У мышцей с недостаточностью SEMA4D (SEMA4D<sup>-/-</sup>) не может развиваться экспериментальный аутоиммунный энцефаломиелит, индуцированный пептидом гликопротеида олигодендроцитов, образующих миелин, поскольку Т-клетки, специфичные к гликопротеиду образующих миелин олигодендроцитов слабо образуются в отсутствие SEMA4D (Kumanogoh et al., *J. Immunol.* 169: 1175-1181 (2002)). Значительное количество растворимого SEMA4D также выявляется в сыворотке склонных к аутоиммунитету мышцей MRL/lpr (модель системных аутоиммунных заболеваний, таких как СКВ), но не у нормальных мышцей. Кроме того, уровни sSEMA4D коррелируют с уровнями аутоантител и повышаются с возрастом (Wang et al., *Blood* 97: 3498-3504 (2001)). Также показано, что SEMA4D накапливается в спинномозговой жидкости и в сыворотке пациентов с демиелинизирующим заболеванием, и sSEMA4D индуцирует апоптоз плирупотентных предшественников нейронов человека (клеток Dev), ингибирует удлинение отростков и индуцирует апоптоз олигодендроцитов крыс *in vitro* (Giraudon et al., *J. Immunol.* 172(2): 1246-1255 (2004)). Такой апоптоз блокировался анти-SEMA4D-мАт.

### III. Анти-SEMA4D-антитела.

Антитела, которые связывают SEMA4D, были описаны в данной области. См., например, публикации патентов США № 2008/0219971 A1, US 2010/0285036 A1 и US 2006/0233793 A1, международные заявки на выдачу патента WO 93/14125, WO 2008/100995 и WO 2010/129917 и Herold et al., *Int. Immunol.* 7(1): 1-8 (1995), при этом каждая из публикаций включена в настоящее описание в виде ссылки в полном объеме.

Настоящее описание в общем относится к способу лечения атеросклероза у субъекта, имеющего воспалительное расстройство, например у больного человека, включающему в себя введение антитела, которое специфично связывается с SEMA4D, или его антигенсвязывающего фрагмента, варианта или производного. В некоторых вариантах антитело блокирует взаимодействие SEMA4D с одним или несколькими его рецепторами, например плексином-В1. Анти-SEMA4D-антитела, обладающие такими свойствами, можно применять в способах, предлагаемых в настоящем изобретении. Антитела, которые можно использовать, включают без ограничения мАт VX15/2503, 67 и 76 и их антигенсвязывающие фрагменты, варианты или производные, которые полно описаны в US 2010/0285036 A1. Дополнительные антитела, которые можно использовать в способах, предлагаемых в настоящем изобретении, включают антитела BD16 и BB18, описанные в US 2006/0233793 A1, а также их антигенсвязывающие фрагменты, варианты или производные; или любое из мАт 301, мАт 1893, мАт 657, мАт 1807, мАт 1656, мАт 1808, мАт 59, мАт 2191, мАт 2274, мАт 2275, мАт 227 6, мАт 2277, мАт 227 8, мАт 227 9, мАт 2280, мАт 2281, мАт 2282, мАт 2283, мАт 2284 и мАт 2285, а также их любые фрагменты, варианты или производные, которые описаны в US 2008/0219971 A1. В некоторых вариантах анти-SEMA4D-антитело для применения в способах, предлагаемых в настоящем изобретении, связывают SEMA4D человека, мыши или и че-

ловека, и мышцы. Также применимы антитела, которые связываются с тем же самым эпитопом, что и любое из вышеуказанных антител и/или антител, которые конкурентно ингибируют любое из указанных выше антител. В некоторых вариантах анти-SEMA4D-антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, вариант или производное, применимые в способах, предлагаемых в настоящем изобретении, имеет аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере приблизительно 80%, приблизительно 85%, приблизительно 88%, приблизительно 89%, приблизительно 90%, приблизительно 91%, приблизительно 92%, приблизительно 93%, приблизительно 94% или приблизительно 95% идентичность последовательности с аминокислотной последовательностью молекулы эталонного анти-SEMA4D-антитела, например, как описано выше. В следующем варианте связывающая молекула имеет по меньшей мере приблизительно 96%, приблизительно 97%, приблизительно 98%, приблизительно 99% или 100% идентичность последовательности с эталонным антителом.

В другом варианте анти-SEMA4D-антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, вариант или производное, применимое в способах, предлагаемых в настоящем изобретении, содержит, по существу состоит или состоит из варибельного домена тяжелой цепи иммуноглобулина (VH-домена), при этом по меньшей мере одна из CDR VH-домена имеет аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере приблизительно на 80%, приблизительно на 85%, приблизительно на 90%, приблизительно на 95%, приблизительно на 96%, приблизительно на 97%, приблизительно на 98%, приблизительно на 99% идентична CDR1, CDR2 или CDR3 последовательностей SEQ ID NO: 9 или 10.

В другом варианте анти-SEMA4D-антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, вариант или производное, применимое в способах, предлагаемых в настоящем изобретении, содержит, по существу состоит или состоит из варибельного домена тяжелой цепи иммуноглобулина (VH-домена), в котором по меньшей мере одна из CDR VH-домена имеет аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере приблизительно на 80%, приблизительно на 85%, приблизительно на 90%, приблизительно на 95%, приблизительно на 96%, приблизительно на 97%, приблизительно на 98%, приблизительно на 99% идентична последовательностям SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7 или SEQ ID NO: 8.

В другом варианте анти-SEMA4D-антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, вариант или производное, применимое в способах, предлагаемых в настоящем изобретении, содержит, по существу состоит или состоит из варибельного домена тяжелой цепи иммуноглобулина (VH-домена), при этом по меньшей мере одна из CDR VH-домена имеет аминокислотную последовательность, идентичную, за исключением 1, 2, 3, 4 или 5 консервативных аминокислотных замен, последовательности SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7 или SEQ ID NO: 8.

В другом варианте анти-SEMA4D-антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, вариант или производное, применимое в способах, предлагаемых в настоящем изобретении, содержит, по существу состоит или состоит из VH-домена, который имеет аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере приблизительно на 80%, приблизительно на 85%, приблизительно на 90%, приблизительно на 91%, приблизительно на 92%, приблизительно на 93%, приблизительно на 94%, приблизительно на 95%, приблизительно на 96%, приблизительно на 97%, приблизительно на 98%, приблизительно на 99% или на 100% идентична последовательности SEQ ID NO: 9 или SEQ ID NO: 10, при этом анти-SEMA4D-антитело содержащее кодируемый VH-домен, специфично или предпочтительно связывается с SEMA4D.

В другом варианте анти-SEMA4D-антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, вариант или производное, применимое в способах, предлагаемых в настоящем изобретении, содержит, по существу состоит или состоит из варибельного домена легкой цепи иммуноглобулина (VL-домена), в котором по меньшей мере одна из CDR VL-домена имеет аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере приблизительно на 80%, приблизительно на 85%, приблизительно на 90%, приблизительно на 95%, приблизительно на 96%, приблизительно на 97%, приблизительно на 98%, приблизительно на 99% идентична CDR1, CDR2 или CDR3 последовательности SEQ ID NO: 17 или 18.

В другом варианте анти-SEMA4D-антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, вариант или производное, применимое в способах, предлагаемых в настоящем изобретении, содержит, по существу состоит или состоит из варибельного домена легкой цепи иммуноглобулина (VL-домена), в котором по меньшей мере одна из CDR VL-домена имеет аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере приблизительно на 80%, приблизительно на 85%, приблизительно на 90%, приблизительно на 95%, приблизительно на 96%, приблизительно на 97%, приблизительно на 98%, приблизительно на 99% идентична последовательности SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15 или SEQ ID NO: 16.

В другом варианте анти-SEMA4D-антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, вариант или производное, применимое в способах, предлагаемых в настоящем изобретении, содержит, по существу состоит или состоит из варибельного домена легкой цепи иммуноглобулина (VL-домена), в котором по меньшей мере одна из CDR VL-домена имеет аминокислотную последовательность, идентичную, за исключением 1, 2, 3, 4 или 5 консервативных аминокислотных замен, последовательности SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15 или SEQ ID NO: 16.

В следующем варианте анти-SEMA4D-антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, вариант или производное, применимое в способах, предлагаемых в настоящем изобретении, содержит, по существу состоит или состоит из VL-домена, который имеет аминокислотную последовательность, которая по

меньшей мере приблизительно на 80%, приблизительно на 85%, приблизительно на 90%, приблизительно на 91%, приблизительно на 92%, приблизительно на 93%, приблизительно на 94%, приблизительно на 95%, приблизительно на 96%, приблизительно на 97%, приблизительно на 98%, приблизительно на 99% или на 100% идентична последовательности SEQ ID NO: 17 или SEQ ID NO: 18, при этом анти-SEMA4D-антитело, содержащее кодируемый VL-домен, специфично или предпочтительно связывается с SEMA4D.

Также для применения в способах, предлагаемых в настоящем изобретении, включены полипептиды, кодирующие анти-SEMA4D-антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, варианты или производные, которые описаны в настоящей публикации, полинуклеотиды, кодирующие такие полипептиды, векторы, содержащие такие полинуклеотиды, и клетки-хозяева, содержащие такие векторы или полинуклеотиды, все для получения анти-SEMA4D-антител или их антигенсвязывающих фрагментов, вариантов или производных для применения в способах, описанных в настоящей публикации.

Подходящие биологически активные варианты анти-SEMA4D-антител согласно изобретению можно применять в способах согласно настоящему изобретению. Такие варианты будут сохранять требуемые свойства связывания исходного анти-SEMA4D-антитела.

Способы получения вариантов антител общедоступны в данной области.

Способы мутагенеза и изменений нуклеотидных последовательностей хорошо известны в данной области. См., например, Walker and Gaastra, eds. (1983) *Techniques in Molecular Biology* (MacMillan Publishing Company, New York); Kunkel, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 488-492 (1985); Kunkel et al., *Methods Enzymol.* 154: 367-382 (1987); Sambrook et al. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor, N.Y.); патент США № 4873192; и ссылки, цитированные в указанных публикациях, которые включены в настоящее описание в виде ссылки. Руководство относительно подходящих аминокислотных замен, которые не влияют на биологическую активность представляющего интерес полипептида, можно найти в модели Dayhoff с соавторами (1978) в *Atlas of Protein Sequence and Structure* (Natl. Biomed. Res. Found., Washington, D.C.), pp. 345-352, включенной в настоящее описание в виде ссылки в полном объеме. В модели Dayhoff с соавторами использована матрица сходства аминокислот на основе закрепившихся точечных мутаций (Point Accepted Mutation (PAM)) (матрица PAM 250) для определения подходящих консервативных аминокислотных замен. В некоторых аспектах аминокислотные замены могут представлять собой консервативные замены, такие как замена одной аминокислоты другой, имеющей сходные свойства. Примеры консервативных аминокислотных замен согласно матрице PAM 250 в модели Dayhoff с соавторами включают без ограничения Gly↔Ala, Val↔Ile↔Leu, Asp↔Glu, Lys↔Arg, Asn↔Gln и Phe↔Trp↔Tyr.

При конструировании вариантов связывающей анти-SEMA4D-молекулы, например антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, модификации представляющих интерес полипептидов осуществляют так, чтобы варианты продолжали обладать требуемыми свойствами, например были способны специфично связываться с SEMA4D, например SEMA4D человека, мыши или и человека, и мыши, например экспрессированным на поверхности или секретируемым клеткой, и обладали активностью, блокирующей SEMA4D, как описано в настоящей публикации. Мутации, осуществленные в ДНК, кодирующей вариант полипептида, не должны помещать последовательность вне рамки считывания, и в некоторых аспектах не они не будут создавать комплементарные области, которые могут образовывать вторичную структуру мРНК. См. публикацию заявки на выдачу патента EP № 75444.

Способы измерения специфичности связывания связывающей анти-SEMA4D-молекулы, например антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, варианта или производного, включают без ограничения стандартные анализы конкурентного связывания, анализы для наблюдения за секрецией иммуноглобулина Т-клетками или В-клетками, анализы пролиферации Т-клеток, анализы апоптоза, анализы ELISA и тому подобные. Смотри, например, такие анализы, описанные в публикациях: WO 93/14125; Shi et al., *Immunity* 13: 633-642 (2000); Kumanogoh et al., *J. Immunol.* 169: 1175-1181 (2002); Watanabe et al., *J. Immunol.* 167: 4321-4328 (2001); Wang et al., *Blood* 97: 3498-3504 (2001); и Giraudon et al., *J. Immunol.* 172(2): 1246-1255 (2004), которые все включены в настоящее описание в виде ссылки.

При обсуждении в настоящем описании, если какой-либо конкретный полипептид, включая константные области, CDR, VH-домены или VL-домены, раскрытые в настоящем описании, по меньшей мере приблизительно на 65%, приблизительно на 70%, приблизительно на 75%, приблизительно на 80%, приблизительно на 85%, приблизительно на 90%, приблизительно на 91%, приблизительно на 92%, приблизительно на 93%, приблизительно на 94%, приблизительно на 95%, приблизительно на 96%, приблизительно на 97%, приблизительно на 98%, приблизительно на 99% или даже приблизительно на 100% идентичен другому полипептиду, процент идентичности можно определить, используя способы и компьютерные программы/программное обеспечение, известные в данной области, такие как без ограничения программа BESTFIT (Wisconsin Sequence Analysis Package, Version 8 for Unix, Genetics Computer Group, University Research Park, 575 Science Drive, Madison, Wis. 53711). В программе BESTFIT использован алгоритм локальной гомологии Смита и Ватермана (1981) (*Adv. Appl. Math.* 2: 482-489), чтобы найти наилучший участок гомологии между двумя последовательностями. При использовании BESTFIT

или любой другой программы выравнивания последовательностей для определения того, является ли конкретная последовательность, например, на 95% идентичной эталонной последовательности согласно настоящему изобретению, параметры устанавливаются, конечно, так, чтобы вычислять процент идентичности на протяжении всей длины эталонной полипептидной последовательности и чтобы разрешить пробелы в гомологии вплоть до 5% от общего количества аминокислот в эталонной последовательности.

В целях настоящего изобретения идентичность последовательностей в процентах можно определить, используя алгоритм поиска гомологии Смита-Ватермана, в котором использован поиск сходства с пробелами со штрафом за открытие пробела 12 и штрафом за удлинение пробела 2, и матрица BLOSUM 62. Алгоритм поиска гомологии Смита-Ватермана описан в публикации Smith and Waterman (1981) *Adv. Appl. Math.* 2: 482-489. Вариант может, например, отличаться от эталонного анти-SEMA4D-антитела (например, мАт VX15/2503, 67 или 76) всего лишь от 1 до 15 аминокислотными остатками, всего лишь 1-10 аминокислотными остатками, например 6-10, всего лишь 5, всего лишь 4, 3, 2 или даже 1 аминокислотным остатком.

Процент "идентичности последовательностей" также может быть определен при сравнении двух оптимально выровненных последовательностей на протяжении окна сравнения. Чтобы оптимально выровнять последовательности для сравнения, часть полинуклеотидной или полипептидной последовательности в окне сравнения может содержать добавления или делеции, называемые пробелами, тогда как эталонная последовательность остается постоянной. Оптимальное выравнивание представляет собой такое выравнивание, которое даже с пробелами дает наибольшее возможное количество "идентичных" положений между эталонной и сравниваемой последовательностями. Процент "идентичности последовательностей" между двумя последовательностями можно определить, используя версию программы "BLAST 2 Sequences", которая доступна из National Center for Biotechnology Information с 1 сентября 2004, и такая программа включает в себя программы BLASTN (для сравнения нуклеотидных последовательностей) и BLASTP (для сравнения полипептидных последовательностей), и такие программы основаны на алгоритме Karlin и Altschul (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90(12): 5873-5877, 1993). При использовании "BLAST 2 Sequences" можно использовать параметры, которые были параметрами по умолчанию по состоянию на 1 сентября 2004, для размера окна (3), штрафа за открытие пробела (11), штрафа за удлинение пробела (1), отсечка для выравнивания с пробелами (50), ожидаемое значение (10) и любой другой требуемый параметр, включая без ограничения опцию матрицы.

Константная область анти-SEMA4D-антитела может быть подвергнута мутациям, чтобы изменить эффекторную функцию, несколькими путями. Например, см. патент США № 6737056B1 и публикацию заявки на выдачу патента США № 2004/0132101A1, в которых обсуждаются мутации Fc, которые оптимизируют связывание антитела с рецепторами Fc.

В некоторых анти-SEMA4D-антителах или их фрагментах, вариантах или производных, применимых в способах, предлагаемых в настоящем изобретении, Fc-часть может быть мутирована для снижения эффекторной функции с использованием способов, известных в данной области. Например, делеция или инактивация (в результате точковых мутаций или другими способами) домена константной области может снижать связывание Fc-рецептора циркулирующими модифицированными антителом, тем самым повышая их локализацию в опухолях. В других случаях модификации константной области согласно настоящему изобретению уменьшает связывание комплемента и, таким образом, снижает время полужизни в сыворотке. Можно использовать и другие модификации константной области, чтобы модифицировать дисульфидные связи или олигосахаридные остатки, которые обеспечивают возможность усиленной локализации вследствие повышенной специфичности к антигену или гибкости антитела. Полученный в результате физиологический профиль, биодоступность и другие биохимические эффекты модификаций, такие как локализация в опухолях, биораспределение и время полужизни в сыворотке, легко могут быть измерены и количественно оценены с использованием хорошо известных иммунологических способов без излишнего экспериментирования. Анти-SEMA4D-антитела для применения в способах, предлагаемых в настоящем изобретении, включают производные, которые модифицированы, например, в результате ковалентного связывания молекулы любого типа с антителом так, чтобы ковалентное связывание не предотвращало специфичное связывание антитела с его родственным эпитопом. Например, но без ограничения, производные антител включают антитела, которые были модифицированы, например, в результате гликозилирования, ацетилирования, пегилирования, фосфорилирования, амидирования, дериватизации известными защитными/блокирующими группами, протеолитического расщепления, связывания с клеточным лигандом или другим белком и т.д. Любая из многочисленных химических модификаций может быть осуществлена известными способами, включая без ограничения специфичное химическое расщепление, ацетилирование, формилирование и т.д. Кроме того, производное может содержать одну или несколько не классических аминокислот. "Консервативная аминокислотная замена" представляет собой замену, при которой аминокислотный остаток заменяют аминокислотным остатком, имеющим боковую цепь со сходным зарядом. Семейства аминокислотных остатков, имеющих боковые цепи со сходными зарядами, были определены в данной области. Такие семейства включают аминокислоты с основными боковыми цепями (например, лизин, аргинин, гистидин), кислыми боковыми цепями (например, аспарагиновая кислота, глутаминовая кислота), незаряженными полярными боковыми цепями (например, гли-

цин, аспарагин, глутамин, серин, треонин, тирозин, цистеин), неполярными боковыми цепями (например, аланин, валин, лейцин, изолейцин, пролин, фенилаланин, метионин, триптофан), бета-разветвленными боковыми цепями (например, треонин, валин, изолейцин) и ароматическими боковыми цепями (например, тирозин, фенилаланин, триптофан, гистидин). Альтернативно мутации могут быть введены случайным образом на протяжении всей или части кодирующей последовательности, например в результате насыщающего мутагенеза, и полученные в результате мутанты могут быть подвергнуты скринингу в отношении биологической активности, чтобы идентифицировать мутанты, которые сохраняют активность (например, способность связывать анти-SEMA4D-полипептид, блокировать взаимодействие SEMA4D с его рецептором или уменьшать, ингибировать, подавлять и/или замедлять образование бляшек у субъекта, например, у пациента с воспалительным расстройством или атеросклерозом).

Например, можно ввести мутации только в каркасные области или только в области CDR молекулы антитела. Вводимые мутации могут быть молчащими или нейтральными миссенс-мутациями, т.е. могут не оказывать или оказывать небольшое влияние на способность антитела связывать антиген. Такие типы мутаций могут быть применимы для оптимизации использования кодонов или для улучшения продукции антител гибридами. Альтернативно не нейтральные миссенс-мутации могут изменять способность антитела связывать антиген. Специалист в данной области сможет сконструировать и тестировать мутантные молекулы с требуемыми свойствами, такими как отсутствие изменения в антигенсвязывающей активности или изменения в активности связывания (например, улучшения активности связывания антигена или изменение специфичности антитела). После мутагенеза кодируемый белок может быть обычным способом экспрессирован, и может быть определена функциональная и/или биологическая активность кодируемого белка, (например, способность иммуноспецифично связывать по меньшей мере один эпитоп полипептида SEMA4D), с использованием способов, описанных в настоящей публикации, или обычным образом модифицирующих способов, известных в данной области.

В некоторых вариантах анти-SEMA4D-антитела для применения в способах, предлагаемых в настоящем изобретении, содержат по меньшей мере одну оптимизированную определяющую комплементарность область (CDR). Пол термином "оптимизированная CDR" подразумевают, что CDR была модифицирована и оптимизирована для улучшения аффинности связывания и/или анти-SEMA4D-активности, которая придается анти-SEMA4D-антителу, содержащему оптимизированную CDR. "Анти-SEMA4D-активность" или "блокирующая SEMA4D активность" может включать активность, которая модулирует одну или несколько из следующих активностей, ассоциированных с SEMA4D: активацию, агрегацию и жизнеспособность В-клеток; CD40-индуцированную пролиферацию и продукцию антител; гуморальный ответ на зависимые от Т-клеток антигены; пролиферацию Т-клеток или других иммунных клеток; созревание дендритных клеток; демиелинизацию и дегенерацию аксонов; апоптоз плюрипотентных предшественников нейронов и/или олигодендроцитов; индукцию миграции эндотелиальных клеток; ингибирование спонтанной миграции моноцитов; связывание на клеточной поверхности с плексином-В1 или другим рецептором или любую другую активность, ассоциированную с растворимым SEMA4D или SEMA4D, который экспрессируется на поверхности клеток SEMA4D+. Анти-SEMA4D-активность также может быть отнесена к снижению частоты или тяжести заболеваний, ассоциированных с экспрессией SEMA4D, включая без ограничения некоторые типы злокачественных опухолей, включая лимфомы, аутоиммунные заболевания, воспалительные заболевания, включая воспалительные заболевания центральной нервной системы (ЦНС) и периферической нервной системы (PNS), отторжения трансплантатов и инвазивный ангиогенез. Примеры оптимизированных антител, основанных на анти-SEMA4D-мАт мыши BD16 и BB18, описаны в публикациях: US № 2008/0219971 A1, международной заявке на выдачу патента WO 93/14125 и Herold et al., *Int. Immunol.* 7(1): 1-8 (1995), каждая из которых включена в настоящее описание в виде ссылки в полном объеме. Модификации могут включать замену аминокислотных остатков в CDR так, чтобы анти-SEMA4D-антитело сохраняло специфичность по отношению к антигену SEMA4D и имело улучшенную аффинность связывания и/или улучшенную анти-SEMA4D-активность.

#### IV. Способы лечения с применением терапевтических анти-SEMA4D-антител.

Способы согласно изобретению направлены на применение связывающих анти-SEMA4D-молекул, например антител, включая их антигенсвязывающие фрагменты, варианты и производные, для лечения атеросклероза у субъекта, имеющего атеросклероз. В некоторых вариантах эндотелиальные клетки экспрессируют рецептор SEMA4D, в некоторых вариантах рецептором является плексин-В1. Хотя следующее далее обсуждение относится к введению анти-SEMA4D-антитела, способы, описанные в настоящей публикации, также применимы к антигенсвязывающим фрагментам, вариантам и производным таких анти-SEMA4D-антител, которые сохраняют требуемые свойства анти-SEMA4D-антител согласно изобретению, например способны специфично связывать SEMA4D, например SEMA4D человека, мыши или человека, и мыши, обладают нейтрализующей SEMA4D активностью и/или блокируют взаимодействие SEMA4D с его рецептором, например плексином-В1. Способы, описанные в настоящей публикации, также применимы к другим биологическим продуктам или низкомолекулярным лекарственным средствам, которые сохраняют требуемые свойства антител согласно изобретению, например способны специфично связывать SEMA4D, например SEMA4D человека, мыши или человека, и мыши, обладают нейтрализующей SEMA4D активностью и/или блокируют взаимодействие SEMA4D с его рецепторами.



В одном варианте лечение включает в себя применение или введение связывающей анти-SEMA4D-молекулы, например антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, который описан в настоящей публикации, пациенту, при этом пациент имеет или подвержен риску развития болезни коронарных артерий. В другом варианте предполагается, что лечение также включает применение или введение фармацевтической композиции, содержащей связывающую анти-SEMA4D-молекулу, например антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, пациенту, при этом пациент имеет или подвержен риску развития болезни коронарных артерий.

Связывающие анти-SEMA4D-молекулы, например антитела или их связывающие фрагменты, которые описаны в настоящей публикации, применимы для лечения воспалительных заболеваний, включая атеросклероз. В некоторых вариантах лечение атеросклероза может снижать, ингибировать, подавлять и/или замедлять образование атеросклеротических бляшек и/или уменьшать, ингибировать, подавлять и/или замедлять рост атеросклеротических бляшек. Атеросклеротические бляшки образованы жиром, холестерином, кальцием и другими веществами, находящимися в крови, которые с течением времени делают артерии жесткими и узкими, тем самым ограничивая поток обогащенной кислородом крови к органам и другим частям тела.

В других вариантах лечение атеросклероза может снижать или уменьшать неоваскуляризацию, которая происходит в атеросклеротических бляшках или вокруг них. Неоваскуляризация происходит в атеросклеротических бляшках аорты и коронарных артериях человека (Carmeliet P, *Nature Med* 9: 653-660, 2003; и Zhang Y et al., *Am. J. Pathol.* 143: 164-172, 1993). Такие новые сосуды исходно происходят из адвентициальных *vasa vasorum* и служат для снабжения питанием растущей утолщенной атеросклеротической интимы (Kumamoto M et al., *Hum Pathol* 26: 450-456, 1995). Таким образом, неоваскуляризация является основной причиной роста атеросклеротических бляшек и дестабилизации (Barger AC et al., *N Engl. J. Med.* 310: 175-177, 1984). В нескольких исследованиях изучали механизм, посредством которого неоваскуляризация способствует образованию атером (Moreno P.R. et al., *Circulation* 113: 2245-2252, 2006; и Cheng XW et al., *Hypertension* 57: 981-989, 2011). Так как плотность *vasa vasorum* в высокой степени коррелирует с количеством воспалительных мононуклеарных клеток, инфильтрующих бляшку, то считается, что образование новых сосудов в бляшке обеспечивает ключевые участки проникновения для миграции лейкоцитов в атеросклеротическую бляшку (O'Brien E.R. et al., *Am J Pathol* 145: 883-894, 1994; и Moulton K.S. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100: 4736-4741, 2003). Геморрагия из новых сосудов бляшек дополнительно увеличивает размер бляшек, способствуя отложению липидов крови в липидной сердцевине атеромы (Kolodgie F.D. et al., *N. Engl. J. Med.* 349: 2316-25, 2003). Было показано, что ингибиторы ангиогенеза, включая ангиостатин или TNP-4570, подавляют рост бляшек за счет уменьшения образования новых сосудов у склонных к атеросклерозу дефицитных по аполипопротеиду E мышей (ApoE<sup>-/-</sup>), что свидетельствует о функциональной важности неоваскуляризации для прогрессирования атеросклероза (Moulton K.S. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100: 4736-4741, 2003; и Moulton K.S. et al., *Circulation* 99: 1726-32, 1999). Кроме того, новые сосуды, образованные в атеросклеротической бляшке, могут усугублять атеросклероз за счет увеличения количества металлопротеиназ, секретируемых в бляшку из крови, и индуцируя, наконец, разрыв бляшки и образование тромба (Jonsson-Rylander A.C. et al., *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 25: 180-185, 2005).

В других вариантах связывающие анти-SEMA4D-молекулы, например антитела или их связывающие фрагменты, которые описаны в настоящей публикации, могут быть применимы для лечения других воспалительных заболеваний. Примеры таких заболеваний могут включать без ограничения сердечно-сосудистые заболевания, ревматоидный артрит, желудочно-кишечные заболевания, нейровоспалительные заболевания (например, рассеянный склероз) и даже некоторые типы злокачественной опухоли (например, карциному желчного пузыря).

В одном варианте изобретение относится к применению связывающих анти-SEMA4D-молекул, например антител или их антигенсвязывающих фрагментов, вариантов или производных в качестве лекарственного средства, в частности для применения с целью лечения или профилактики атеросклероза, чтобы ингибировать, снизить, предотвратить, минимизировать и/или замедлить образование атеросклеротических бляшек и/или ингибировать, уменьшить, предотвратить, минимизировать и/или замедлить неоваскуляризацию в атеросклеротических бляшках.

Согласно способам, предлагаемым в настоящем изобретении, по меньшей мере одну связывающую анти-SEMA4D-молекулу, например антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, вариант или производное, которые определены в настоящем описании, можно применять для стимуляции позитивного терапевтического ответа в отношении атеросклероза. Подразумевают, что "позитивный терапевтический ответ" по отношению к атеросклерозу включает улучшение состояния при заболевании, ассоциированном с образованием бляшек, неоваскуляризацией бляшек, ростом бляшек и/или улучшение симптомов, ассоциированных с заболеванием. то есть можно наблюдать замедленное образование атеросклеротических бляшек, уменьшенную неоваскуляризацию бляшек, уменьшенное воспаление, сниженный рост бляшек, сочетания указанного и тому подобное. Такие позитивные терапевтические ответы не ограничены путем введения и могут включать введение донору, в ткань донора (такое как, например, перфузия органа), хозяину, любое сочетание указанного и тому подобное. В частности, способы, предлагаемые в

настоящем изобретении, направлены на ингибирование, предотвращение, снижение, ослабление или уменьшение развития атеросклероза у пациента. Таким образом, например, улучшение состояния при заболевании может быть охарактеризовано как отсутствие клинически наблюдаемых симптомов, уменьшение, ингибирование, подавление и/или замедление образования бляшек или роста бляшек, снижение, ингибирование, подавление и/или замедление неоваскуляризации, уменьшение воспаления или изменение морфологии или функции бляшек.

Связывающие анти-SEMA4D-молекулы, например антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, варианты или производные можно применять в сочетании по меньшей мере с одним или несколькими средствами лечения атеросклероза; при этом дополнительное терапевтическое средство вводят до, во время или после терапии с применением связывающей анти-SEMA4D-молекулы, например антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, варианта или производного. Таким образом, в случае когда комбинированная терапия включает в себя введение связывающей анти-SEMA4D-молекулы, например антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, варианта или производного, в сочетании с введением другого терапевтического средства, способы согласно изобретению охватывают совместное введение с использованием отдельных препаратов или одного фармацевтического препарата с одновременным или последовательным введением в любом порядке.

Для применения способов и систем согласно изобретению в некоторых вариантах образцы или изображения от пациента могут быть получены до, после или и до и после введения терапевтического средства, содержащего либо: (1) эффективное количество изолированной связывающей молекулы, которая специфично связывается с семафорином-4D (SEMA4D); либо (2) эффективное количество изолированной связывающей молекулы, которая специфично связывается с семафорином-4D (SEMA4D), субъекту, имеющему атеросклероз или воспалительное заболевание. В некоторых случаях последовательные образцы или изображения могут быть получены от пациента после начала терапии, после прекращения терапии, или и до и после терапии. Образцы или изображения могут быть, например, затребованы поставщиком медицинских услуг (например, врачом) или поставщиком медицинского обеспечения, получены и/или обработаны тем же самым или другим поставщиком медицинских услуг (например, медсестрой, в госпитале) или в клинической лаборатории, и после обработки результаты могут быть отправлены еще и другому поставщику медицинских услуг, поставщику медицинского обеспечения или пациенту. Подобным образом измерение/определение одной или нескольких бальных оценок, сравнения между бальными оценками, анализ оценок и решение относительно лечения могут быть осуществлены одним или несколькими поставщиками медицинских услуг, поставщиками медицинского обеспечения и/или клиническими лабораториями.

В используемом в настоящем описании смысле термин "поставщик медицинских услуг" относится к людям или организациям, которые непосредственно взаимодействуют и осуществляют введение в живой организм, например больным людям. Неограничивающие примеры поставщиков медицинских услуг включают врачей, медсестер, техников, терапевтов, фармакологов, консультантов, практикующих врачей альтернативной медицины, медицинские учреждения, кабинеты врачей, госпитали, пункты первой медицинской помощи, клиники, центры неотложной помощи, клиники/учреждения альтернативной медицины и любые другие объекты, предоставляющие общее и/или специализированное лечение, оценку, поддержание, терапию, медикаментозное лечение и/или консультацию в отношении всего или любой части состояния здоровья пациента, включая без ограничения общий медицинский, специализированный медицинский, хирургический и/или любой другой тип лечения, оценки, поддержания, терапии, медикаментозного лечения и/или консультации.

В некоторых аспектах поставщик медицинских услуг может вводить или инструктировать другого поставщика медицинских услуг по поводу введения терапевтического средства, содержащего: (1) эффективное количество изолированной связывающей молекулы, которая специфично связывается с семафорином-4D (SEMA4D); или (2) эффективного количества изолированной связывающей молекулы, которая специфично связывается с семафорином-4D (SEMA4D), при этом субъект имеет, или предполагается, что он имеет атеросклероз или воспалительное заболевание. Поставщик медицинских услуг может выполнять или инструктировать другого поставщика медицинских услуг или пациента в отношении осуществления следующих действий: получения образца или изображения, обработки образца или изображения, сдачи образца или изображения, получения образца или изображения, переноса образца или изображения, анализа или измерения образца или изображения, количественной оценки образца или изображения, предоставления результатов, полученных после анализа/измерения/количественной оценки образца или изображения, получения результатов после анализа/измерения/количественной оценки образца или изображения, сравнения/оценки результатов, оценки результатов, полученных после анализа/измерения/количественной оценки одного или нескольких образцов или изображений, предоставления сравнения сравнения/оценки одного или нескольких образцов, получения сравнения/оценки одного или нескольких образцов или изображений, введения терапевтического средства (например, (1) эффективного количества изолированной связывающей молекулы, которая специфично связывается с семафорином-4D (SEMA4D); или (2) эффективного количества изолированной связывающей молекулы, которая специфично связывается с семафорином-4D (SEMA4D), субъекту, при этом субъект имеет, или предполага-

ется, что он имеет атеросклероз или воспалительное заболевание, начало введения терапевтического средства, прекращение введения терапевтического средства, продолжение введения терапевтического средства, временное прерывание введения терапевтического средства, увеличение количества вводимого терапевтического средства, уменьшение количества вводимого терапевтического средства, продолжение введения определенного количества терапевтического средства, увеличение частоты введения терапевтического средства, уменьшение частоты введения терапевтического средства, поддержание той же частоты дозирования терапевтического средства, замену терапии или терапевтического средства, по меньшей мере, другой терапией или терапевтическим средством, объединение терапии или терапевтического средства, по меньшей мере, с другой терапией или дополнительным терапевтическим средством.

В некоторых аспектах поставщик медицинского обеспечения может разрешать или запрещать, например, сбор образца или изображения, обработку образца или изображения, сдачу образца или изображения, получение образца или изображения, перенос образца или изображения, анализ или измерение образца или изображения, количественную оценку образца или изображения, предоставление результатов, полученных после анализа/измерения/количественной оценки образца или изображения, перенос результатов, полученных после анализа/измерения/количественной оценки образца или изображения, сравнение/оценку результатов, полученных после анализа/измерения/количественной оценки одного или нескольких образцов или изображений, перенос сравнения/оценки одного или нескольких образцов или изображений, терапию или введение терапевтического средства, начало терапии или введения терапевтического средства, прекращение терапии или введения терапевтического средства, продолжение терапии или введения терапевтического средства, временную приостановку терапии или введения терапевтического средства, увеличение количества вводимого терапевтического средства, уменьшение количества вводимого терапевтического средства, продолжение введения количества терапевтического средства, увеличение частоты введения терапевтического средства, уменьшение частоты введения терапевтического средства, поддержание той же частоты дозирования терапевтического средства, замену терапии или терапевтического средства, по меньшей мере, другой терапией или терапевтическим средством или объединение терапии или терапевтического средства, по меньшей мере, с другой терапией или дополнительным терапевтическим средством.

Кроме того, поставщик медицинского обеспечения может, например, разрешать или запрещать назначение терапии, разрешать или запрещать охват терапии, разрешать или запрещать страховое возмещение за оплату терапии, определять или запрещать выбор терапии и т.д.

В некоторых аспектах клиническая лаборатория может, например, собирать или получать образец, обрабатывать образец, сдавать образец, получать образец, переносить образец, анализировать или измерять образец, количественно оценивать образец, предоставлять результаты, полученные после анализа/измерения/количественной оценки образца, получать результаты, полученные после анализа/измерения/количественной оценки образца, сравнивать/оценивать результаты, полученные после анализа/измерения/количественной оценки одного или нескольких образцов, предоставлять сравнение/оценку одного или нескольких образцов, получать сравнение/оценку одного или нескольких образцов или осуществлять другие связанные действия.

В некоторых аспектах поставщик медицинских услуг, клиническая лаборатория или другой объект может, например, собирать или получать изображение, обрабатывать изображение, предоставлять изображение, получать изображение, переносить изображение, анализировать или измерять изображение, количественно оценивать изображение, предоставлять результаты после анализа/измерения/количественной оценки изображения, получать результаты, полученные после анализа/измерения/количественной оценки изображения, сравнивать/оценивать результаты, полученные после анализа/измерения/количественной оценки одного или нескольких изображений, предоставлять сравнение/оценку одного или нескольких изображений, получать сравнение/оценку одного или нескольких изображений или осуществлять другие связанные действия. Изображения, которые могут быть использованы в таких аспектах, включают без ограничения изображения, полученные посредством коронарной ангиографии, внутрисосудистой сонографии (IVUS), сонографии сонных артерий, коронарной компьютерной томографии (КТ), магнитно-резонансной томографии (МРТ), позитронно-эмиссионной томографии (ПЭТ), оптической когерентной томографии (ОКТ), инфракрасной спектроскопии (NIRS) и NIR-флуоресценции. В некоторых вариантах можно применять способы получения изображений, которые описаны в литературе (Tardif et al. *Circ. Cardiovasc. Imaging* 4: 319-333 (2011)).

#### VII. Способы диагностики и лечения.

В некоторых вариантах настоящее изобретение относится к способам лечения субъекта, например пациента, имеющего атеросклероз, при этом субъект имеет повышенные уровни либо В-клеток, либо Т-клеток, либо и В-клеток, и Т-клеток, включающим в себя введение сочетания эффективного количества изолированной связывающей молекулы, которая специфично связывается с семафорин-4D (SEMA4D), если уровни В-клеток, Т-клеток или и В-клеток, и Т-клеток субъекта выше предварительно определяемого порогового уровня В-клеток, Т-клеток или и В-клеток, и Т-клеток, или повышены относительно уровня В-клеток, Т-клеток или и В-клеток, и Т-клеток в одном или нескольких контрольных образцах, которые могут включать без ограничения образцы от других пациентов, имеющих атеросклероз, или от здо-

ровых, не имеющих атеросклероза пациентов. Уровни В-клеток, Т-клеток или и В-клеток и Т-клеток могут быть измерены поставщиком медицинских услуг или в клинической лаборатории, при этом образец, например образец крови, от пациента получает либо поставщик медицинских услуг, либо клиническая лаборатория. В одном аспекте уровень В-клеток, Т-клеток или и В-клеток, и Т-клеток у пациента можно измерить в основанном на цитометрии иммунофенотипическом анализе.

В некоторых вариантах настоящее изобретение также относится к способу лечения субъекта, например пациента, имеющего атеросклероз, включающему в себя введение субъекту эффективного количества изолированной связывающей молекулы, которая специфично связывается с семафорином-4D (SEMA4D), если уровни С-реактивного белка (CRP) и/или липопротеида низкой плотности (ЛНП) в образце, взятом от субъекта, выше предварительно определяемых пороговых уровней или повышены относительно уровней CRP и/или ЛНП в одном или нескольких контрольных образцах. Уровни экспрессии CRP и/или ЛНП у субъекта могут быть измерены поставщиком медицинских услуг или в клинической лаборатории. В некоторых аспектах уровни CRP и/или ЛНП могут быть измерены *in situ*, например способами визуализации. В некоторых аспектах уровни экспрессии CRP и/или ЛНП могут быть измерены в образце, полученном от субъекта. В одном аспекте уровни CRP и/или ЛНП могут быть измерены в иммуноанализе с применением антител или их антигенсвязывающих фрагментов, которые узнают CRP и/или ЛНП. В другом аспекте уровни CRP и/или ЛНП могут быть измерены в количественном анализе экспрессии генов, например в ОТ-ПЦР-анализе.

Настоящее изобретение также относится к способам, анализам и наборам для обеспечения определения поставщиком медицинских услуг, поставщиком медицинского обеспечения или клинической лабораторией того, получит ли субъект, например пациент, имеющий атеросклероз или воспалительное заболевание, пользу от лечения: (1) эффективным количеством изолированной связывающей молекулы, которая специфично связывается с семафорином-4D (SEMA4D); или (2) эффективным количеством изолированной связывающей молекулы, которая специфично связывается с семафорином-4D (SEMA4D), при этом субъект имеет, или предполагается, что он имеет атеросклероз или воспалительное заболевание. Способы, анализы и наборы, предлагаемые в настоящем изобретении, также будут облегчать определение поставщиком медицинских услуг, поставщиком медицинского обеспечения или клинической лабораторией того, получит ли субъект, например пациент, имеющий атеросклероз или воспалительное заболевание, пользу от лечения (1) эффективным количеством изолированной связывающей молекулы, которая специфично связывается с семафорином-4D (SEMA4D) и эффективным количеством по меньшей мере одного другого иммуномодулирующего средства терапии; или (2) эффективным количеством изолированной связывающей молекулы, которая специфично связывается с семафорином-4D (SEMA4D).

Настоящее изобретение относится к способу лечения субъекта, например пациента, имеющего атеросклероз, включающему в себя введение эффективного количества изолированной связывающей молекулы, которая специфично связывается с семафорином-4D (SEMA4D); если уровень В-клеток, Т-клеток или и Т-клеток, и В-клеток в образце, взятом от пациента, выше предварительно определяемого порогового уровня или выше уровня В-клеток, Т-клеток или и Т-клеток, и В-клеток в одном или нескольких контрольных образцах. В некоторых аспектах образец получают от пациента и передают для измерения уровня В-клеток, Т-клеток или и Т-клеток, и В-клеток в образце, например, в клиническую лабораторию.

Настоящее изобретение также относится к способу лечения субъекта, у которого определено наличие атеросклеротических бляшек, например у пациента, имеющего атеросклероз, включающему в себя введение эффективного количества изолированной связывающей молекулы, которая специфично связывается с семафорином-4D (SEMA4D). В некоторых вариантах у субъекта определяют наличие атеросклеротических бляшек и подвергают лечению, если количество, размер или характеристики атеросклеротических бляшек у пациента выше предварительно определяемого порогового количества, размера или характеристики, или если количество, размер или характеристика атеросклеротических бляшек у субъекта являются показателями атеросклероза при сравнении с одним или несколькими контрольными образцами. В некоторых аспектах образец получают от пациента и передают для измерения уровня CRP и/или LDL в образце, например, в клиническую лабораторию. В других аспектах пациента подвергают исследованию способами визуализации, чтобы определить количество, размер или характеристику атеросклеротических бляшек. Изображения, которые можно использовать в таких способах, включают без ограничения изображения, полученные посредством коронарной ангиографии, внутрисосудистой сонографии (IVUS), сонографии сонных артерий, коронарной компьютерной томографии (КТ), магнитно-резонансной томографии (МРТ), позитронно-эмиссионной томографии (ПЭТ), оптической когерентной томографии (ОКТ), инфракрасной спектроскопии (NIRS) и NIR-флуоресценции. В некоторых вариантах можно применять способы получения изображений, которые описаны в литературе (Tardif et al. *Circ. Cardiovasc. Imaging*. 2011; 4: 319-333). В некоторых вариантах лечение проводят, если атеросклеротические бляшки представляют собой "чувствительные атеросклеротические бляшки", имеющие характеристики, которые включают без ограничения крупные липидные сердцевины, низкое содержание SMC, высокое содержание макрофагов и тонкое фиброзное утолщение. Наличие "чувствительных атеросклеротических бляшек" у субъекта можно определить с использованием системы оценок (Virmani et al. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 20(5): 1262-75 (2000)) или другими способами (van Lammeren et al., *Current*

Cardiology Reviews 7: 22-27 (2011)). В некоторых вариантах субъектов, у которых определяют наличие таких "чувствительных атеросклеротических бляшек", лечат способами, предлагаемыми в настоящем изобретении. Также предлагается способ лечения субъекта, например пациента, имеющего атеросклероз, включающий в себя (а) предоставление образца, взятого от субъекта для измерения уровня В-клеток, Т-клеток или и Т-клеток, и В-клеток или для измерения CRP и/или ЛНП в образце; и (b) введение эффективного количества изолированной связывающей молекулы, которая специфично связывается с семафорин-4D (SEMA4D) субъекту, если уровень В-клеток, Т-клеток или и Т-клеток, и В-клеток у субъекта, или уровень CRP, и/или ЛНП у субъекта выше предварительно определяемого порогового уровня или выше уровня В-клеток, Т-клеток или и Т-клеток, и В-клеток, или уровня CRP, и/или ЛНП в одном или нескольких контрольных образцах.

Изобретение также относится к способу лечения субъекта, например пациента, имеющего атеросклероз, включающему в себя (а) измерение уровня В-клеток, Т-клеток или и Т-клеток, и В-клеток в образце, полученном от субъекта, например от пациента, имеющего атеросклероз, при этом уровень В-клеток, Т-клеток или и Т-клеток, и В-клеток в образце от субъекта измеряют, например, в основном на цитометрии иммунофенотипическом анализе; (b) определение того, является ли уровень В-клеток, Т-клеток или и Т-клеток, и В-клеток в образце выше предварительно определяемого порогового уровня или выше уровня В-клеток, Т-клеток или и Т-клеток, и В-клеток в одном или нескольких контрольных образцах; и (c) рекомендацию, инструктирование или разрешение поставщику медицинских услуг вводить эффективное количество изолированной связывающей молекулы, которая специфично связывается с семафорин-4D (SEMA4D), субъекту, если уровень В-клеток, Т-клеток или и Т-клеток, и В-клеток у субъекта выше предварительно определяемого порогового уровня или выше уровня В-клеток, Т-клеток или и Т-клеток, и В-клеток в одном или нескольких контрольных образцах.

В некоторых аспектах уровень В-клеток, Т-клеток или и Т-клеток, и В-клеток у субъекта можно измерить в основном на цитометрии иммунофенотипическом анализе. В некоторых аспектах анализы могут быть осуществлены на образце, полученном от субъекта, профессиональным медицинским работником, осуществляющим лечение пациента, например, с применением анализа, который описан в настоящей публикации, приготовленного в виде набора для диагностики "на месте предоставления медицинских услуг". В некоторых аспектах образец может быть получен от субъекта и может быть передан, например, в клиническую лабораторию, для измерения уровня В-клеток, Т-клеток или и Т-клеток, и В-клеток в образце согласно инструкциям для профессиональных медицинских работников, включая без ограничения применение основанного на цитометрии иммунофенотипического анализа, который описан в настоящей публикации. В некоторых аспектах клиническая лаборатория, осуществляющая анализ, может давать рекомендации поставщику медицинских услуг или поставщику медицинского обеспечения относительно того, может ли субъект получить пользу от лечения эффективным количеством изолированной связывающей молекулы, которая специфично связывается с семафорин-4D (SEMA4D), если уровень В-клеток, Т-клеток или и Т-клеток, и В-клеток у субъекта выше предварительно определяемого порогового уровня или выше уровня В-клеток, Т-клеток или и Т-клеток, и В-клеток в одном или нескольких контрольных образцах.

В некоторых аспектах результаты иммуноанализа, другого диагностического анализа и/или визуализации могут быть переданы поставщику медицинского обеспечения для определения того, может ли страховка пациента покрыть затраты на лечение изолированной связывающей молекулой, которая специфично связывается с семафорин-4D (SEMA4D).

#### VIII. Фармацевтические композиции и способы введения.

Способы приготовления и введения связывающих анти-SEMA4D-молекул, например антител или их антигенсвязывающих фрагментов, вариантов или производных субъекту, нуждающемуся в таком введении, хорошо известны или легко могут быть определены специалистами в данной области. Путь введения связывающей анти-SEMA4D-молекулы, например антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, варианта или производного, может быть, например, пероральным, парентеральным, ингаляционным или местным. Термин "парентеральное" в используемом в настоящем описании смысле включает, например, внутривенное, внутриартериальное, внутривнутрибрюшинное, внутримышечное, подкожное, ректальное или вагинальное введение. Хотя предполагается, что все такие формы введения несомненно входят в объем изобретения, примером формы введения может быть раствор для инъекций, в частности для внутривенной или внутриартериальной инъекции или инфузии. Подходящая фармацевтическая композиция для инъекции может содержать буфер (например, ацетатный, фосфатный или цитратный буфер), поверхностно-активное вещество (например, полисорбат), необязательно стабилизатор (например, альбумин человека) и т.д. Однако в других способах, совместимых с представленным в настоящем описании руководством, связывающие анти-SEMA4D-молекулы, например антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, варианты или производные, могут быть доставлены непосредственно в место неблагоприятной популяции клеток с увеличением при этом экспозиции патологической ткани с терапевтическим средством.

Как обсуждается в настоящем описании, связывающие анти-SEMA4D-молекулы, например антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, варианты или производные, могут быть введены в фармацев-

тически эффективным количестве для лечения *in vivo* воспалительных расстройств. В этой связи будет понятно, что описанные связывающие молекулы могут быть приготовлены так, чтобы облегчить введение и обеспечить стабильность активного средства. В некоторых вариантах фармацевтические композиции согласно настоящему изобретению содержат фармацевтически приемлемый нетоксичный стерильный носитель, такой как физиологический раствор соли, нетоксичные буферы, консерванты и тому подобное. В целях настоящей заявки фармацевтически эффективное количество связывающей анти-SEMA4D-молекулы, например антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, варианта или производного используется для обозначения количества, достаточного для достижения эффективного связывания с мишенью и для достижения пользы, например для снижения, ингибирования, подавления и/или замедления образования или роста бляшек у пациента с атеросклерозом.

Фармацевтические композиции, применяемые в настоящем изобретении, содержат фармацевтически приемлемые носители, включая, например, ионообменники, оксид алюминия, стеарат алюминия, лецитин, сывороточные белки, такие как сывороточный альбумин человека, буферные вещества, такие как фосфаты, глицин, сорбиновую кислоту, сорбат калия, смеси неполных глицеридов насыщенных растительных жирных кислот, воду, соли или электролиты, такие как сульфат протамина, однозамещенный фосфат натрия, двузамещенный фосфат калия, хлорид натрия, соли цинка, коллоидный диоксид кремния, трисиликат магния, поливинилпирролидон, вещества на основе целлюлозы, полиэтиленгликоль, натрий-карбоксиметилцеллюлозу, полиакрилаты, воски, блок-сополимеры полиэтилен-полиоксипропилен, полиэтиленгликоль и ланолин.

Препараты для парентерального введения включают стерильные водные или неводные растворы, суспензии и эмульсии. Примерами неводных растворителей являются пропиленгликоль, полиэтиленгликоль, растительные масла, такие как оливковое масло, и инъекционные сложные органические эфиры, такие как этилолеат. Водные носители включают, например, воду, водно-спиртовые растворы, эмульсии или суспензии, содержащие физиологический раствор и забуференные среды. В настоящем изобретении фармацевтически приемлемые носители включают без ограничения 0,01-0,1 М, например, 0,05 М фосфатный буфер или 0,8% раствор соли. Другие обычные парентеральные носители включают растворы фосфата натрия, декстрозы Рингера, декстрозы и хлорида натрия, лактатный раствор Рингера или нелетучие масла. Внутривенные носители включают жидкие и питательные добавки, добавки электролитов, такие как добавки на основе раствора декстрозы Рингера и тому подобное. Также могут присутствовать консерванты и другие добавки, такие как, например, противомикробные средства, антиоксиданты, хелатирующие средства и инертные газы и тому подобное.

Более конкретно фармацевтические композиции, подходящие для инъекционного применения, содержат стерильные водные растворы (в случае растворимости в воде) или дисперсии и стерильные порошки для немедленного приготовления перед введением стерильных инъекционных растворов или дисперсий. В таких случаях композиция должна быть стерильной и должна быть жидкой в такой степени, чтобы легко выходить из шприца. Она должна быть стабильной в условиях производства и хранения, и в некоторых аспектах в нее могут быть добавлены консерванты против загрязняющего действия микроорганизмов, таких как бактерии и грибы. Носителем может быть растворитель или дисперсионная среда, содержащая, например, воду, этанол, полиол (например, глицерин, пропиленгликоль и жидкий полиэтиленгликоль и тому подобное) и их подходящие смеси. Правильную текучесть можно поддерживать, например, используя покрытие, такое как лецитин, поддерживая требуемый размер частиц в случае дисперсии и используя поверхностно-активные вещества. Подходящие препараты для применения в способах терапии, раскрытых в настоящем описании, описаны в Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Publishing Co.) 16<sup>th</sup> ed. (1980).

Предотвращение действия микроорганизмов можно достичь, используя различные антибактериальные и противогрибковые средства, например парабены, хлорбутанол, фенол, аскорбиновую кислоту, тимеросал и тому подобные. В некоторых аспектах фармацевтические композиции могут содержать средства для изотоничности, например сахара, полиспирты, такие как маннит, сорбит или хлорид натрия, в композиции. Пролонгированное всасывание инъекционных композиций может быть обусловлено включением в композицию средства, которое замедляет всасывание, например моностеарата алюминия и желатина.

В любом случае стерильные инъекционные растворы могут быть получены путем введения активного соединения (например, анти-SEMA4D-антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, варианта или производного как такового или в сочетании с другими активными средствами) в требуемом количестве в соответствующий растворитель, при необходимости вместе с одним или с сочетанием ингредиентов, перечисленных в настоящем описании, с последующей стерилизацией фильтрованием. Обычно дисперсии готовят путем введения активного соединения в стерильный наполнитель, который содержит основную дисперсионную среду и другие требуемые ингредиенты из тех, которые перечислены выше. В случае стерильных порошков для получения стерильных инъекционных растворов, в некоторых аспектах способы приготовления включают вакуумной сушки и сушки вымораживанием, которые дают порошок активного ингредиента вместе с любым дополнительным нужным ингредиентом из его предварительно стерильно профильтрованного раствора. Препараты для инъекций обрабатывают, наполняют

ими емкости, такие как ампулы, мешки, бутылки, шприцы или флаконы, и герметично закрывают в асептических условиях согласно способам, известным в данной области. Кроме того, препараты могут быть упакованы и могут продаваться в форме набора. Такие изделия производства могут иметь этикетки или вкладыши в упаковку, на которых указано, что имеющиеся композиции применимы для лечения субъекта, страдающего или предрасположенного к заболеванию или расстройству.

Парентеральные препараты могут быть в виде одной болюсной дозы, инфузионной или нагрузочной болюсной дозы с последующей поддерживающей дозой. Такие композиции можно вводить с конкретными фиксированными или переменными интервалами, например один раз в сутки, или на основе "по необходимости".

Некоторые фармацевтические композиции, применяемые в настоящем изобретении, можно вводить перорально в приемлемой форме дозирования, включая, например, капсулы, таблетки, водные суспензии или растворы. Некоторые фармацевтические композиции также можно вводить с использованием назального аэрозоля или ингаляции. Такие композиции могут быть приготовлены в виде растворов в физиологическом растворе с использованием бензилового спирта или других подходящих консервантов, стимуляторов всасывания для усиления биодоступности и/или других обычных солибилизирующих или диспергирующих агентов.

Количество связывающей анти-SEMA4D-молекулы, например антитела или его фрагмента, варианта или производного, которое необходимо объединить с материалами-носителями для получения стандартной лекарственной формы, будет варьировать в зависимости от хозяина, подвергаемого лечению, и конкретного способа введения. Композицию можно вводить в виде однократной дозы, множества доз или на протяжении установленного периода времени при инфузии. Схемы дозирования также можно корректировать для обеспечения оптимального требуемого ответа (например, терапевтического или профилактического ответа).

В соответствии с настоящим изобретением анти-SEMA4D-антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, варианты или производные можно вводить человеку или другому животному в соответствии с вышеуказанными способами лечения в количестве, достаточном для получения терапевтического эффекта. Анти-SEMA4D-антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, варианты или производные можно вводить такому человеку или другому животному в обычной форме дозирования, приготовленной в результате объединения антитела согласно изобретению с обычным фармацевтически приемлемым носителем или разбавителем согласно известным способам. Специалисту в данной области будет понятно, что форма и природа фармацевтически приемлемого носителя или разбавителя продиктованы количеством активного ингредиента, с которым его необходимо объединить, путем введения и другими хорошо известными переменными. Кроме того, специалистам в данной области будет понятно, что можно применять смесь, содержащую один или несколько видов связывающих анти-SEMA4D-молекул, например антител или их антигенсвязывающих фрагментов, вариантов или производных согласно изобретению.

Под "терапевтически эффективной дозой или количеством" или "эффективным количеством" подразумевают количество связывающей анти-SEMA4D-молекулы, например антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, варианта или производного, которое при введении вызывает позитивный терапевтический ответ в отношении лечения пациента с заболеванием, которое необходимо лечить, например замедление образования атеросклеротических бляшек; снижение, задержку или остановку увеличения образования новых атеросклеротических бляшек; ингибирование, например подавление, задержку, предотвращение, остановку или отмену неоваскуляризации в атеросклеротических бляшках; изменение морфологии или функции атеросклеротических бляшек; или облегчение в некоторой степени одного или нескольких симптомов, ассоциированных с атеросклерозом; снижение заболеваемости и смертности; улучшение качества жизни или сочетание таких эффектов.

Терапевтически эффективные дозы композиций согласно настоящему изобретению, например для снижения, ингибирования, подавления и/или замедления образования атеросклеротических бляшек, варьируют в зависимости от многих разных факторов, включая способы введения, целевое место, физиологическое состояние пациента, от того, является ли пациентом человек или животное, других вводимых лекарственных средств и от того, является ли лечение профилактическим или терапевтическим. В некоторых вариантах пациентом является человек, но также можно лечить млекопитающих, отличных от человека. Дозы для лечения можно изменять, используя обычные способы, известные специалистам в данной области, чтобы оптимизировать безопасность и эффективность.

Количество по меньшей мере одной связывающей анти-SEMA4D-молекулы, например антитела или его связывающего фрагмента, варианта или производного, которое необходимо вводить, легко определяет специалист в данной области без излишнего экспериментирования, на основании описания настоящего изобретения. Факторы, влияющие на способ введения и соответствующее количество по меньшей мере одной связывающей анти-SEMA4D-молекулы, например антитела, его антигенсвязывающего фрагмента, варианта или производного, включают без ограничения тяжесть заболевания, историю болезни и возраст, рост, массу, состояние здоровья и физическое состояние индивидуума, подвергаемого лечению. Подобным образом количество связывающей анти-SEMA4D-молекулы, например антитела или фрагмента, его варианта или производного, которое необходимо вводить, будет зависеть от способа ве-

дения и от того, будет ли субъект получать одну дозу или несколько доз данного средства.

Изобретение также относится к применению связывающей анти-SEMA4D-молекулы, например антитела согласно изобретению или его антигенсвязывающего фрагмента, варианта или производного в производстве лекарственного средства для лечения субъекта с воспалительным расстройством, при этом лекарственное средство применяют для субъекта, который был подвергнут предварительному лечению по меньшей мере одним другим средством терапии. Под термином "подвергнутый предварительному лечению" или "предварительное лечение" подразумевают, что субъект получил одно или несколько других терапевтических средств (например, был подвергнут лечению по меньшей мере одним другим средством терапии воспаления) перед получением лекарственного средства, содержащего связывающую анти-SEMA4D-молекулу, например антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, вариант или производное. Термин "подвергнутый предварительному лечению" или "предварительное лечение" включает субъектов, которые были подвергнуты лечению по меньшей мере одним другим средством терапии в течение 2 лет, в течение 18 месяцев, в течение 1 года, в течение 6 месяцев, в течение 2 месяцев, в течение 6 недель, в течение 1 месяца, в течение 4 недель, в течение 3 недель, в течение 2 недель, в течение 1 недели, в течение 6 дней, в течение 5 дней, в течение 4 дней, в течение 3 дней, в течение 2 дней или даже в течение 1 дня перед началом лечения лекарственным средством, содержащим связывающую анти-SEMA4D-молекулу, например моноклональное антитело VX15/2503, раскрытое в настоящем описании, или его антигенсвязывающий фрагмент, вариант или производное. Необязательно, чтобы субъект был субъектом, отвечающим на предварительное лечение предыдущим средством терапии или средствами терапии. Таким образом, субъект, который получает лекарственное средство, содержащее связывающую анти-SEMA4D-молекулу, например антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, вариант или производное, мог отвечать или мог не отвечать на предварительное лечение предыдущую терапию или на одно или несколько предыдущих средств терапии, когда предварительное лечение включало в себя несколько средств терапии.

При практическом осуществлении настоящего изобретения будут использованы, если не указано иное, обычные способы клеточной биологии, культивирования клеток, молекулярной биологии, трансгенной биологии, микробиологии, получения рекомбинантной ДНК и иммунологии, которые известны специалистам в данной области. Такие способы подробно объяснены в литературе. См., например,

Sambrook et al., ed. (1989)

Molecular Cloning A Laboratory Manual (2nd ed.; Cold Spring Harbor Laboratory Press); Sambrook et al., ed. (1992) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, (Cold Springs Harbor Laboratory, NY); D. N. Glover ed., (1985) DNA Cloning, Volumes I and II; Gait, ed. (1984) Oligonucleotide Synthesis; Mullis et al. патент США № 4683195; Hames and Higgins, eds. (1984) Nucleic Acid Hybridization; Hames and Higgins, eds. (1984) Transcription and Translation; Freshney (1987) Culture Of Animal Cells (Alan R. Liss, Inc.); Immobilized Cells and Enzymes (IRL Press) (1986); Perbal (1984) A Practical Guide To Molecular Cloning; the treatise, Methods In Enzymology (Academic Press, Inc., N.Y.); Miller and Calos eds. (1987) Gene Transfer Vectors For Mammalian Cells, (Cold Spring Harbor Laboratory); Wu et al., eds., Methods In Enzymology, Vols. 154 и 155; Mayer and Walker, eds. (1987) Immunochemical Methods In Cell and Molecular Biology (Academic Press, London); Weir and Blackwell, eds., (1986) Handbook Of Experimental Immunology, Volumes I-IV; Manipulating the Mouse Embryo, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., (1986); и в Ausubel et al. (1989) Current Protocols in Molecular Biology (John Wiley and Sons, Baltimore, Md.).

Общие принципы конструирования антител приведены в публикации Borrebaeck, ed. (1995) Antibody Engineering (2nd ed.; Oxford Univ. Press). Общие принципы конструирования белков указаны в



Rickwood et al., eds. (1995) *Protein Engineering, A Practical Approach* (IRL Press at Oxford Univ. Press, Oxford, Eng.). Общие принципы антител и связывания антитело-гаптен приведены в: Nisonoff (1984) *Molecular Immunology* (2nd ed.; Sinauer Associates, Sunderland, Mass.); и Steward (1984) *Antibodies, Their Structure and Function* (Chapman и Hall, New York, N.Y.).

Кроме того, в случае стандартных способов иммунологии, известных в данной области и специально не описанных, обычно следуют указаниям, представленным в

Current Protocols in Immunology, John Wiley and Sons, New York; Stites et al., eds. (1994) *Basic and Clinical Immunology* (8th ed; Appleton & Lange, Norwalk, Conn.) и Mishell and Shiigi (eds) (1980) *Selected Methods in Cellular Immunology* (W.H. Freeman and Co., NY).

Стандартные эталонные работы, в которых приведены основные принципы иммунологии, включают

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

Все публикации, цитированные выше, а также все публикации, цитированные в настоящем описании, включены в настоящее описание в виде ссылки в полном объеме.

Следующий пример предлагается в качестве иллюстрации, но не в качестве ограничения.

#### Пример

Тестирование способности связывающей анти-SEMA4D-молекулы, например антитела или антигенсвязывающего фрагмента, его варианта или производного, например VX15/2503, ингибировать образование атеросклеротических бляшек и уменьшать неоваскуляризацию у спонтанно гиперлипидемических мышей (SHL) с недостаточностью ApoE.

Дизайн эксперимента.

В следующем эксперименте исследовали, может ли лечение склонных к атеросклерозу спонтанно гиперлипидемических мышей (SHL) с недостаточностью ApoE блокирующим анти-Sema4D-антителом снижать рост бляшек и неоваскуляризацию.

Мыши.

Самцов спонтанно гиперлипидемических мышей (SHL) с недостаточностью аполипопротеида E (ApoE) с генетическим фоном C57BL/6, C57BL/6.KOR/Stm Slc-Apoe<sup>shl</sup> получали из Japan SLC, Inc. (Shizuoka, Japan). Мышей SHL кормили обычным кормом и содержали в центре для животных на факультете фармации университета Мейджо. Все экспериментальные протоколы были одобрены Институтским экс-

пертным этическим комитетом по обращению с животными.

Лечение мышей антителами.

Самцов мышей SHL 14-недельного возраста случайным образом распределили на две группы, и каждой группе вводили либо контрольное мышинное моноклональное антитело (n=10) (контрольное Ат 2B8.1E7, Vaccinex, Inc., Rochester, NY), либо мышинное нейтрализующие моноклональное анти-SEMA4D-антитело (n=9) (VX15/67-2, Vaccinex, Inc.) в дозе 0,6 мг на мышь посредством внутрибрюшинной инъекции один раз в неделю. После 12 недель лечения мышей умерщвляли.

Обработка тканей.

Аорту мышей перфузировали в течение 3 мин иглой 21 калибра, введенной в верхушку левого желудочка, используя фосфатно-солевой буфер (PBS), и затем еще в течение 3 мин забуференным 4% параформальдегидом (pH 7,4). Дугу аорты с ее основными точками ветвления (бронхицефалический ствол, левая общая сонная артерия и левая подключичная артерия), а также грудную и брюшную аорту вырезали и фиксировали в забуференном 4% параформальдегиде (pH 7,4). Затем аорту красили Суданом IV (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), чтобы выявить накопление суданофильной жидкости, и площадь липидных бляшек в процентах от общей площади аорты вычисляли, используя компьютерную программу Изображение-J (Wayne Rasband, NIH, Bethesda, MD), следуя способу, описанному в литературе (Dougherty A et al., *Methods in Molecular Biology*, vol. 209: Transgenic Mouse Methods and Protocols. Humana Press Inc., Totowa, NJ, pp.293-309, 2002).

Иммуногистохимия и морфометрия.

Дугу аорты, вырезанную у анестезированных мышей, фиксировали в забуференном 4% параформальдегиде (pH 7,4). Все сосуды продольно заливали в парафин и нарезали на серийные срезы толщиной 1 мкм. Срезы иммунологически метили антителом против CD31 мыши (BD, Franklin Lakes, NJ), чтобы покрасить эндотелиальные клетки. Затем их инкубировали с полимером декстраном, конъюгированным со вторыми антителами, и пероксидазой (DakoCytomation, Kyoto, Japan). Чтобы выявить неоваскуляризацию, срезы предварительно обрабатывали протеиназой К в концентрации 10 мкг/мл (Life technologies Japan, Tokyo, Japan) в течение 15 мин при комнатной температуре и инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре с 7,5 мг/мл изолектина B4 из *Bandeiraea simplicifolia*, конъюгированного с флуоресцеином (Sigma-Aldrich). Изолектин B4 (IB4) связывается с концевыми остатками  $\alpha$ -галактозила, экспрессируемыми эндотелиальными клетками. Степень неоваскуляризации определяли делением площади, позитивной по изолектину B4 или позитивной по CD31, на соответствующую площадь бляшек, используя систему морфометрии Изображение-J (Wayne Rasband).

Статистический анализ.

Данные выражали в виде средних  $\pm$ S.E. Обработанных анти-Sema4D-антителом мышей SHL сравнивали с обработанными контрольным антителом мышами SHL, используя t-критерий Стьюдента. Данные были статистически значимыми при \*  $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ .

Обработка анти-Sema4D-антителом ингибировала развитие атеросклеротических бляшек. Чтобы проанализировать влияние обработки анти-Sema4D-антителом у мышей SHL с недостаточностью ApoE на развитие атеросклероза, аорты, вырезанные у обработанных контрольным антителом и обработанных анти-Sema4D-антителом мышей SHL, подвергали суданофильному окрашиванию липидных отложений. На фиг. 1A показано значимое ингибирование развития атеросклеротических бляшек в областях аорты у обработанных анти-Sema4D-антителом мышей SHL по сравнению с группой, обработанной контрольным антителом. Как показано на фиг. 1A, количественное измерение площадей атеросклеротических бляшек показывает, что средний процент суданофильных площадей относительно всей области аорты у обработанных анти-Sema4D-антителом мышей SHL был значительно меньше, чем в группе, обработанной контрольным антителом (мышь, обработанные анти-Sema4D-антителом:  $4,89 \pm 1,11\%$  по сравнению с мышами, обработанными контрольным антителом:  $17,64 \pm 3,41\%$ ;  $p = 0,002$ ). Полученные данные демонстрируют, что применение анти-SEMA4D-антитела для блокирования активности Sema4D во время фазы прогрессирования атеросклероза уменьшает рост бляшек.

Уменьшенная неоваскуляризация в атеросклеротических бляшках у обработанных анти-Sema4D-антителом мышей SHL.

Чтобы исследовать образование новых сосудов в атеросклеротических бляшках, использовали окрашивание изолектином B4 для выявления неоваскуляризации как в бляшках, обработанных контрольным антителом SHL, так и в бляшках, обработанных анти-Sema4D-антителом SHL. Результаты показали, что процент позитивного окрашивания изолектином B4 в обработанных анти-Sema4D-антителом бляшках был значительно ниже, чем в бляшках, обработанных контрольным антителом (обработанные анти-Sema4D-антителом мыши SHL:  $0,35 \pm 0,04\%$  по сравнению с обработанным контрольным антителом мышами SHL:  $1,70 \pm 0,24\%$ ;  $P < 0,001$ , фиг. 1B).

Иммуногистохимия с использованием антител против CD31, маркера эндотелиальных клеток, также показала, что CD31-позитивные области были значимо уменьшены в бляшках у обработанных анти-Sema4D-антителом мышей SHL по сравнению с бляшками обработанных контрольным антителом мышей SHL (обработанные анти-Sema4D-антителом мыши SHL:  $12,62 \pm 1,34\%$  по сравнению с обработан-

ными контрольным антителом мышами SHL:  $19,30 \pm 1,22\%$ ;  $P=0,012$ , фиг. 1С), подчеркивая плохую неоваскуляризацию в бляшках обработанных анти-Sema4D-антителом мышей SHL.

Полученные данные демонстрируют, что блокирование активности Sema4D во время фазы прогрессирования атеросклероза действует, снижая неоваскуляризацию. Кроме того, данные демонстрируют, что анти-SEMA4D-антитело блокирует миграцию эндотелиальных клеток-предшественников в атеросклеротическую бляшку, что, в свою очередь, приводит к снижению как неоваскуляризации бляшек, так и роста бляшек.

Множество модификаций и других вариантов осуществления изобретения, указанных в настоящем описании, может придумать специалист в области, к которой относится изобретение, с помощью руководств, представленных в приведенном выше описании и на связанных с описанием чертежах. Таким образом, следует понимать, что изобретение не ограничено конкретными раскрытыми вариантами и что предполагается, что модификации и другие варианты осуществления изобретения включены в объем прилагаемой формулы изобретения и список вариантов, раскрытых в настоящем описании. Хотя в настоящем описании использованы конкретные термины, они использованы только в обобщенном и описательном смысле, но не целях ограничения.

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ ингибирования, подавления, снижения или замедления роста атеросклеротических бляшек у субъекта, имеющего атеросклероз, включающий введение субъекту эффективного количества изолированного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которые специфично связываются с семафорином-4D (SEMA4D);

в котором антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит переменную тяжелую цепь (VH), содержащую VHCDR 1-3, содержащие последовательности SEQ ID NO: 6, 7 и 8 соответственно, и переменную легкую цепь (VL), содержащую VLCDR 1-3, содержащие последовательности SEQ ID NO: 14, 15 и 16 соответственно; и

в котором антитело или его антигенсвязывающий фрагмент ингибирует SEMA4D-опосредованную трансдукцию сигнала плексина-B1.

2. Способ по п.1, в котором антитело или его антигенсвязывающий фрагмент может ингибировать, замедлять или снижать неоваскуляризацию вокруг атеросклеротических бляшек у указанного субъекта.

3. Способ по п.1, в котором антитело или его антигенсвязывающий фрагмент ингибирует взаимодействие SEMA4D с его рецептором.

4. Способ по п.3, в котором рецептором является плексин-B1 или плексин-B2.

5. Способ по п.1, в котором субъект имеет сердечно-сосудистое заболевание.

6. Способ по п.5, в котором сердечно-сосудистое заболевание выбрано из группы, состоящей из коронарной болезни сердца (также ишемической болезни сердца или болезни коронарных артерий), кардиомиопатии, гипертензивной кардиопатии, сердечной недостаточности, легочного сердца, сердечных аритмий, воспалительного заболевания сердца эндокардита, воспалительной кардиомегалии, миокардита, порока клапана сердца, цереброваскулярного заболевания, болезни периферических артерий, врожденного порока сердца, ревматической болезни сердца и их сочетания.

7. Способ по п.1, в котором VH и VL содержат соответственно последовательности SEQ ID NO: 9 и SEQ ID NO: 17 или SEQ ID NO: 10 и SEQ ID NO: 18.

8. Способ ингибирования, замедления, снижения или замедления неоваскуляризации вокруг или в области бляшек у субъекта, имеющего атеросклероз, включающий введение субъекту эффективного количества изолированного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которые специфично связываются с семафорином-4D (SEMA4D);

в котором антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит переменную тяжелую цепь (VH), содержащую VHCDR 1-3, содержащие последовательности SEQ ID NO: 6, 7 и 8 соответственно, и переменную легкую цепь (VL), содержащую VLCDR 1-3, содержащие последовательности SEQ ID NO: 14, 15 и 16 соответственно;

в котором антитело или его антигенсвязывающий фрагмент ингибирует SEMA4D-опосредованную трансдукцию сигнала плексина-B1.

9. Способ по п.8, в котором антитело или его антигенсвязывающий фрагмент ингибирует взаимодействие SEMA4D с его рецептором.

10. Способ по п.9, в котором рецептором является плексин-B1.

11. Способ по п.8, в котором субъект имеет сердечно-сосудистое заболевание.

12. Способ по п.11, в котором сердечно-сосудистое заболевание выбрано из группы, состоящей из коронарной болезни сердца (также ишемической болезни сердца или болезни коронарных артерий), кардиомиопатии, гипертензивной кардиопатии, сердечной недостаточности, легочного сердца, сердечных аритмий, воспалительного заболевания сердца эндокардита, воспалительной кардиомегалии, миокардита, порока клапана сердца, цереброваскулярного заболевания, болезни периферических артерий, врожденного порока сердца, ревматической болезни сердца и их сочетания.

13. Способ по п.8, в котором VH и VL содержат соответственно последовательности SEQ ID NO: 9 и SEQ ID NO: 17 или SEQ ID NO: 10 и SEQ ID NO: 18.

14. Способ лечения субъекта, имеющего атеросклероз, включающий введение субъекту, у которого определено наличие атеросклеротических бляшек, эффективного количества изолированного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которые специфично связываются с семафорином-4D (SEMA4D), тем самым ингибуя, замедляя, снижая или замедляя рост атеросклеротических бляшек;

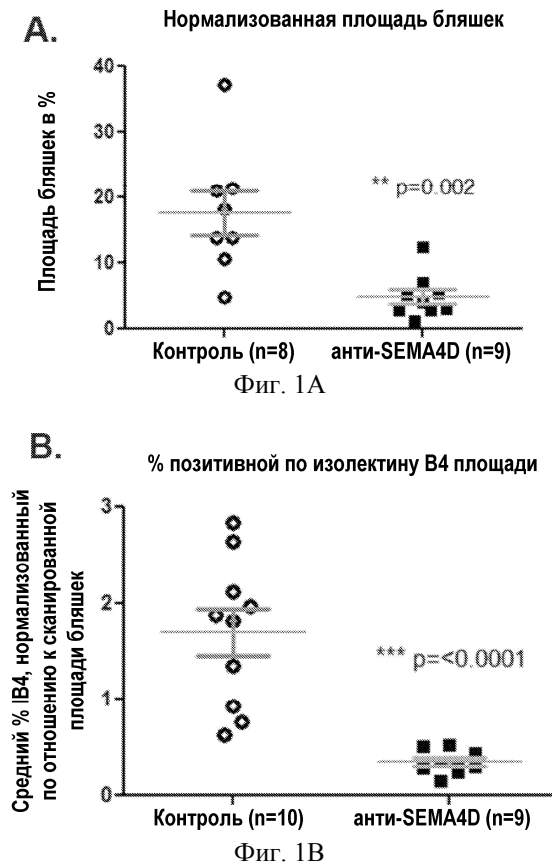
в котором антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит переменную тяжелую цепь (VH), содержащую VHCDR 1-3, содержащие последовательности SEQ ID NO: 6, 7 и 8 соответственно, и переменную легкую цепь (VL), содержащую VLCDR 1-3, содержащие последовательности SEQ ID NO: 14, 15 и 16 соответственно;

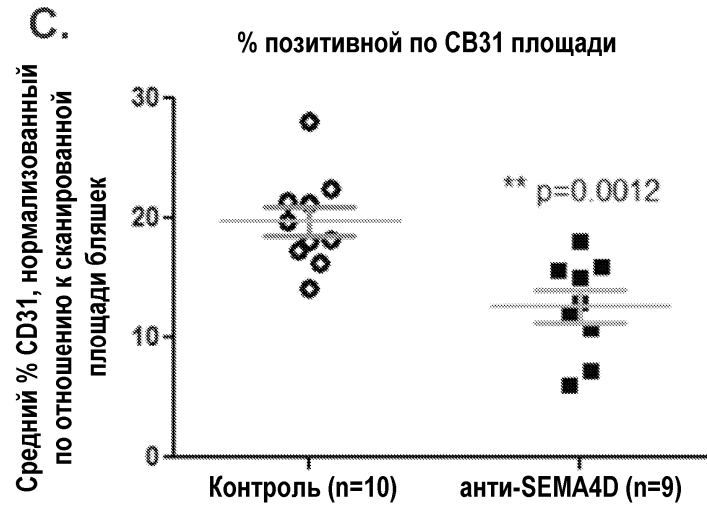
в котором антитело или его антигенсвязывающий фрагмент ингибирует SEMA4D-опосредованную трансдукцию сигнала плексина-B1.

15. Способ по п.14, в котором указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент ингибирует взаимодействие SEMA4D с его рецептором.

16. Способ по п.15, в котором указанный рецептор представляет собой плексин-B1.

17. Способ по п.14, в котором VH и VL содержат соответственно последовательности SEQ ID NO: 9 и SEQ ID NO: 17 или SEQ ID NO: 10 и SEQ ID NO: 18.





Фиг. 1С

