

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **048015**

(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2024.10.21

(21) Номер заявки
202193038

(22) Дата подачи заявки
2020.05.08

(51) Int. Cl. **C07K 16/18** (2006.01)
A61P 27/02 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)

(54) АНТИТЕЛА ПРОТИВ СЕМАЗА И ИХ ПРИМЕНЕНИЯ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ЗАБОЛЕВАНИЙ ГЛАЗ

(31) 19173454.0

(32) 2019.05.09

(33) EP

(43) 2022.03.30

(86) PCT/EP2020/062802

(87) WO 2020/225400 2020.11.12

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**БЁРИНГЕР ИНГЕЛЬХАЙМ
ИНТЕРНАЦИОНАЛЬ ГМБХ (DE)**

(72) Изобретатель:
**Томас Лео (DE), Барретт Рэйчел
Ребекка, Боват Кристин Лора,
Ганешан Раджкumar, Гупта Прианка,
Хань Фэй, Лю Дунмэй (US), Престле
Йюрген (DE), Сингх Санджая,
Венкатарамани Сатхьядеви, У Хелен
Хайся (US), Циппель Нина (DE)**

(74) Представитель:
**Веселицкий М.Б., Кузенкова Н.В.,
Каксис Р.А., Белоусов Ю.В., Куликов
А.В., Кузнецова Е.В., Соколов Р.А.,
Кузнецова Т.В. (RU)**

(56) NAOYA YAMASHITA ET AL. "Anti-Semaphorin 3A neutralization monoclonal antibody prevents sepsis development in lipopolysaccharide-treated mice", INTERNATIONAL IMMUNOLOGY, vol. 27, no. 9, 7 April 2015 (2015-04-07), pages 459-466, XP055280232, ISSN: 0953-8178, DOI: 10.1093/intimm/dxv014 page 460, left-hand column, paragraph 4 - right-hand column, paragraph 1 page 463, left-hand column, paragraph 2 page 463, right-hand column, paragraph 1 figure 4

EP-A1-2955195

EP-A1-3385281

WO-A1-2014127479

SHIRVAN ANAT ET AL. "Anti-semaphorin 3A antibodies rescue retinal ganglion cells from cell death following optic nerve axotomy", JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 277, no. 51, 20 December 2002 (2002-12-20), pages 49799-49807, XP002483825, ISSN: 0021-9258, DOI: 10.1074/JBC.M204793200, [retrieved on 2002-10-09], page 49800, right-hand column, paragraph 4 - page 49801, left-hand column, paragraph 1, abstract, page 49806, left-hand column, paragraph 3

HAYNES SHEK HEI YUAN ET AL. "A mechanism for semaphorin-induced apoptosis: DNA damage of endothelial and myogenic cells in primary cultures from skeletal muscle", ONCOTARGET, vol. 9, no. 32, 27 April 2018 (2018-04-27), XP055633014, United States ISSN: 1949-2553, DOI: 10.18632/oncotarget.25200, figure 3, page 22626, right-hand column, paragraph 4

PAOLO GIACOBINI ET AL. "Brain Endothelial Cells Control Fertility through Ovarian-Steroid-Dependent Release of Semaphorin 3A", PLOS BIOLOGY, vol. 12, no. 3, 11 March 2014 (2014-03-11), page e1001808, XP055633040, DOI: 10.1371/journal.pbio.1001808 page 15, left-hand column, paragraph 4

WO-A1-2013005603

(57) Изобретение относится к антителам и их фрагментам, нацеленным на семафорин 3А (Sema3A). Более конкретно, раскрыты антитела против Sema3A и способы применения для лечения различных заболеваний или расстройств.

B1

048015

048015 B1

Область техники, к которой относится изобретение

Изобретение, в целом относится к антителам и их фрагментам, которые нацелены на семафорин 3А (Sema3A). Более конкретно, описаны антитела против Sema3A и способы их применения для лечения различных заболеваний или нарушений. Также описаны фармацевтические композиции и наборы, содержащие антитело против Sema3A.

Предпосылки создания изобретения

Ишемические ретинопатии характеризуются потерей или дисфункцией сосудистой сети сетчатки глаза, что приводит к снижению кровотока и гипоксии. Ишемия сетчатки приводит к усилению регуляции проангиогенных факторов роста, которые способствуют неоваскуляризации сетчатки, что может привести к слепоте. Однако ревазуляризации ишемической сетчатки не происходит, когда имеется сильная патологическая неоваскуляризация стекловидного тела, области глаза, обычно лишенной кровеносных сосудов.

Рост этих аномальных новых сосудов представляет большую опасность для зрения, поскольку они могут подтекать, приводить к кровотечению или вызывать рубцевание, которое может закончиться отслоением сетчатки. Современные методы лечения ишемической ретинопатии ориентированы на остановку роста патологических сосудов, но не устраняют лежащую в основе ишемию, которая стимулирует их рост. Кроме того, стандартное лечение диабетической ретинопатии включает разрушение части сетчатки с помощью лазера в попытке остановить рост новых сосудов и сохранить центральное зрение. Тем не менее, эти методы лечения в определённой степени являются неэффективными. Хотя некоторые пациенты могут сохранять стабильное зрение в течение многих лет, высокий процент пациентов, имеющих ретинопатию, в конечном итоге страдает от полной потери зрения.

Следовательно, все еще существует неудовлетворённая потребность в новых терапевтических подходах для эффективного лечения заболеваний глаз или сетчатки.

Краткое изложение сущности изобретения

Sema3A представляет собой эндогенный секретируемый белок, который принадлежит к семейству семафоринов класса 3 (Sema3), которые первоначально были идентифицированы как молекулы, направляющие аксоны и участвующие в поиске путей в сосудах и формировании сети. Нейропилин 1 и 2 (Nrp1 и Nrp2) и плексины типа A/D (Plxns) действуют как связывающие лиганды и передающие сигналы субъединицы рецепторных комплексов Sema3 на поверхности эндотелиальных клеток (ЭК). Как особый член семейства Sema3, Sema3A сначала связывается исключительно с Nrp1, а затем соединяется с PlexinA1-4 в виде комплекса (Nrp1/PlexA1-4). В этом рецепторном комплексе Nrp1 действует как связывающий элемент, тогда как PlexA1-4 действует как элемент, передающий сигнал.

Семафорин 3А человека представляет собой белок, описанный в SEQ ID NO: 22 и доступный под ссылкой по последовательности NCBI NP_006071.1. Кроме того, Sema3A человека кодируется геном ID: 10371 (NCBI).

В течение многих лет Sema3A изучали в отношении ангиогенеза и метастазирования опухолей, но его влияние на неоваскуляризацию сетчатки все еще неясно. Изобретатели продемонстрировали, что семафорин 3А секретируется гипоксическими ганглиозными клетками сетчатки и действует как вазорепульсивный сигнал. Sema3A отталкивает новые сосуды от ишемической области, вызывая коллапс цитоскелета в этих клетках. Не желая быть связанными теорией, изобретатели предположили, что это могло бы объяснить, почему не происходит ревазуляризации ишемических областей, а вместо этого повышающая регуляция Sema3A приводит к патологической неоваскуляризации в области стекловидного тела.

Семафорин 3А секретируется гипоксическими нейронами в ишемической/ бессосудистой сетчатке, тем самым подавляя регенерацию сосудов сетчатки и усиливая патологическую преретинальную неоваскуляризацию.

Авторы изобретения обратились к этой патологической ситуации, разработав антитела, нацеленные на Sema3A. Таким образом, настоящее изобретение обеспечивает моноклональные антитела, которые специфически связываются с Sema3A, предпочтительно с Sema3A человека.

В первом аспекте настоящее изобретение обеспечивает антитело против Sema3A или его антиген-связывающий фрагмент, которые содержат:

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1 (H-CDR1); аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2 (H-CDR2); и аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3 (H-CDR3); и

вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4 (L-CDR1); аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5 (L-CDR2); и аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6 (L-CDR3).

В другом варианте осуществления настоящее изобретение обеспечивает антитело против Sema3A или его антигенсвязывающий фрагмент, которые содержат:

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8,

SEQ ID NO: 9 или SEQ ID NO: 10; и

вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12 или SEQ ID NO: 13;

при этом:

вариабельная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1 (H-CDR1); аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2 (H-CDR2); и аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3 (H-CDR3); и

вариабельная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4 (L-CDR1); аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5 (L-CDR2); и аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6 (L-CDR3).

В другом варианте осуществления настоящее изобретение обеспечивает антитело против Sema3A или его антигенсвязывающий фрагмент, которые содержат:

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 или SEQ ID NO: 10; и

вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12 или SEQ ID NO: 13.

В еще одном варианте осуществления настоящее изобретение обеспечивает антитело против Sema3A или его антигенсвязывающий фрагмент, которые содержат:

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 или SEQ ID NO: 10; и

вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12 или SEQ ID NO: 13.

В другом варианте осуществления, настоящее изобретение обеспечивает антитело против Sema3A или его антигенсвязывающий фрагмент, которые содержат:

а. вариабельную тяжелую цепь и вариабельную легкую цепь, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 7 и SEQ ID NO: 11, соответственно;

б. вариабельную тяжелую цепь и вариабельную легкую цепь, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 8 и SEQ ID NO: 11, соответственно;

в. вариабельную тяжелую цепь и вариабельную легкую цепь, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 9 и SEQ ID NO: 12, соответственно; или

г. вариабельную тяжелую цепь и вариабельную легкую цепь, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 10 и SEQ ID NO: 13, соответственно.

В еще одном варианте осуществления, настоящее изобретение обеспечивает антитело против Sema3A или его антигенсвязывающий фрагмент, которые содержат:

тяжелую цепь, содержащую, предпочтительно состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, или SEQ ID NO: 19; и

легкую цепь, содержащую, предпочтительно состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 18 или SEQ ID NO: 20.

В конкретном варианте осуществления изобретение относится к антителу против Sema3A или его антигенсвязывающему фрагменту, которые содержат:

а. тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14 и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15;

б. тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16 и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15;

в. тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17 и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18; или

г. тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19 и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20.

В конкретном предпочтительном варианте осуществления антитело против Sema3A представляет собой гуманизованное антитело против Sema3A.

Во втором аспекте настоящее изобретение обеспечивает антитело против Sema3A или его антигенсвязывающий фрагмент, который связывается по меньшей мере с одним аминокислотным остатком в аминокислотных областях 370-382 Sema3A человека, как показано в SEQ ID NO: 22.

В одном варианте осуществления настоящее изобретение обеспечивает антитело против Sema3A или его антигенсвязывающий фрагмент, который связывается по меньшей мере с одним аминокислотным остатком в аминокислотных областях как указано в SEQ ID NO: 21 (DSTKDLPPDDVITF). В предпоч-

тельном варианте осуществления настоящее изобретение обеспечивает антитело против Sema3A или его антигенсвязывающий фрагмент, который связывает аминокислотные области, как указано в SEQ ID NO: 21.

В третьем аспекте настоящее изобретение обеспечивает антитело против Sema3A или его антигенсвязывающий фрагмент для применения в качестве лекарственного средства.

В одном варианте осуществления настоящее изобретение обеспечивает антитело против Sema3A или антигенсвязывающий фрагмент для ингибирования вазорепрессивного действия SemaA, и/или для улучшения ревазуляризации сетчатки.

В одном варианте осуществления настоящее изобретение обеспечивает антитело против Sema3A или его антигенсвязывающий фрагмент для применения в лечении или профилактике заболеваний сетчатки или глаз.

В четвертом аспекте настоящее изобретение обеспечивает антитело против Sema3A или его антигенсвязывающий фрагмент для применения в лечении или предупреждения заболевания, выбранного из группы, включающей в себя ретинопатию, ишемическую ретинопатию, диабетическую ретинопатию, включая пролиферативную диабетическую ретинопатию и непролиферативную диабетическую ретинопатию, диабетический отёк желтого пятна, диабетическую ишемию желтого пятна, возрастную дегенерацию желтого пятна, пигментный ретинит, наследственную дистрофию сетчатки, миопическую дегенерацию, окклюзию артерий сетчатки, эндофтальмит, увеит, кистозный макулярный отёк, хориоидальную неоваскулярную мембрану, вторичную по отношению к любым заболеваниям сетчатки, оптические невропатии, глаукому, отслоение сетчатки, токсическую ретинопатию, лучевую ретинопатию, травматическую ретинопатию, медикаментозно индуцированную васкулопатию сетчатки, неоваскуляризацию сетчатки, полипидную хориоидальную васкулопатию, васкулит сетчатки, микроаневризму сетчатки, дистрофию Фуха, телеангиэктазию желтого пятна, синдром Ушера и болезнь Штаргардта.

В другом варианте осуществления, настоящее изобретение обеспечивает антитело против Sema3A или его антигенсвязывающий фрагмент для применения в лечении или предупреждения заболевания, выбранного из группы, включающей в себя диабетическую ретинопатию, включая пролиферативную диабетическую ретинопатию и непролиферативную диабетическую ретинопатию, ишемическую ретинопатию, диабетический отёк желтого пятна, диабетическую ишемию желтого пятна, возрастной отёк жёлтого пятна, неоваскуляризацию сетчатки, глаукому и хориоидальную неоваскуляризацию. Предпочтительно, указанное заболевание представляет собой диабетический отёк желтого пятна и/или диабетическую ишемию желтого пятна.

В предпочтительном варианте осуществления настоящее изобретение обеспечивает антитело против Sema3A или его антигенсвязывающий фрагмент для применения в лечении диабетической ишемии желтого пятна, способствуя регенерации сосудов в ишемической сетчатке (ревазуляризация) и предотвращая патологическую неоваскуляризацию стекловидного тела глаза.

В другом предпочтительном варианте осуществления настоящее изобретение обеспечивает антитело против Sema3A или его антигенсвязывающий фрагмент для применения в лечении диабетического отека желтого пятна, за счет снижения проницаемости гемато-ретиального барьера.

В другом предпочтительном варианте осуществления, настоящее изобретение обеспечивает антитело против Sema3A или его антигенсвязывающий фрагмент для ингибирования индуцированной посредством Sema3A проницаемости гемато-ретиального барьера и/или индуцированной посредством Sema3A вазорегрессии из ишемических областей.

В пятом аспекте настоящее изобретение обеспечивает фармацевтическую композицию, содержащую антитело против Sema3A или его антигенсвязывающий фрагмент и фармацевтически приемлемый носитель.

В одном варианте осуществления, настоящее изобретение обеспечивает антитело против Sema3A или его антигенсвязывающий фрагмент или фармацевтическую композицию, содержащую антитело против Sema3A или его антигенсвязывающий фрагмент, при этом указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент вводят парентеральным путем, внутривенным путем, интравитреальным путем или путем подкожного введения, предпочтительно интравитреальным путем.

В шестом аспекте настоящее изобретение обеспечивает выделенный полинуклеотид или полинуклеотиды, содержащие:

последовательность, кодирующую тяжелую цепь, как представлено в SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17 или SEQ ID NO: 19, или вариабельную область тяжелой цепи, как представлено в SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 или SEQ ID NO: 10; и

последовательность, кодирующую легкую цепь, как представлено в SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 18 или SEQ ID NO: 20, или вариабельную область легкой цепи, как представлено в SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12 или SEQ ID NO: 13.

В одном варианте осуществления настоящее изобретение обеспечивает вектор экспрессии, содержащий выделенный полинуклеотид или полинуклеотиды, содержащие последовательность, кодирующую тяжелую цепь, как представлено в SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, или SEQ ID NO: 19 или вариабельную область тяжелой цепи, как представлено в SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID

NO: 9 или SEQ ID NO: 10; и последовательность, кодирующую легкую цепь, как представлено в SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 18 или SEQ ID NO: 20 или вариабельную область легкой цепи, как представлено в SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12 или SEQ ID NO: 13.

В одном варианте осуществления настоящее изобретение обеспечивает вирусный вектор, содержащий выделенный полинуклеотид или полинуклеотиды, содержащие последовательность, кодирующую тяжелую цепь, как представлено в SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, или SEQ ID NO: 19 или вариабельную область тяжелой цепи, как представлено в SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 или SEQ ID NO: 10; и последовательность, кодирующую легкую цепь, как представлено в SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 18 или SEQ ID NO: 20 или вариабельную область легкой цепи, как представлено в SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12 или SEQ ID NO: 13.

В одном варианте осуществления настоящее изобретение обеспечивает клетку-хозяина, содержащую вектор экспрессии или выделенный полинуклеотид или полинуклеотиды, содержащие последовательность, кодирующую тяжелую цепь, как представлено в SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17 или SEQ ID NO: 19, или вариабельную область тяжелой цепи, как представлено в SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 или SEQ ID NO: 10; и последовательность, кодирующую легкую цепь, как представлено в SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 18 или SEQ ID NO: 20, или вариабельную область легкой цепи, как представлено в SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12 или SEQ ID NO: 13.

В одном варианте осуществления, настоящее изобретение обеспечивает способ получения антитела против Sema3A или его антигенсвязывающего фрагмента, которые содержат полученную клетку-хозяина, содержащую вектор экспрессии или выделенный полинуклеотид или полинуклеотиды, содержащие последовательность, кодирующую тяжелую цепь, как представлено в SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, или SEQ ID NO: 19 или вариабельную область тяжелой цепи, как представлено в SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 или SEQ ID NO: 10; и последовательность, кодирующую легкую цепь, как представлено в SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 или SEQ ID NO: 10 или вариабельную область легкой цепи, как представлено в SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12 или SEQ ID NO: 13; и культивирование клетки-хозяина.

В одном варианте осуществления способ получения антитела против Sema3A или его антигенсвязывающего фрагмента дополнительно содержит восстановление и очистку антитела против Sema3A или его антигенсвязывающего фрагмента.

Краткое описание чертежей

Фиг. 1: Локализация Sema3A в глазах человека.

На этой фигуре показана локализация Sema3A в глазах человека в предварительно определенных образцах сетчатки от людей-доноров с историей диабетической ретинопатии или первичной открытоугольной глаукомы (ПОУГ) в сравнении с контрольной группой соответствующего возраста (возрастной контроль) и субъектами с диабетом, но без глазной патологии (СД контроль). Sema3A был обнаружен в стенке сосудистой сети кровеносных сосудов сетчатки. Кроме того, в слое ганглиозных клеток сетчатки наблюдались неопознанные, но отличительные флуоресцентные объекты Sema3A.

Фиг. 2: Эффективность в анализе клеточной проницаемости.

Проникновение FITC-декстрана в эндотелиальные клетки микрососудов сетчатки человека измеряют с помощью трансвел-анализа. Против ТНФ представляет собой контрольное антитело против тринитрофенола. Против Sema3A представляет собой антитело в соответствии с изобретением (клон I). Показана значимость по сравнению с рекомбинантным Sema3A человека.

Фиг. 3: Коллапс цитоскелета в HRMEC (Xcelligence).

Все Sema3A-F вызывают коллапс цитоскелета в эндотелиальных клетках сетчатки человека. Антитело в соответствии с изобретением (клон I) является специфическим для Sema3A и предотвращает только индуцированный посредством Sema3A коллапс.

Фиг. 4: Эффективность в отношении плотности ведущих клеток и бессосудистой области *in vivo*.

(А) и (С) Плотность ведущих клеток и бессосудистая область были исследованы на модели индуцированной кислородом ретинопатии у детенышей мышей. Животных подвергали воздействию 75% кислорода от P7 до P12, и они получали однократную интравитреальную инъекцию антитела после возвращения к нормоксии на P12. Против ТНФ представляет собой контрольное антитело против тринитрофенола. Против Sema3A представляет собой антитело в соответствии с изобретением (клон I). На P17 готовили плоские срезы сетчатки, окрашенные изолектином В4 и использовали для подсчета ведущих клеток и определения размера бессосудистой области сетчатки.

(В) Показана корреляция между плотностью ведущих клеток и бессосудистой областью.

Подробное описание изобретения

Определения

Обобщенная структура антител или иммуноглобулина хорошо известна специалистам в данной области техники, эти молекулы представляют собой гетеротетрамерные гликопротеины, как правило, примерно 150000 дальтон, состоящие из двух идентичных легких (L) цепей и двух идентичных тяжелых (H) цепей. Каждая легкая цепь ковалентно связана с тяжелой цепью одной дисульфидной связью с образованием гетеродимера, а гетеротетрамерная молекула образуется за счет ковалентной дисульфидной связи

между двумя идентичными тяжелыми цепями гетеродимеров. Хотя легкая и тяжелая цепи связаны вместе одной дисульфидной связью, количество дисульфидных связей между двумя тяжелыми цепями варьируется в зависимости от изоформа иммуноглобулина. Каждая тяжелая и легкая цепь также имеет равномерно распределенные внутрицепочечные дисульфидные мостики. Каждая тяжелая цепь имеет на аминоконце переменный домен (V_H = переменная тяжелая цепь), за которым следуют три или четыре константных домена (C_{H1} , C_{H2} , C_{H3} и C_{H4}), а также шарнирную область между C_{H1} и C_{H2} . Каждая легкая цепь имеет два домена, аминоконцевой переменный домен (V_L = переменная легкая цепь) и карбоксиконцевой константный домен (C_L). Домен V_L нековалентно связывается с доменом V_H , тогда как домен C_L обычно ковалентно связан с доменом C_{H1} через дисульфидную связь. Считается, что определенные аминокислотные остатки образуют поверхность раздела между переменными доменами легкой и тяжелой цепей (Chothia и соавт., 1985, *J. Mol. Biol.* 186:651-663.)

Некоторые участки в переменных доменах сильно различаются между разными антителами, т.е. являются "гиперпеременными". Эти гиперпеременные участки содержат остатки, которые непосредственно участвуют в связывании и специфичности каждого конкретного антитела в отношении его специфической антигенной детерминанты. Гиперпеременность как в переменных доменах легкой цепи, так и в переменных доменах тяжелой цепи сосредоточена в трех сегментах, известных как определяющие комплементарности области (CDR) или гиперпеременные петли (HVL). CDR определены путем сравнения последовательностей в Kabat и соавт., 1991, в: *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5^е изд. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md., тогда как HVL структурно определены в соответствии с трехмерной структурой переменного домена, как описано у Chothia and Lesk, 1987, *J. Mol. Biol.* 196: 901-917. Если эти два метода приводят к немного разным идентификациям CDR, предпочтительнее структурное определение. Как определено у Kabat, CDR-L1 расположен примерно на остатках 24-34, CDR-L2, примерно на остатках 50-56 и CDR-L3, примерно на остатках 89-97 в переменном домене легкой цепи; CDR-H1 располагается примерно на остатках 31-35, CDR-H2 примерно на остатках 50-65 и CDR-H3 примерно на остатках 95-102 в переменном домене тяжелой цепи. Таким образом, CDR1, CDR2, CDR3 тяжелой и легкой цепей определяют уникальные и функциональные свойства, специфические для данного антитела.

Три CDR в каждой из тяжелой и легкой цепей разделены каркасными областями (FR), которые содержат последовательности, имеющие тенденцию быть менее переменными. От аминоконца до карбоксиконца переменных доменов тяжелой и легкой цепей FR и CDR расположены в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 и FR4. Главным образом β -складчатая конфигурация FR сближает CDR в каждой из цепей друг с другом, а также с CDR из другой цепи. Полученная конформация вносит вклад в сайт связывания антигена (см. Kabat и соавт., 1991, NIH № публ. 91-3242, том. I, сс 647-669), хотя не все остатки CDR обязательно принимают непосредственное участие в связывании антигена.

Остатки FR и константные домены Ig не участвуют напрямую в связывании антигена, но способствуют связыванию антигена и/или опосредуют эффекторную функцию антитела. Считается, что некоторые остатки FR оказывают существенное влияние на связывание антигена по меньшей мере тремя способами: нековалентным связыванием непосредственно с эпитопом, взаимодействием с одним или несколькими остатками CDR и воздействием на поверхность раздела между тяжелой и легкой цепями. Константные домены не участвуют напрямую в связывании антигена, но опосредуют различные эффекторные функции Ig, такие как участие антитела в антителозависимой клеточной цитотоксичности (ADCC), комплементзависимой цитотоксичности (CDC) и антителозависимом клеточном фагоцитозе (ADCP).

Легкие цепи иммуноглобулинов позвоночных относятся к одному из двух четко различающихся классов, каппа (κ) и лямбда (λ), на основе аминокислотной последовательности константного домена. Для сравнения, тяжелые цепи иммуноглобулинов млекопитающих отнесены к одному из пяти основных классов в соответствии с последовательностью константных доменов: IgA, IgD, IgE, IgG и IgM. IgG и IgA далее подразделены на подклассы (изоформы), например, IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁ и IgA₂, соответственно. Константные домены тяжелой цепи, которые соответствуют различным классам иммуноглобулинов, называются α , δ , ϵ , γ и μ , соответственно. Структуры субъединиц и трехмерные конфигурации классов нативных иммуноглобулинов хорошо известны.

Термины "антитело", "антитело против Sema3A", "гуманизованное антитело против Sema3A" и "вариант гуманизованного антитела против Sema3A" используют в настоящей заявке в самом широком смысле и конкретно охватывают моноклональные антитела (включая полноразмерные моноклональные антитела), поликлональные антитела, мультиспецифические антитела (например, биспецифические антитела) и фрагменты антител, такие как переменные домены и другие части антител, которые проявляют желаемую биологическую активность, например, связывание с Sema3A.

Термин "моноклональное антитело" (mAb) относится к антителу из популяции, по существу, гомогенных антител; то есть отдельные антитела в этой популяции идентичны, за исключением встречающихся в природе мутаций, которые могут присутствовать в незначительных количествах. Моноклональные антитела являются высокоспецифическими, они направлены против одной антигенной детерминанты, "эпитопа". Следовательно, модификатор "моноклональный" указывает на, по существу, гомогенную

популяцию антител, направленных на идентичный эпитоп, и не может быть истолкован как требующий получения антитела каким-либо конкретным методом. Следует понимать, что моноклональные антитела могут быть получены любым методом или методом, известным в данной области; включая, например, метод гибридом (Kohler и соавт., 1975, *Nature* 256:495), или методы рекомбинантной ДНК, известные в данной области (см., например, патент США № 4,816,567), или способы выделения моноклональных рекомбинантно полученных с использованием библиотеки фаговых антител с использованием методик, описанных в Clackson и соавт., 1991, *Nature* 352: 624-628, и Marks и соавт., 1991, *J. Mol. Biol.* 222: 581-597.

Химерные антитела состоят из переменных областей тяжелой и легкой цепей антитела одного вида (например, не относящегося к человеку млекопитающего, такого как мышь) и константных областей тяжелой и легкой цепи антитела другого вида (например, человека) и могут быть полученные путем связывания последовательностей ДНК, кодирующих переменные области антитела первого вида (например, мыши) с последовательностями ДНК для константных областей антитела второго вида (например, человека) и трансформации хозяина экспрессионным вектором, содержащим связанные последовательности, позволяющие продуцировать химерное антитело. Альтернативно, химерное антитело также может представлять собой антитело, в котором одна или несколько областей или доменов тяжелой и/или легкой цепи идентичны, гомологичны или являются вариантом соответствующей последовательности в моноклональном антителе из другого класса или изотипа иммуноглобулинов, или из консенсусной последовательности или последовательности зародышевой линии. Химерные антитела могут включать фрагменты таких антител при условии, что фрагмент антитела проявляет желаемую биологическую активность своего родительского антитела, например, связывание с тем же эпитопом (см., например, патент США № 4,816,567; и Morrison и соавт., 1984, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 6851-6855).

Термины "фрагмент антитела", "антигенсвязывающий фрагмент", "фрагмент антитела против Sema3A", "фрагмент гуманизированного антитела против Sema3A", "вариант фрагмента гуманизированного антитела против Sema3A" относятся к части полноразмерного антитела против Sema3A, в котором сохраняется переменная область или функциональная способность, например, специфическое связывание эпитопа Sema3A. Примеры фрагментов антител включают, но не ограничиваются ими, фрагмент Fab, Fab', F(ab')₂, Fd, Fv, scFv и scFv-Fc, диатело, линейное антитело, одноцепочечное антитело, минитело, диатело, образованное из фрагментов антител, и мультиспецифические антитела, образованные из фрагментов антител.

Полноразмерные антитела можно обрабатывать ферментами, такими как папаин или пепсин, для получения пригодных фрагментов антител. Расщепление папаином применяют для получения двух идентичных антигенсвязывающих фрагментов антител, называемых фрагментами "Fab", каждый с одним антигенсвязывающим сайтом и остаточным фрагментом "Fc". Фрагмент Fab также содержит константный домен легкой цепи и домен C_{H1} тяжелой цепи. Обработка пепсином дает фрагмент F(ab')₂, который имеет два антигенсвязывающих сайта и все еще способен перекрестно связывать антиген.

Фрагменты Fab' отличаются от фрагментов Fab наличием дополнительных остатков, включая один или несколько цистеинов из шарнирной области антитела на С-конце домена C_{H1}. Фрагменты F(ab')₂ антител представляют собой пары фрагментов Fab', связанных остатками цистеина в шарнирной области. Также известны другие химические соединения фрагментов антител.

Фрагмент "Fv" содержит полный сайт распознавания и связывания антигена, состоящий из димера одного переменного домена тяжелой и одного легкой цепей в тесной нековалентной связи. В этой конфигурации три CDR каждого переменного домена взаимодействуют, определяя сайт связывания антигена на поверхности димера V_H-V_L. В совокупности шесть CDR придают антителу антигенсвязывающую специфичность.

"Одноцепочечный Fv" или "scFv" фрагмент антитела представляет собой одноцепочечный вариант Fv, содержащий домены V_H и V_L антитела, где домены присутствуют в одной полипептидной цепи. Одноцепочечный Fv способен распознавать и связывать антиген. Полипептид scFv может также необязательно содержать полипептидный линкер, расположенный между доменами V_H и V_L, чтобы облегчить формирование желаемой трехмерной структуры для связывания антигена с помощью scFv (см., например, Pluckthun, 1994, *In The Pharmacology of monoclonal Antibodies*, том 113, Rosenberg and Moore eds., Springer-Verlag, New York, сс. 269-315).

Другие распознаваемые фрагменты антител включают те, которые содержат пару тандемных сегментов Fd (V_H-C_{H1}-V_H-C_{H1}), чтобы образовать пару антигенсвязывающих областей. Эти "линейные антитела" могут быть биспецифическими или моноспецифическими, как описано, например, в Zapata и соавт. 1995, *Protein Eng.* 8(10): 1057-1062.

Гуманизированное антитело или фрагмент гуманизированного антитела представляет собой конкретный тип химерного антитела, которое включает вариант аминокислотной последовательности иммуноглобулина или его фрагмент, который способен связываться с заранее определенным антигеном и который включает один или несколько FR, имеющих, по существу, аминокислотную последовательность человеческого иммуноглобулина и одну или несколько CDR, имеющих по существу аминокислотную последовательность нечеловеческого иммуноглобулина. Эта нечеловеческая аминокислотная последова-

тельность, которую часто называют "импортной" последовательностью, обычно берется из "импортного" домена антитела, в частности варибельного домена. В общем, гуманизованное антитело включает по меньшей мере CDR или HVL нечеловеческого антитела, вставленные между FR варибельного домена тяжелой или легкой цепи человека.

В настоящем изобретении описаны специфические гуманизованные антитела против Sema3A, которые содержат CDR, полученные из мышиноного или химерного антитела, вставленного между FR варибельных доменов тяжелой и легкой цепи последовательности человеческой зародышевой линии. Следует понимать, что некоторые остатки мышиноного FR могут быть важны для функции гуманизованных антител, и поэтому некоторые остатки варибельных доменов тяжелой и легкой цепи последовательности зародышевой линии человека модифицированы так, чтобы они были такими же, как и в соответствующей последовательности мыши.

Используемые в настоящей заявке выражения "антитело в соответствии с изобретением" и "антитело против Sema3A в соответствии с изобретением" относятся к антителу против Sema3A или его антигенсвязывающему фрагменту, описанным в настоящей заявке. Предпочтительно, указанные выражения относятся к любому антителу, содержащему варибельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1 (H-CDR1); аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2 (H-CDR2); и аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3 (H-CDR3), и варибельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4 (L-CDR1); аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5 (L-CDR2); и аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6 (L-CDR3).

В одном аспекте гуманизованное антитело против Sema3A содержит практически все из по меньшей мере одного, а обычно из двух варибельных доменов (таких как содержащиеся, например, во фрагментах Fab, Fab', F(ab')₂, Fabc и Fv), в которых все или практически все из CDR соответствуют CDR нечеловеческого иммуноглобулина, и, в частности, в настоящей заявке, все из CDR представляют собой мышинные последовательности, а FR представляют собой FR из консенсусной последовательности человеческого иммуноглобулина или последовательности зародышевой линии. В другом аспекте гуманизованное антитело против Sema3A также включает в себя по меньшей мере часть Fc области иммуноглобулина, как правило, иммуноглобулина человека. Обычно антитело будет содержать как легкую цепь, так и по меньшей мере варибельный домен тяжелой цепи. При необходимости, антитело также может включать один или несколько из C_{H1}, шарнирный участок, C_{H2}, C_{H3} и/или C_{H4} области тяжелой цепи.

Гуманизованное антитело против Sema3A может быть выбрано из любого класса иммуноглобулинов, включая IgM, IgG, IgD, IgA и IgE и любого изоформа, включая IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁ и IgA₂. Например, константный домен может быть константным доменом связывания комплемента, если желательно, чтобы гуманизованное антитело проявляло цитотоксическую активность, и изоформой обычно является IgG₁. Если такая цитотоксическая активность нежелательна, то константный домен может быть другого изоформа, например, IgG₂. Альтернативное гуманизованное антитело против Sema3A может содержать последовательности из более чем одного класса или изоформа иммуноглобулинов, и выбор конкретных константных доменов для оптимизации желаемых эффекторных функций находится в компетенции обычного специалиста в данной области. В отдельных вариантах осуществления настоящее изобретение относится к антителам, которые представляют собой антитела IgG1 и, более конкретно, представляют собой антитела IgG1, которые характеризуется сниженной эффекторной функцией.

Предпочтительно антитело против Sema3A в соответствии с изобретением представляет собой гуманизованное антитело, отформатированное как IgG1KO.

FR и CDR или HVL гуманизованного антитела против Sema3A не обязательно должны точно соответствовать родительским последовательностям. Например, один или несколько остатков в импортируемой CDR или HVL, или консенсусной последовательности, или последовательности FR зародышевой линии могут быть изменены (например, мутагенизированы) путем замены, вставки или делеции, так что полученный аминокислотный остаток больше не идентичен исходному остатку в соответствующем положении в любой родительской последовательности, но, тем не менее, антитело сохраняет функцию связывания с Sema3A. Такое изменение обычно не будет обширным и будет консервативным. Обычно по меньшей мере 75% остатков гуманизованных антител будут соответствовать остаткам родительской консенсусной последовательности или последовательности FR зародышевой линии и импортированных последовательностей, чаще по меньшей мере 90%, а наиболее часто больше 95% или больше 98%, или больше 99%.

Остатки иммуноглобулина, которые влияют на границу раздела между варибельными областями тяжелой и легкой цепей ("граница раздела V_L-V_H") представляют собой остатки, которые влияют на близость или ориентацию двух цепей относительно друг друга. Некоторые остатки, которые могут участвовать в межцепочечных взаимодействиях, включают остатки V_L 34, 36, 38, 44, 46, 87, 89, 91, 96 и 98 и остатки V_H 35, 37, 39, 45, 47, 91, 93, 95, 100 и 103 с использованием системы нумерации, изложенной в Kabat и соавт., Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, Md., 1987)). В патенте США № 6,407,213 также обсуждается, что такие остатки, как остатки V_L 43 и 85, и остатки V_H 43 и 60 также могут участвовать в этом взаимодействии. Хотя эти остатки указаны только для

IgG человека, они применимы для разных видов. Важные остатки антител, которые, как ожидается, будут участвовать в межпочечных взаимодействиях, выбирают для замены в консенсусной последовательности.

Термины "консенсусная последовательность" и "консенсусное антитело" относятся к аминокислотной последовательности, которая включает в себя наиболее часто встречающийся аминокислотный остаток в каждом месте во всех иммуноглобулинах любого конкретного класса, изоформа или структуры субъединицы, например, варибельного домена иммуноглобулина человека. Консенсусная последовательность может быть основана на иммуноглобулинах определенного вида или многих видов. Под "консенсусной" последовательностью, структурой или антителом понимают консенсусную последовательность человека, как описано в определенных вариантах осуществления, и для обозначения аминокислотной последовательности, которая включает наиболее часто встречающиеся аминокислотные остатки в каждом месте во всех иммуноглобулинах человека любого конкретного класса, изоформа или структуры субъединицы. Таким образом, консенсусная последовательность содержит аминокислотную последовательность, имеющую в каждом положении аминокислоту, которая присутствует в одном или нескольких известных иммуноглобулинах, но которая не может точно дублировать всю аминокислотную последовательность любого отдельного иммуноглобулина. Консенсусную последовательность варибельной области не получают из любого природного антитела или иммуноглобулина. Kabat и соавт., 1991, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5-е изд. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md., и их варианты. FR консенсусных последовательностей тяжелой и легкой цепей и их вариантов обеспечивают полезные последовательности для получения гуманизованных антител против Sema3A. См., например, патенты США № 6,037,454 и 6,054,297.

Последовательности зародышевой линии человека естественным образом встречаются в человеческой популяции. Комбинация этих генов зародышевой линии создает разнообразие антител. Последовательности антител зародышевой линии для легкой цепи антитела происходят из консервативных ν -генов и j -генов зародышевой линии каппа или лямбда человека. Подобным образом последовательности тяжелых цепей происходят из ν -, d - и j -генов зародышевой линии (LeFranc, M-P, and LeFranc, G, "The Immunoglobulin Facts Book" Academic Press, 2001).

"Выделенное" антитело представляет собой антитело, которое было идентифицировано и отделено и/или выделено из компонента его естественного окружения. Загрязняющие компоненты естественной среды антитела представляют собой те материалы, которые могут мешать диагностическому или терапевтическому использованию антитела, и могут быть ферментами, гормонами или другими белковыми или небелковыми растворенными веществами. В одном аспекте антитело будет очищено до по меньшей мере более 95% выделения антитела по массе.

Термин "характеристики антитела" относится к факторам, которые способствуют распознаванию антителом антигена или эффективности антитела *in vivo*. В предпочтительном варианте осуществления это относится к способности антитела предотвращать коллапс цитоскелета в клетках сетчатки. Изменения в аминокислотной последовательности антитела могут влиять на свойства антитела, такие как фолдинг, и могут влиять на физические факторы, такие как начальная скорость связывания антитела с антигеном (k_a), константа диссоциации антитела от антигена (k_d), константа аффинности антитела к антигену (K_d), конформация антитела, стабильность белка и период полураспада антитела.

Используемые в настоящей заявке термины "идентичный" или "процент идентичности" в контексте двух или большего количества нуклеиновых кислот или полипептидных последовательностей относятся к двум или нескольким последовательностям или подпоследовательностям, которые являются одинаковыми или имеют определенный процент нуклеотидов или аминокислотных остатков, которые являются одинаковыми, при сравнении и выравнивании для максимального соответствия. Чтобы определить процент идентичности, последовательности выравнивают для целей оптимального сравнения (например, в последовательность первой аминокислотной или нуклеиновой кислоты могут быть введены пробелы для оптимального выравнивания со второй аминокислотной последовательностью или последовательностью нуклеиновой кислоты). Затем сравнивают аминокислотные остатки или нуклеотиды в соответствующих положениях аминокислот или положениях нуклеотидов. Когда положение в первой последовательности занято таким же аминокислотным остатком или нуклеотидом, что и соответствующее положение во второй последовательности, тогда молекулы идентичны в этом положении. Процент идентичности между двумя последовательностями является функцией количества идентичных положений, общих для последовательностей (т.е., % идентичности = $\frac{\text{количество идентичных положений}}{\text{общее количество положений}}$ (например, перекрывающихся положений) $\times 100$). В некоторых вариантах осуществления две сравниваемые последовательности имеют одинаковую длину после того, как в последовательности вводят пробелы, в зависимости от ситуации (например, исключая дополнительную последовательность, выходящую за пределы сравниваемых последовательностей). Например, при сравнении последовательностей варибельной области последовательности лидерного и/или константного домена не рассматриваются. Для сравнения последовательностей между двумя последовательностями "соответствующая" CDR относится к CDR в одном и том же месте в обеих последовательностях (например, CDR-H1 каждой последовательности).

Определение процента идентичности или процента сходства между двумя последовательностями может быть выполнено с использованием математического алгоритма. Предпочтительным неограничивающим примером математического алгоритма, используемого для сравнения двух последовательностей, является алгоритм Karlin and Altschul, 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:2264-2268, измененный как у Karlin and Altschul, 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-5877. Такой алгоритм включен в программы NBLAST и XBLAST по Altschul и соавт., 1990, J. Mol. Biol. 215:403-410. Поиски нуклеотидов BLAST могут быть выполнены с помощью программы NBLAST, оценка = 100, длина слова = 12, для получения нуклеотидных последовательностей, гомологичных нуклеиновой кислоте, кодирующей интересующий белок. Поиски белков BLAST могут быть выполнены с помощью программы XBLAST, оценка = 50, длина слова = 3, для получения аминокислотных последовательностей, гомологичных соответствующему белку. Чтобы получить выравнивания с пробелами для целей сравнения, можно использовать Gapped BLAST, как описано у Altschul и соавт., 1997, Nucleic Acids Res. 25:3389-3402. В качестве альтернативы, PSI-Blast можно использовать для выполнения повторного поиска, который обнаруживает отдаленные отношения между молекулами (Id.). При использовании программ BLAST, Gapped BLAST и PSI-Blast можно использовать параметры по умолчанию соответствующих программ (например, XBLAST и NBLAST). Другим предпочтительным неограничивающим примером математического алгоритма, используемого для сравнения последовательностей, является алгоритм Майерса и Миллера, CABIOS (1989). Такой алгоритм включен в программу ALIGN (версия 2.0), которая является частью пакета программного обеспечения для выравнивания последовательностей GCG. При использовании программы ALIGN для сравнения аминокислотных последовательностей можно использовать таблицу весовых остатков PAM120, штраф за длину пробела, равный 12 и штраф за пробел, равный 4. Дополнительные алгоритмы анализа последовательностей известны в данной области и включают ADVANCE и ADAM, как описано в Torellis and Robotti, 1994, Comput. Appl. Biosci. 10:3-5; и FASTA описанные в Pearson and Lipman, 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:2444-8. В FASTA ktpur представляет собой опцию управления, которая устанавливает чувствительность и скорость поиска. Если ktpur=2, то аналогичные области в двух сравниваемых последовательностях обнаруживаются путем просмотра пар выровненных остатков; если ktpur=1, то проверяют одноуровневые аминокислоты, ktpur может быть установлен на 2 или 1 для последовательностей белков или от 1 до 6 для последовательностей ДНК. По умолчанию, если ktpur не указан, это 2 для белков и 6 для ДНК. В качестве альтернативы, выравнивание белковой последовательности можно проводить с использованием алгоритма CLUSTAL W, как описано у Higgins и соавт., 1996, Methods Enzymol. 266:383-402.

Используемые в контексте настоящей заявки выражения "клетка", "линия клеток" и "культура клеток" применяют взаимозаменяемо, и все такие обозначения включают их потомство. Таким образом, "трансформанты" и "трансформированные клетки" включают первичную рассматриваемую клетку и полученные из нее культуры без учета количества переносов.

Термин "млекопитающее" в целях лечения относится к любому животному, классифицируемому как млекопитающее, включая людей, домашних и сельскохозяйственных животных, а также животных из зоопарков, животных, используемых в спорте, или домашних питомцев, таких как собаки, лошади, кошки, коровы и т.п. Предпочтительно, млекопитающим является человек.

"Заболевание" или "расстройство" в контексте настоящего описания означает любое состояние, при котором лечение гуманизированным антителом против Sema3A, описанным в настоящей заявке, может быть улучшено. Оно включает в себя хронические и острые расстройства или заболевания, включая те патологические состояния, которые предрасполагают млекопитающее к рассматриваемому расстройству.

Термин "интравитреальная инъекция" имеет свое обычное значение в данной области и относится к введению антитела против Sema3A или его антигенсвязывающего фрагмента в стекловидное тело пациента.

Термин "подкожное введение" относится к введению антитела против Sema3A или его антигенсвязывающего фрагмента под кожу пациента-животного или человека, предпочтительно внутри кармана между кожей и подлежащей тканью, путем относительно медленной, продолжительной доставки из ёмкости для лекарственного средства. При защемлении или вытягивании кожи вверх и от подлежащей ткани может образоваться карман.

Термин "подкожная инфузия" относится к введению лекарственного средства под кожу пациента-животного или человека, предпочтительно внутри кармана между кожей и подлежащей тканью, путем относительно медленной, длительной доставки из ёмкости для лекарственного средства в течение периода времени, включая, но не ограничиваясь этим, 30 минут или меньше, или 90 минут или меньше. Необязательно, инфузия может быть произведена путем подкожной имплантации насоса для доставки лекарственного средства, имплантированного под кожу пациента-животного или человека, при этом насос доставляет заранее определенное количество лекарственного средства в течение заранее определенного периода времени, например, 30 минут, 90 минут, или периода времени, охватывающего продолжительность схемы лечения.

Термин "подкожный болус" относится к введению лекарственного средства под кожу пациента-животного или человека, где болусная доставка лекарственного средства составляет менее чем прибли-

зительно 15 минут; в другом аспекте менее 5 минут и в еще одном аспекте менее 60 секунд. В еще одном аспекте введение осуществляют внутри кармана между кожей и подлежащей тканью, где карман может быть создан путем защемления или оттягивания кожи вверх и от подлежащей ткани.

Термин "терапевтически эффективное количество" используют для обозначения количества антитела против Sema3A или его антигенсвязывающего фрагмента, которое ослабляет или улучшает один или несколько симптомов заболевания, которое подлежит лечению. При этом именно такое количество имеет благоприятный исход для пациента. Эффективность может быть измерена обычными способами в зависимости от состояния, которое необходимо лечить. Например, при заболеваниях или расстройствах глаз/сетчатки, характеризующихся наличием клеток, экспрессирующих Sema3A, эффективность можно измерить путем определения скорости ответа, например, восстановление зрения или путем оценки времени задержки до прогрессирования заболевания.

Термины "лечение" и "терапия" и т.п., используемые в настоящей заявке, предназначены для включения терапевтических, а также профилактических или подавляющих мер в отношении заболевания или расстройства, приводящих к любому клиническому желаемому или положительному эффекту, включая, но не ограничиваясь этим, смягчение или ослабление одного или нескольких симптомов, регресс, замедление или прекращение прогрессирования заболевания или нарушения. Таким образом, например, термин "лечение" включает в себя введение антитела против Sema3A или его антигенсвязывающего фрагмента до или после появления симптома заболевания или расстройства, тем самым предотвращая или удаляя один или несколько признаков заболевания или нарушения. В качестве другого примера термин включает введение антитела против Sema3A или его антигенсвязывающего фрагмента после клинического проявления заболевания для борьбы с симптомами заболевания. Кроме того, введение антитела против Sema3A или его антигенсвязывающего фрагмента после появления и после развития клинических симптомов, когда введение влияет на клинические параметры заболевания или расстройства, независимо от того, приводит ли лечение к улучшению заболевания или нет, включает в себя "лечение" или "терапию" в контексте настоящего описания. Более того, пока композиции в соответствии с изобретением либо сами по себе, либо в комбинации с другим терапевтическим средством смягчают или ослабляют по меньшей мере один симптом заболевания, которое лечат, по сравнению с этим симптомом при отсутствии использования композиции антитела против Sema3A или его антигенсвязывающего фрагмента, результат следует рассматривать как эффективное лечение основного заболевания, независимо от того, облегчены ли все симптомы расстройства или нет.

Термин "вкладыш в упаковку" используют для обозначения инструкций, обычно включаемых в упаковки терапевтических продуктов для продажи, которые содержат информацию о показаниях, применении, введении, противопоказаниях и/или предупреждениях относительно использования таких терапевтических продуктов.

Антитело в соответствии с изобретением

В первом аспекте изобретение относится к антителу против Sema3A или его антигенсвязывающему фрагменту. Предпочтительно указанное антитело представляет собой гуманизированное антитело против Sema3A, более предпочтительно гуманизированное моноклональное антитело против Sema3A.

При первоначальной характеристике была создана библиотека антител, нацеленных на варианты Sema3A, путем помещения CDR мышинных антител в FR консенсусных переменных доменов тяжелой и легкой цепи человека и, кроме того, путем конструирования FR с различными изменениями.

Это привело к гуманизированному антителу, направленному против Sema3A, с улучшенными свойствами, как раскрыто в настоящей заявке. Последовательности антитела в соответствии с изобретением представлены в табл. 1 ниже.

Таблица 1

Название	Аминокислотная последовательность	SEQ ID NO
HCDR1	SYYS	SEQ ID NO: 1
HCDR2	TIKSGGYAY YPDSVKD	SEQ ID NO: 2
HCDR3	GGQGAMDY	SEQ ID NO: 3
LCDR1	RASQSIGDYL H	SEQ ID NO: 4
LCDR2	YASQSIG	SEQ ID NO: 5
LCDR3	QQGYSPY	SEQ ID NO: 6
VH – вариант 1	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS SYYSWVRQA PGKGLEWVST IKSAGGYAYY PDSVKDRFTI SRDNSKNTLY LQMSSLRAED TAVYYCVRRG QGAMDYWGQG TTVTSS	SEQ ID NO: 7
VH – вариант 2	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFPFS SYYSWVRQA PGKGLEWVST IKSAGGYAYY PDSVKDRFTI SRDNSKNTLY LQMSSLRAED TAVYYCVRRG QGAMDYWGQG TTVTSS	SEQ ID NO: 8
VH – вариант 3	EVQLVESGGG LVQLGGSLRL SCAASGFTFS SYYSWVRQA PGKGLEWVST IKSAGGYAYY PDSVKDRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCVKGG QGAMDYWGQG TTVTSS	SEQ ID NO: 9
VH – вариант 4	EVQLVESGGG LLQLGGSLRL SCAASGFTFS SYYSWVRQA PGKGLEWVST IKSAGGYAYY PDSVKDRFTI SRDNSKNTLN LQMNSLRAED TAVYYCVKGG QGAMDYWGQG TTVTSS	SEQ ID NO: 10
VL – вариант а	EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSIG DYLHWYQKP GQAPRLLIK ASQSIGIPA RFGSGSGTD FTLTISLEP EDFAVYYCQQ GYSFPYTFGG GTKLEIK	SEQ ID NO: 11
VL – вариант б	EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSIG DYLHWYQKP GQAPRLIY ASQSIGIPA RFGSGSGTD FTLTISLEP EDFAVYYCQQ GYSFPYTFGG GTKLEIK	SEQ ID NO: 12
VL – вариант с	EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSIG DYLHWYQKP GQAPRLIKY ASQSIGIPA RFGSGSGTD FTLTISLEP EDFAVYYCQQ GYSFPYTFGG GTKLEIK	SEQ ID NO: 13

Тяжелая цепь – Клон I	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS SYMSWVRQA PGKGLEWVST IIKSGGYAYY PDSVKDRFTI SRDNSKNTLY LQMSSLRAED TAVYYCVRGG QGAMDYWGQG TTVTSSAST KGPSVFPLAP SSKSTSGGTA ALGCLVKDYF PEPVTVSWNS GALTSGVHTF PAVLQSSGLY SLSSVTVPS SSLGTQTYIC NVNHKPSNTK VDKRVEPKSC DKTHTCPPCP APEAAGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTPPVLDSDGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMH ALHNHYTQKS LSLSPG	SEQ ID NO: 14
Легкая цепь – Клон I	EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSIG DYLHWYQQKP GQAPRLLIKY ASQSIGIPA RFSGSGSGTD FTLTISLEP EDFAVYYCQQ GYSFPYTFGG GTKLEIKRTV AAPSVFIFPP SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYLSSTLT LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN RGE	SEQ ID NO: 15
Тяжелая цепь – Клон II	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFPFS SYMSWVRQA PGKGLEWVST IIKSGGYAYY PDSVKDRFTI SRDNSKNTLY LQMSSLRAED TAVYYCVRGG QGAMDYWGQG TTVTSSAST KGPSVFPLAP SSKSTSGGTA ALGCLVKDYF PEPVTVSWNS GALTSGVHTF PAVLQSSGLY SLSSVTVPS SSLGTQTYIC NVNHKPSNTK VDKRVEPKSC DKTHTCPPCP APEAAGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTPPVLDSDGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMH ALHNHYTQKS LSLSPG	SEQ ID NO: 16
Тяжелая цепь – Клон III	EVQLVESGGG LVQLGGSLRL SCAASGFTFS SYMSWVRQA PGKGLEWVST IIKSGGYAYY PDSVKDRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCVKGG QGAMDYWGQG TTVTSSAST KGPSVFPLAP SSKSTSGGTA ALGCLVKDYF PEPVTVSWNS GALTSGVHTF PAVLQSSGLY SLSSVTVPS SSLGTQTYIC NVNHKPSNTK VDKRVEPKSC DKTHTCPPCP APEAAGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTPPVLDSDGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMH ALHNHYTQKS LSLSPG	SEQ ID NO: 17
Легкая цепь – Клон III	EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSIG DYLHWYQQKP GQAPRLLIY ASQSIGIPA RFSGSGSGTD FTLTISLEP EDFAVYYCQQ GYSFPYTFGG GTKLEIKRTV AAPSVFIFPP SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYLSSTLT LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN RGE	SEQ ID NO: 18
Тяжелая цепь – Клон IV	EVQLVESGGG LLQLGGSLRL SCAASGFTFS SYMSWVRQA PGKGLEWVST IIKSGGYAYY PDSVKDRFTI SRDNSKNTLN LQMNSLRAED TAVYYCVKGG QGAMDYWGQG TTVTSSAST KGPSVFPLAP SSKSTSGGTA ALGCLVKDYF PEPVTVSWNS GALTSGVHTF PAVLQSSGLY SLSSVTVPS SSLGTQTYIC NVNHKPSNTK VDKRVEPKSC DKTHTCPPCP APEAAGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTPPVLDSDGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMH ALHNHYTQKS LSLSPG	SEQ ID NO: 19
Легкая цепь – Клон IV	EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSIG DYLHWYQQKP GQAPRLLIKY ASQSIGIPA RFSGSGSGTD FTLTISLEP EDFAVYYCQQ GYSFPYTFGG GTKLEIKRTV AAPSVFIFPP SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYLSSTLT LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN RGE	SEQ ID NO: 20

В одном варианте осуществления настоящее изобретение обеспечивает антитело против Sema3A или его антигенсвязывающий фрагмент, которые содержат:

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1 (H-CDR1); аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2 (H-CDR2); и аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3 (H-CDR3); и

вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4 (L-CDR1); аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5 (L-CDR2); и аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6 (L-CDR3).

В другом варианте осуществления, настоящее изобретение обеспечивает антитело против Sema3A или его антигенсвязывающий фрагмент, которые содержат:

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8,

SEQ ID NO: 9 или SEQ ID NO: 10; и

вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12 или SEQ ID NO: 13.

В другом варианте осуществления, настоящее изобретение обеспечивает антитело против Sema3A или его антигенсвязывающий фрагмент, которые содержат:

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 или SEQ ID NO: 10; и

вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12 или SEQ ID NO: 13;

при этом:

вариабельная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1 (H-CDR1); аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2 (H-CDR2); и аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3 (H-CDR3); и

вариабельная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4 (L-CDR1); аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5 (L-CDR2); и аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6 (L-CDR3).

В еще одном варианте осуществления, настоящее изобретение обеспечивает антитело против Sema3A или его антигенсвязывающий фрагмент, которые содержат:

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 или SEQ ID NO: 10; и

вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12 или SEQ ID NO: 13.

В предпочтительном варианте осуществления изобретение обеспечивает антитело против Sema3A или его антигенсвязывающий фрагмент, которые содержат:

вариабельную тяжелую цепь и вариабельную легкую цепь, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 7 и SEQ ID NO: 11, соответственно;

вариабельную тяжелую цепь и вариабельную легкую цепь, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 8 и SEQ ID NO: 11, соответственно;

вариабельную тяжелую цепь и вариабельную легкую цепь, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 9 и SEQ ID NO: 12, соответственно; или

вариабельную тяжелую цепь и вариабельную легкую цепь, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 10 и SEQ ID NO: 13, соответственно.

В еще одном варианте осуществления, настоящее изобретение обеспечивает антитело против Sema3A или его антигенсвязывающий фрагмент, которые содержат:

тяжелую цепь, содержащую, предпочтительно состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17 или SEQ ID NO: 19; и

легкую цепь, содержащую, предпочтительно состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 18 или SEQ ID NO: 20.

В конкретном варианте осуществления, изобретение относится к антителу против Sema3A или его антигенсвязывающий фрагмент, которые содержат:

а. тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14 и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15, указанное антитело упоминается как "клон I";

б. тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16 и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15, указанное антитело упоминается как "клон II";

в. тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17 и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18, указанное антитело упоминается как "клон III"; или

г. тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19 и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20, указанное антитело упоминается как "клон IV".

Мутанты IgG1-KO были получены путем введения мутаций в область Fc. Мутации для снижения или ингибирования эффекторной функции хорошо известны специалистам в данной области техники и подробно описаны в предшествующем уровне техники, например, у Wang и соавт., Protein Cell 2018, 9(1):63-73 и Stewart и соавт. Journal for ImmunoTherapy of Cancer 2014, 2:29. Как правило, неограничи-

вающий список мутаций, введенных в область Fc IgG1 с целью снижения эффекторной функции Fc, включает в себя: L234A и L235A; L234A, L235A и N297Q; L234A, L235A и P329G; или L234A, L235A и D265A;

где остатки пронумерованы в соответствии с индексом EU Кабата.

В предпочтительном варианте осуществления антитело в соответствии с изобретением содержит две мутации L234A и L235A в области Fc для снижения эффекторной функции.

CDR, раскрытые в настоящей заявке и изображенные в SEQ ID NO: 1-6, представлены в соответствии с нумерацией по Кабату и суммированы в табл. 2 ниже с положением по Кабату.

Таблица 2

CDR	Последовательность по Кабату	Положение по Кабату	SEQ ID NO:
HCDR1	SYYS	31-35	1
HCDR2	TIKSGGYAYYPDSVKD	50-66	2
HCDR3	GGQGAMDY	99-106	3
LCDR1	RASQSIGDYLH	24-34	4
LCDR2	YASQSIG	50-56	5
LCDR3	QQGYSFYPT	89-97	6

Антитело против Sema3A в соответствии с настоящим изобретением связывается с высоким сродством к человеческому Sema3A. В варианте осуществления, относящемся к этому аспекту, антитело против Sema3A в соответствии с настоящим изобретением связывается с человеческим Sema3A при $K_D < 50$ пМ. В другом варианте осуществления антитело против Sema3A в соответствии с настоящим изобретением связывается с человеческим Sema3A при $K_D < 35$ пМ, как показано в примере 4. В предпочтительном варианте осуществления, антитело против Sema3A в соответствии с настоящим изобретением связывается с человеческим Sema3A при $K_D < 30$ пМ.

Антитело против Sema3A в соответствии с изобретением также связывается с цино-Sema3A, мышинным Sema3A, Sema3A крысы и Sema3A кролика.

Антитело против Sema3A в соответствии с настоящим изобретением предотвращает вызванный Sema3A коллапс цитоскелета в клетках сетчатки с функциональной эффективностью менее 100 пМ, предпочтительно менее 80 пМ, более предпочтительно менее 70 пМ. В предпочтительном варианте осуществления, антитело против Sema3A в соответствии с настоящим изобретением предотвращает вызванный Sema3A коллапс цитоскелета в клетках сетчатки с функциональной эффективностью 69 пМ, как проиллюстрировано в примере 4.

В другом аспекте доказано, что антитело против Sema3A в соответствии с настоящим изобретением имеет низкий риск иммуногенности, как описано в примере 5. Это основано на предсказании *in silico* иммуногенности антитела. Риск иммуногенности обычно оценивается различными хорошо известными методами, такими как компьютерный алгоритм для прогнозирования эпитопов Т-клеток, основного фактора, влияющего на иммуногенность.

Действительно, сообщалось, что последовательности, содержащие Т-клеточные эпитопы, присутствующие в представляющих интерес белках, могут быть предсказаны с помощью алгоритма, основанного на подходе с использованием вычислительной матрицы, доступной под названием EpiMatrix (производится EpiVax). Специалист в данной области может обратиться к Van Walle и соавт., *Expert Opin Biol Ther.* 2007 March; 7(3): 405-18 и Jawa и соавт., *Clin Immunol.* 2013 Dec; 149(3):534-55.

Авторы изобретения показали, что антитело в соответствии с изобретением проявляет более выгодные свойства, чем другие антитела или фрагменты, нацеленные на Sema3A, упомянутые в предшествующем уровне техники и описанные в настоящей заявке.

Авторы изобретения сравнили средство к связыванию антитела, нацеленного на Sema3A, раскрытого в WO 2014123186 (Chione Bioscience) со средством антитела в соответствии с настоящим изобретением. Антитела из WO 2014123186 раскрыты для применения в лечении болезни Альцгеймера. Настоящий пример 8 показывает, что доказано, что антитело в соответствии с изобретением имеет более высокое сродство к связыванию с человеческим Sema3A, чем антитело предшествующего уровня техники, раскрытое у Chione Bioscience.

Также авторы изобретения сравнили свойства антитела в соответствии с настоящим изобретением с фрагментами ScFv, раскрытыми в WO 2017074013 (Samsung). Эти фрагменты раскрыты для использования при лечении различных видов рака. Настоящий пример 9 показывает, что доказано, что антитело в соответствии с изобретением имеет более высокое сродство к связыванию с человеческим Sema3A, чем фрагменты антител предшествующего уровня техники, раскрытые в WO 2017074013.

Более высокое сродство к связыванию продлевает время нейтрализации Sema3A после интравитреальной инъекции антитела и позволяет снизить частоту инъекций. Более высокое сродство к связыванию дополнительно позволяет вводить более низкую дозу, ограничивая потенциальные побочные эффекты. Таким образом, антитело в соответствии с изобретением обеспечивает технические преимущества по сравнению с антителами предшествующего уровня техники. Повышенное сродство к связыванию и уменьшенная частота инъекций значительно улучшают эффективность лечения нуждающихся в этом пациентов. Это также дает ценные преимущества для пациента, особенно улучшенное соблюдение режима приема лекарств и соблюдение режима лечения.

Авторы изобретения также сравнили функциональную эффективность антитела в соответствии с изобретением и коммерчески доступного антитела, нацеленного на Sema3A, как описано в настоящем примере 11. Авторы изобретения показали, что в одинаковых условиях антитело в соответствии с изобретением предотвращает вызванный посредством Sema3A коллапс цитоскелета в клетках сетчатки (пример 3), в то время как коммерчески доступные антитела этого не делают (пример 11).

Гуманизация и варианты аминокислотной последовательности

Дополнительные варианты антитела против Sema3A и фрагменты антител могут быть сконструированы на основе набора CDR, идентифицированных под последовательностями, изображенными в SEQ ID NO: 1-6. Следует понимать, что в указанных вариантных антителах против Sema3A и фрагментах антител аминокислотная последовательность CDR остается неизменной, но окружающие области, например, области FR могут быть спроектированы.

Варианты аминокислотной последовательности антитела против Sema3A могут быть получены путем внесения соответствующих нуклеотидных изменений в ДНК антитела против Sema3A или путем пептидного синтеза. Такие варианты включают, например, делеции из и/или вставки в и/или замены остатков в аминокислотных последовательностях антител против Sema3A из примеров, приведенных в настоящей заявке. Любая комбинация делеций, вставок и замен производится для получения конечной конструкции при условии, что конечная конструкция обладает желаемыми характеристиками. Изменения аминокислот также могут изменять посттрансляционные процессы гуманизованного или варианта антитела против Sema3A, такие как изменение количества или положения сайтов гликозилирования.

Другой тип аминокислотного варианта антитела включает изменение исходного паттерна гликозилирования антитела. Термин "изменение" в данном контексте означает удаление одного или нескольких углеводных фрагментов, обнаруженных в антителе, и/или добавление одного или нескольких сайтов гликозилирования, которые ранее не присутствовали в антителе.

В некоторых аспектах настоящее изобретение включает в себя молекулы нуклеиновых кислот, которые кодируют варианты аминокислотной последовательности антител против Sema3A, описанных в настоящей заявке. Молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие варианты аминокислотной последовательности антитела против Sema3A, получают различными способами, известными в данной области. Эти способы включают, но не ограничиваются ими, выделение из природного источника (в случае встречающихся в природе вариантов аминокислотной последовательности) или получение с помощью олигонуклеотид-опосредованного (или сайт-направленного) мутагенеза, мутагенеза ПЦР и кассетного мутагенеза более ранней полученной вариантной или невариантной версии антитела против Sema3A.

В некоторых вариантах осуществления антитело против Sema3A представляет собой фрагмент антитела. Существуют способы, которые были разработаны для получения фрагментов антител. Фрагменты могут быть получены протеолитическим расщеплением интактных антител (см., например, Morimoto и соавт., 1992, *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 24:107-117; и Brennan и соавт., 1985, *Science* 229:81). Альтернативно, фрагменты можно получать непосредственно в рекомбинантных клетках-хозяевах. Например, фрагменты Fab'-SH могут быть непосредственно выделены из *E. coli* и химически связаны с образованием фрагментов F(ab')₂ (см., например, Carter и соавт., 1992, *Bio/Technology* 10:163-167). С помощью другого подхода фрагменты F(ab')₂ можно выделить непосредственно из культуры рекомбинантных клеток-хозяев. Другие способы получения фрагментов антител будут очевидны квалифицированному практикующему специалисту.

Антитела против Sema3A и их антигенсвязывающие фрагменты могут включать в себя модификации.

В некоторых вариантах осуществления может быть желательно использовать фрагмент антитела против Sema3A, а не интактное антитело. Может быть целесообразно модифицировать фрагмент антитела, чтобы увеличить его период полураспада в сыворотке. Это может быть достигнуто, например, путем включения эпитопа, связывающего рецептор спасения, во фрагмент антитела. В одном способе соответствующий участок фрагмента антитела может быть изменен (например, мутирован), или эпитоп может быть включен в пептидную метку, которая затем сливается с фрагментом антитела на любом конце или в середине, например, посредством синтеза ДНК или пептидов. См., например, WO 96/32478.

В других вариантах осуществления настоящее изобретение включает в себя ковалентные модификации антител против Sema3A. Ковалентные модификации включают модификацию цистеинильных остатков, гистидильных остатков, лизинильных и аминоконцевых остатков, аргинильных остатков, тирозильных остатков, боковых карбоксильных групп (аспартил или глутамил), глутаминильных и аспарагинильных остатков или сериловых или треонинильных остатков. Другой тип ковалентной модификации включает химическое или ферментативное связывание гликозидов с антителом. Такие модификации могут быть сделаны путем химического синтеза или ферментативного или химического расщепления антитела, если применимо. Другие типы ковалентных модификаций антитела могут быть введены в молекулу путем взаимодействия целевых аминокислотных остатков антитела с органическим дериватирующим агентом, который способен реагировать с выбранными боковыми цепями или амино- или карбоксиконцевыми остатками.

Удаление любых углеводных фрагментов, присутствующих на антителе, может быть выполнено

химическим или ферментативным путем. Химическое дегликозилирование описано у Hakimuddin и соавт., 1987, Arch. Biochem. Biophys. 259:52 и у Edge и соавт., 1981, Anal. Biochem., 118:131. Ферментативное расщепление углеводных фрагментов на антителах может быть достигнуто с помощью использования множества эндо- и экзогликозидаз, как описано у Thotakura и соавт., 1987, Meth. Enzymol 138:350.

Другой тип пригодной ковалентной модификации включает в себя связывание антитела с одним из множества небелковых полимеров, например полиэтиленгликолем, полипропиленгликолем или полиоксисилкенами, способом, изложенным в одном или нескольких патентах Патент США № 4,640,835, Патент США № 4,496,689, Патент США № 4,301,144, Патент США № 4,670,417, Патент США № 4,791,192 и Патент США № 4,179,337.

Связывание эпитопа

Во втором аспекте изобретение относится к антителу, которое распознает специфический "эпитоп антигена Sema3A" и "эпитоп Sema3A". В частности, антитело в соответствии с изобретением связывается с эпитопом Sema3A человека с SEQ ID NO: 22.

В одном аспекте, изобретение относится к антителу против Sema3A или его антигенсвязывающему фрагменту, который связывается по меньшей мере с одним аминокислотным остатком в аминокислотных областях 370-382 Sema3A человека, как указано в SEQ ID NO: 22.

В другом аспекте изобретение относится к антителу против Sema3A или его антигенсвязывающему фрагменту, который связывается с SEQ ID NO: 21.

Последовательности SEQ ID NO: 21 и 22 изображены в табл. 5 ниже.

Таблица 5

Название	Последовательность	SEQ ID NO:
Эпитоп Sema3A	DSTKDLRDDV ITF	21
Sema3A человека	NYQNGKNNVPRLLKLSYKEMLESNNVITFNGLANSSSYHTFLLDEERSRL YVGAKDHIFSFDFLVNIKDFQKIVWPVSYTRRDECKWAGKDILKECANFI KVLKAYNQTHLYACGTGAFHPICTYIEIGHHPEDNIFKLENSHFENGRG KSPYDPKLLTASLLIDGELYSGTAADFMRDFAIFRTLGHHPHPIRTEQH DSRWLNDPKFISAHLISESDNPEDDKVYFFFRFRENDAIDGEHSGKATHARIG QICKNDFGGHRSVNLKWTFLKARLICSVPGPNGIDTFDELQDVFLLMN FKDPKPNVYGVFTTSSNIFKGSVCMYMSDVRRVFLGPY AHRDGPV YQWVPYQGRVYPRPGTCSKTFGGFDSTKDLRDDVITF ARSHPAMYN PVFPMNNRPIVIKTDVNYQFTQIVVDRVDAEDGGYDVMFIGTDVGTVL KVVSIKPEWYDLEEVLLLEEMTVFREPTAISAMELSTKQQQLYIGSTAG VAQLPLHRCDIYGKACAECCLARDPYCAWDGSACSRYPYAKRRTRRQ DIRNGDPLTHCSDLHHDNHHGHSPEERIIYGVENSSTFLCSPKSRALV YWFQRRNEERKEEIRVDDHIIRTDQGLLLRSLQQKDSGNYLCHAVEH GFIQTLLKVTLEVIDTEHLEELLHKDDDDGSGSKEMSNMTPSQKVV YRDFMQLINHPNLNTMDEFCEQVWKRDRKQRRQRPHTPGNSNKWK HLQENKGRNRRTHEFERAPRSV	22

Используемые в настоящей заявке термины "эпитоп антигена Sema3A" и "эпитоп Sema3A" относятся к молекуле (например, пептиду) или фрагменту молекулы, способной связываться с антителом против Sema3A или его антигенсвязывающим фрагментом. Эти термины дополнительно включают, например, антигенную детерминанту Sema3A, распознаваемую любым из антител или фрагментов антител в соответствии с настоящим изобретением, которая имеет комбинацию CDR легкой и тяжелой цепей, выбранную из CDR тяжелой цепи SEQ ID NOs 1 - 3 и CDR легкой цепи SEQ ID NOs: 4 - 6.

Эпитопы антигена Sema3A могут быть включены в белки, белковые фрагменты, пептиды и т.п. Эпитопы чаще всего представляют собой белки, короткие олигопептиды, имитаторы олигопептидов (т.е. органические соединения, имитирующие свойства связывания антител антигена Sema3A) или их комбинации.

Было обнаружено, что антитела или фрагменты антител в соответствии с настоящим изобретением связываются с уникальным эпитопом Sema3A человека. Предпочтительно антитело против Sema3A или его антигенсвязывающий фрагмент связывается по меньшей мере с одним аминокислотным остатком в аминокислотных областях 370-382 внеклеточного домена Sema3A человека с SEQ ID NO: 22. Этот эпитоп расположен близко к интерфейсу Sema3A и рецептору Плексин А. Связывание антитела с этим эпитопом ингибирует образование сигнального комплекса холорецепторов лиганда Sema3A, рецептора Плексин А и корецептора Nrp1, что приводит к вмешательству в биологические эффекты такой передачи сигналов.

В контексте связывания эпитопа фраза "связывается в аминокислотных областях X-Y..." означает, что антитело против Sema3A или его антигенсвязывающий фрагмент связывается по меньшей мере с одним, предпочтительно со всеми аминокислотными остатками в аминокислотной области, указанной в последовательности.

В другом аспекте антитело против Sema3A или его антигенсвязывающий фрагмент связывается по меньшей мере с 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95% или 100% аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 22. Предпочтительно, антитело против Sema3A или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с SEQ ID NO: 22.

Терапевтические применения

В третьем аспекте изобретение относится к антителу против Sema3A или его антигенсвязывающему фрагменту для применения в качестве лекарственного средства.

В одном варианте осуществления настоящее изобретение обеспечивает антитело против Sema3A или его антигенсвязывающий фрагмент для ингибирования вазорепрессивного действия SemaA, и/или для улучшения реваскуляризации сетчатки.

Предпочтительно, настоящее изобретение обеспечивает антитело против Sema3A или его антигенсвязывающий фрагмент для применения в лечении или профилактике заболеваний сетчатки или глаз. Изобретатели действительно разработали антитело, нацеленное на Sema3A, которое чрезвычайно полезно для: перенаправления ангиогенеза в ишемические области для улучшения реваскуляризации сетчатки; предотвращения патологической неоваскуляризации стекловидного тела; и предотвращения разрушения гемато-ретиального барьера.

Как упоминалось ранее, Sema3A является вазорепульсивным сигналом, секретируемым гипоксическими ганглиозными клетками сетчатки. Связываясь с нейропилином-1, он активирует внутриклеточную передачу сигналов рецепторов плексина на эндотелиальных клетках, что приводит к разборке актиновых волокон. Это приводит к коллапсу цитоскелета в филоподиях ведущих клеток, специализированных эндотелиальных клетках, которые направляют рост новых сосудов и предотвращают регенерацию сосудов в ишемизированных областях сетчатки. Авторы изобретения показали, что модуляция вазорепульсивного действия нейтрализующим Sema3A антителом может увеличить количество ведущих клеток и перенаправить ангиогенез в ишемические области, такие как патологически увеличенная аваскулярная фовеальная зона у людей с диабетической ишемией желтого пятна.

Поэтому в четвертом аспекте изобретение относится к антителу против Sema3A или его антигенсвязывающему фрагменту для применения в лечении или предупреждения заболеваний, выбранных из группы, включающей в себя ретинопатию, ишемическую ретинопатию, диабетическую ретинопатию, включая пролиферативную диабетическую ретинопатию и непролиферативную диабетическую ретинопатию, диабетический отёк желтого пятна, диабетическую ишемию желтого пятна, возрастную дегенерацию желтого пятна, пигментный ретинит, наследственную дистрофию сетчатки, миопическую дегенерацию, окклюзию артерий сетчатки, эндофтальмит, увеит, кистозный макулярный отёк, хориоидальную неоваскулярную мембрану, вторичную по отношению к любым заболеваниям сетчатки, оптические невропатии, глаукому, отслоение сетчатки, токсическую ретинопатию, лучевую ретинопатию, травматическую ретинопатию, медикаментозно индуцированную васкулопатию сетчатки, неоваскуляризацию сетчатки, полипозидную хориоидальную васкулопатию, васкулит сетчатки, микроаневризму сетчатки, дистрофию Фуха, телеангиэктазию желтого пятна, синдром Ушера и болезнь Штаргардта.

Антитело против Sema3A в соответствии с изобретением в особенности пригодно для лечения или предупреждения диабетической ретинопатии, включая пролиферативную диабетическую ретинопатию и непролиферативную диабетическую ретинопатию, ишемическую ретинопатию, диабетический отёк желтого пятна, диабетическую ишемию желтого пятна, возрастной отёк жёлтого пятна, неоваскуляризацию сетчатки и хориоидальную неоваскуляризацию.

В предпочтительном варианте осуществления указанное заболевание представляет собой диабетическую ишемию желтого пятна и антитело в соответствии с изобретением способствует регенерации сосудов в ишемической сетчатке (реваскуляризация) и предотвращает патологическую неоваскуляризацию стекловидного тела глаза.

В другом предпочтительном варианте осуществления указанное заболевание представляет собой диабетический отёк желтого пятна и антитело в соответствии с изобретением снижает проницаемость гемато-ретиального барьера.

В другом предпочтительном варианте осуществления настоящее изобретение обеспечивает антитело против Sema3A или его антигенсвязывающий фрагмент для ингибирования вызванной посредством Sema3A проницаемости гемато-ретиального барьера и/или вызванной посредством Sema3A вазорегрессии из ишемических областей.

В предпочтительном аспекте антитело в соответствии с изобретением пригодно для лечения диабетического отека желтого пятна (DME) и/или диабетической ишемии желтого пятна (DMI). В предпочтительном варианте осуществления антитело в соответствии с изобретением пригодно для лечения пациента, страдающего от DME и DMI. Предпочтительно антитело в соответствии с изобретением используют для лечения DMI, как определено более чем на 15%, 20%, 25% и более предпочтительно на 30% увеличения фовеальной бессосудистой зоны (FAZ).

В пятом аспекте настоящее изобретение обеспечивает фармацевтическую композицию, содержащую антитело против Sema3A или его антигенсвязывающий фрагмент и фармацевтически приемлемый носитель.

Антитело против Sema3A или его антигенсвязывающий фрагмент вводят любыми подходящими способами, включая интравитреальное, пероральное, парентеральное, подкожное, внутрибрюшинное, внутрилёгочное и интраназальное введение. Парентеральные инфузии включают в себя внутримышечное, внутривенное, внутриартериальное, внутрибрюшинное или подкожное введение. Кроме того, анти-

тело против Sema3A подходящим образом вводят путем импульсной инфузии, особенно с уменьшающимися дозами антитела. В одном аспекте дозирование осуществляют путем инъекций, наиболее предпочтительно внутривенных или подкожных инъекций, частично в зависимости от того, является ли введение кратковременным или продолжительным. Предпочтительно, антитело против Sema3A вводят путем интравитреальной инъекции в глаз.

Для предупреждения или лечения заболевания подходящая доза антитела будет зависеть от множества факторов, таких как тип заболевания, подлежащего лечению, как определено выше, тяжесть и течение заболевания, вводят ли антитело в профилактических или терапевтических целях, предыдущей терапии, истории болезни пациента и реакции на антитело, а также на усмотрение лечащего врача. Антитело обычно вводят пациенту за один раз или в течение ряда курсов лечения.

В предпочтительном варианте осуществления диапазон доз антител в соответствии с изобретением, применимых для одной инъекции, обычно составляет от 1 мг/глаз до 10 мг/глаз, предпочтительно от 1,5 мг/глаз до 5 мг/глаз, более предпочтительно от 2 мг/глаз до 3 мг/глаз и еще более предпочтительно около 2,5 мг/глаз.

Термин "подавление" используют в настоящей заявке в том же контексте, что и "улучшение", и "облегчение" для обозначения уменьшения или ослабления одной или нескольких характеристик заболевания.

Композиция антитела будет составлена, дозирована и введена в соответствии с надлежащей медицинской практикой. Факторы, которые следует учитывать в этом контексте, включают конкретное заболевание, которое лечат, конкретное млекопитающее, которое лечат, клиническое состояние отдельного пациента, причину расстройства, место доставки средства, способ введения, график введения и другие факторы, известные практикующим врачам. "Терапевтически эффективное количество" вводимого антитела будет определяться такими соображениями и представляет собой минимальное количество, необходимое для предотвращения, облегчения или лечения заболеваний глаза или сетчатки, на которые воздействует антитело в соответствии с изобретением.

Антитело может быть, но необязательно, составлено с одним или несколькими средствами, которые в настоящее время используют для предотвращения или лечения рассматриваемого нарушения. Эффективное количество таких других средств зависит от количества антитела против Sema3A, присутствующего в составе, типа заболевания или лечения и других факторов, обсуждаемых выше. Их обычно используют в тех же дозировках и с путями введения, которые использовали в настоящей заявке выше или приблизительно от 1 до 99% используемых до сих пор дозировок.

В другом аспекте изобретение также относится к антителу против Sema3A или его антигенсвязывающему фрагменту для применения в лечении или предупреждения неофтальмологических заболеваний, таких как аутоиммунный артрит, невропатическая боль, остеопороз и рак.

Способ лечения

В другом аспекте изобретение также включает в себя любой способ лечения или предупреждения заболеваний глаз у нуждающегося в этом пациента, указанный способ включает в себя введение антитела против Sema3A в соответствии с изобретением.

Предпочтительно изобретение относится к способу применения антитела в соответствии с изобретением для ингибирования вазорепрессивного действия Sema3A. Более предпочтительно, изобретение относится к указанному способу для улучшения реваскуляризации сетчатки.

Предпочтительно изобретение относится к способу лечения или предупреждения заболевания глаз или сетчатки, включающему в себя введение нуждающемуся в этом пациенту фармацевтически эффективного количества антитела в соответствии с изобретением. Предпочтительно указанное заболевание выбирают из группы, включающей в себя ретинопатию, ишемическую ретинопатию, диабетическую ретинопатию, включая пролиферативную диабетическую ретинопатию и непролиферативную диабетическую ретинопатию, диабетический отёк желтого пятна, диабетическую ишемию желтого пятна, возрастную дегенерацию желтого пятна, пигментный ретинит, наследственную дистрофию сетчатки, миопическую дегенерацию, окклюзию артерий сетчатки, эндофтальмит, увеит, кистозный макулярный отёк, хориоидальную неоваскулярную мембрану, вторичную по отношению к любым заболеваниям сетчатки, оптические невропатии, глаукому, отслоение сетчатки, токсическую ретинопатию, лучевую ретинопатию, травматическую ретинопатию, медикаментозно индуцированную васкулопатию сетчатки, неоваскуляризацию сетчатки, полипозную хориоидальную васкулопатию, васкулит сетчатки, микроаневризму сетчатки, дистрофию Фуха, телеангиэктазию желтого пятна, синдром Ушера и болезнь Штаргардта. Более предпочтительно указанное заболевание выбирают из группы, включающей в себя диабетическую ретинопатию, включая пролиферативную диабетическую ретинопатию и непролиферативную диабетическую ретинопатию, ишемическую ретинопатию, диабетический отёк желтого пятна, диабетическую ишемию желтого пятна, возрастной отёк жёлтого пятна, неоваскуляризацию сетчатки, глаукому и хориоидальную неоваскуляризацию. В еще более предпочтительном варианте осуществления указанное заболевание представляет собой диабетический отёк желтого пятна и/или диабетическую ишемию желтого пятна.

Все описанные в настоящей заявке технические характеристики применимы к указанному способу

лечения.

Фармацевтические композиции и их введение

Композиция, содержащая антитело против Sema3A или его антигенсвязывающий фрагмент, может быть введена субъекту имеющему или с риском заболеть глазами или сетчаткой. Кроме того, изобретение предусматривает использование антитела против Sema3A или его антигенсвязывающего фрагмента в изготовлении лекарственного средства для предупреждения или лечения заболеваний глаз или сетчатки, или заболевания Sema3A. Все описанные в настоящей заявке технические характеристики применимы к указанному применению антитела против Sema3A или его антигенсвязывающего фрагмента при изготовлении лекарственного средства. Используемый в настоящей заявке термин "субъект" означает любого пациента-млекопитающего, которому можно вводить антитело против Sema3A или его антигенсвязывающий фрагмент, включая, например, людей и не относящихся к человеку млекопитающих, таких как приматы, грызуны и собаки. К субъектам, специально предназначенным для лечения с использованием описанных в настоящей заявке способов, относятся люди. Антитело против Sema3A или его антигенсвязывающий фрагмент можно вводить отдельно или в комбинации с другими композициями.

Известны различные системы доставки, которые можно использовать для введения антитела против Sema3A или его антигенсвязывающего фрагмента. Способы введения включают в себя, без ограничения, интравитреальный, глазные капли, внутривидеальный, внутримышечный, внутривидеальный, подкожный, интраназальный, эпидуральный и пероральный пути. Антитело против Sema3A или его антигенсвязывающий фрагмент можно вводить, например, путем инфузии, болюса или инъекции, и можно вводить вместе с другими биологически активными средствами. Введение может быть системным или местным. В предпочтительных вариантах осуществления введение осуществляют путем интравитреальной инъекции. Составы для таких инъекций могут быть приготовлены, например, в предварительно заполненных шприцах.

Антитело против Sema3A или его антигенсвязывающий фрагмент можно вводить в виде фармацевтических композиций, содержащих терапевтически эффективное количество антитела против Sema3A или его антигенсвязывающий фрагмент и один или несколько фармацевтически совместимых ингредиентов.

В типичных вариантах осуществления фармацевтическую композицию составляют в соответствии с обычными процедурами в виде фармацевтической композиции, адаптированной для внутривидеального или подкожного введения человеку. Обычно композиции для введения путем инъекции представляют собой растворы в стерильном изотоническом водном буфере. При необходимости фармацевтический препарат может также включать солюбилизирующее средство и местный анестетик, такой как лигнокаин, для облегчения боли в месте инъекции. Как правило, ингредиенты поставляются либо по отдельности, либо в смеси вместе в стандартной лекарственной форме, например, в виде сухого лиофилизованного порошка или безводного концентрата в герметично закрытой емкости, такой как ампула или саше, с указанием количества активного средства. Если фармацевтический препарат вводят путем инфузии, его можно отпустить с помощью бутылки для инфузии, содержащей стерильную воду или физиологический раствор фармацевтического качества. Если фармацевтический препарат вводят путем инъекции, может быть предоставлена ампула стерильной воды для инъекций или физиологического раствора, чтобы ингредиенты можно было смешать перед введением.

Кроме того, фармацевтическая композиция может быть представлена в виде фармацевтического набора, включающего в себя (а) емкость, содержащую антитело против Sema3A или его антигенсвязывающий фрагмент в лиофилизованном виде и (б) вторую емкость, содержащую фармацевтически приемлемый разбавитель (например, стерильную воду) для инъекций. Фармацевтически приемлемый разбавитель можно использовать для восстановления или разведения лиофилизованного антитела против Sema3A или его антигенсвязывающего фрагмента. С такой емкостью(ями) необязательно может быть связано уведомление в форме, предписанной государственным органом, регулирующим производство, использование или продажу фармацевтических или биологических продуктов, причем уведомление отражает одобрение органом производства, использования или продажи для введения человеку.

Количество антитела против Sema3A или его антигенсвязывающего фрагмента, которое эффективно при лечении или предупреждении заболевания глаз или сетчатки, можно определить стандартными клиническими методами. Кроме того, необязательно можно использовать анализы *in vitro*, чтобы помочь определить оптимальные диапазоны доз. Точная доза, которую следует использовать в составе, также будет зависеть от пути введения и стадии расстройства и должна определяться в соответствии с мнением практикующего врача и обстоятельствами каждого пациента. Эффективные дозы можно экстраполировать из кривых доза-ответ, полученных из тест-систем *in vitro* или на моделях животных.

Например, токсичность и терапевтическая эффективность антитела против Sema3A или его антигенсвязывающего фрагмента можно определить на культурах клеток или экспериментальных животных стандартными фармацевтическими процедурами для определения ED₅₀ (доза, терапевтически эффективная для 50% популяции). Предпочтительным является антитело против Sema3A или его антигенсвязывающий фрагмент, которое проявляет большой терапевтический индекс.

Данные, полученные из анализов клеточных культур и исследований на животных, могут быть ис-

пользованы для определения диапазона доз для применения на людях. Дозировка антитела против Sema3A или его антигенсвязывающего фрагмента обычно находится в диапазоне циркулирующих концентраций, который включает ED₅₀ с небольшой токсичностью или без нее. Дозировка может варьироваться в этом диапазоне в зависимости от применяемой лекарственной формы и используемого пути введения. Для любого антитела против Sema3A или его антигенсвязывающего фрагмента, используемого в способе, терапевтически эффективная доза может быть первоначально оценена с помощью анализов на культуре клеток. Доза может быть составлена на животных моделях для достижения диапазона концентраций в циркулирующей плазме, который включает IC₅₀ (т.е., концентрацию тестируемого соединения, которая обеспечивает полумаксимальное подавление симптомов), как определено в культуре клеток. Такую информацию можно использовать для более точного определения полезных доз для человека. Уровни в плазме можно измерить, например, с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии, ELISA и т.п.

Для интравитреальной инъекции антитела против Sema3A обычно предпочтительны более длительные интервалы между периодами лечения. Благодаря их улучшенному сродству к связыванию и эффективности, антитела против Sema3A в соответствии с настоящим изобретением можно вводить с более длительными интервалами.

В одном варианте осуществления антитело против Sema3A вводят каждые 6 недель, предпочтительно каждые 7 недель, предпочтительно каждые 8 недель, предпочтительно каждые 9 недель, предпочтительно каждые 10 недель, предпочтительно каждые 11 недель и более предпочтительно каждые 12 недель. В еще одном предпочтительном варианте осуществления антитело против Sema3A в соответствии с изобретением вводят один раз каждые 3 месяца.

Поскольку объем, который можно вводить в глаз, строго ограничен, очень важно, чтобы антитело против Sema3A можно было приготовить в высоких концентрациях. Кроме того, активность антитела против Sema3A имеет большое значение, поскольку сильнодействующее антитело может проявлять свой эффект даже при более низких дозах и, таким образом, продлевать активность, а также интервалы между периодами лечения.

Антитела в соответствии с настоящим изобретением могут быть составлены в очень высоких дозах, которые включают, но не ограничиваются ими, 20 мг/мл, 30 мг/мл, 40 мг/мл, 50 мг/мл, 60 мг/мл, 70 мг/мл, 80 мг/мл, 90 мг/мл, или 100 мг/мл. Предпочтительно антитела в соответствии с настоящим изобретением могут быть составлены в виде жидкой композиции с концентрацией около 50 мг/мл.

Типичная доза, которую можно вводить пациенту, составляет приблизительно 2,5 мг/глаз. Типичные буферные компоненты, которые можно использовать для такой композиции, включают в себя, например ацетат натрия, PS20 и дигидрат трегалозы.

В одном варианте осуществления антитело против Sema3A составляют с 10 мМ гистидиновым буфером, 240 мМ сахарозой, 0,02% мас./об. полисорбата 20 при pH 5,5 с конечной концентрацией белка 60 мг/мл.

В некоторых вариантах осуществления фармацевтические композиции, содержащие антитело против Sema3A или его антигенсвязывающий фрагмент, могут дополнительно содержать терапевтическое средство, или конъюгированное, или неконъюгированное со связывающим средством.

Что касается терапевтических режимов комбинаторного введения, в конкретном варианте осуществления антитело против Sema3A или его антигенсвязывающий фрагмент вводят одновременно с терапевтическим средством. В другом конкретном варианте осуществления терапевтическое средство вводят до или после введения антитела против Sema3A или его антигенсвязывающего фрагмента по меньшей мере в течение часа и до нескольких месяцев, например, по меньшей мере в течение часа, пяти часов, 12 часов, дня, недели, месяца или трех месяцев, до или после введения антитела против Sema3A или его антигенсвязывающего фрагмента.

Полинуклеотиды, векторы, клетки-хозяева и рекомбинантные методы

В шестом аспекте настоящее изобретение относится к выделенным полинуклеотидам, которые содержат последовательность, кодирующую антитело против Sema3A, векторы и клетки-хозяева, содержащие полинуклеотиды, и рекомбинантные методы получения антитела. Выделенные полинуклеотиды могут кодировать любую желаемую форму антитела против Sema3A, включая, например, полноразмерные моноклональные антитела, фрагменты Fab, Fab', F(ab')₂ и Fv, диатела, линейные антитела, молекулы одноцепочечных антител и мультиспецифические антитела, образованные из фрагментов антител.

Полинуклеотид(ы), которые содержат последовательность, кодирующую антитело против Sema3A или его фрагмент или цепь, может быть слит с одной или несколькими регуляторными или контрольными последовательностями, как известно в данной области, и может содержаться в подходящих векторах экспрессии или клетке-хозяине, как известно из уровня техники. Каждая из полинуклеотидных молекул, кодирующих переменные домены тяжелой или легкой цепи, может быть независимо слита с полинуклеотидной последовательностью, кодирующей константный домен, такой как константный домен человека, что позволяет продуцировать интактные антитела. Альтернативно, полинуклеотиды или их части могут быть слиты вместе, обеспечивая матрицу для продукции одноцепочечного антитела.

Для рекомбинантного получения полинуклеотид, кодирующий антитело, вставляют в реплицируе-

мый вектор для клонирования (амплификация ДНК) или для экспрессии. Доступно множество подходящих векторов для экспрессии рекомбинантного антитела. Компоненты вектора обычно включают, но не ограничиваются ими, одно или несколько из следующего: сигнальную последовательность, точку начала репликации, один или несколько маркерных генов, энхансерный элемент, промотор и последовательность терминации транскрипции.

Антитела против Sema3A также могут быть получены в виде слитых полипептидов, в которых антитело слито с гетерологичным полипептидом, таким как сигнальная последовательность или другой полипептид, имеющий специфический сайт расщепления на аминоконце зрелого белка или полипептида. Выбранная гетерологичная сигнальная последовательность обычно распознается и обрабатывается (т.е. расщепляется сигнальной пептидазой) клеткой-хозяином. Для прокариотических клеток-хозяев, которые не распознают и не обрабатывают сигнальную последовательность антитела против Sema3A, сигнальная последовательность может быть заменена прокариотической сигнальной последовательностью. Сигнальная последовательность может представлять собой, например, щелочную фосфатазу, пенициллиназу, липопротеин, термостабильные лидеры энтеротоксина II и т.п. Для дрожжевой секреции нативная сигнальная последовательность может быть заменена, например, лидерной последовательностью, полученной из дрожжевого альфа-фактора инвертазы (включая лидеры α -фактора *Saccharomyces* и *Kluyveromyces*), кислой фосфатазы, глюкоамилазы *S. albicans* или сигнала, описанного в WO 90/13646. В клетках млекопитающих можно использовать сигнальные последовательности млекопитающих, а также вирусные секреторные лидеры, например, сигнал gD простого герпеса. ДНК для такой области-предшественника лигируют в рамке считывания с ДНК, кодирующей гуманизованное антитело против Sema3A.

Векторы экспрессии и клонирования содержат последовательность нуклеиновой кислоты, которая позволяет вектору реплицироваться в одной или нескольких выбранных клетках-хозяевах. Обычно в векторах клонирования эта последовательность является последовательностью, которая позволяет вектору реплицироваться независимо от хромосомной ДНК хозяина, и включает точки начала репликации или автономно реплицирующиеся последовательности. Такие последовательности хорошо известны для множества бактерий, дрожжей и вирусов. Ориджин репликации из плазмиды pBR322 подходит для большинства грамотрицательных бактерий, ориджин плазмиды 2- ν подходит для дрожжей, а различные вирусные ориджины (SV40, полиома, аденовирус, VSV и BPV) подходят для векторов клонирования в клетках млекопитающих. Как правило, компонент ориджина репликации не требуется для векторов экспрессии млекопитающих (ориджин SV40 обычно может быть использован только потому, что он содержит ранний промотор).

Векторы экспрессии и клонирования могут содержать ген, кодирующий селективный маркер, для облегчения идентификации экспрессии. Типичные селективные маркерные гены кодируют белки, которые придают устойчивость к антибиотикам или другим токсинам, например, ампициллину, неомицину, метотрексату или тетрациклину, или, альтернативно, являются ауксотрофными дефицитами компонента или, в других альтернативных вариантах, поставляют определенные питательные вещества, которые не присутствуют в сложных средах, например, ген, кодирующий D-аланин рацемазу для *Bacilli*.

В одном примере схемы отбора используют лекарственное средство для остановки роста клетки-хозяина. Те клетки, которые успешно трансформируются гетерологичным геном, продуцируют белок, придающий устойчивость к лекарственным средствам и таким образом, выживают в режиме отбора. Примеры такого доминирующего отбора включают лекарственные средства неомицин, микофеноловую кислоту и гигромицин. Обычными селективными маркерами для клеток млекопитающих являются маркеры, которые позволяют идентифицировать клетки, способные принимать нуклеиновую кислоту, кодирующую гуманизованное антитело против Sema3A, такие как DHFR (дигидрофолатредуктаза), тимидинкиназу, металлотioneин-I и -II (такие как гены металлотioneина приматов), аденозиндезаминазы, орнитиндекарбоксилазы и т.п. Клетки, трансформированные геном отбора DHFR, сначала идентифицируют путем культивирования всех трансформантов в культуральной среде, содержащей метотрексат (Mtx), конкурентный антагонист DHFR. При использовании DHFR дикого типа подходящей клеткой-хозяином является линия клеток яичника китайского хомячка (CHO), дефицитная по активности DHFR (например, DG44).

Альтернативно, клетки-хозяева (особенно хозяева дикого типа, которые содержат эндогенный DHFR) трансформированы или котрансформированы последовательностями ДНК, кодирующими антитело против Sema3A, белок DHFR дикого типа и другой селективный маркер, такой как аминокликозид-3'-фосфотрансфераза (APH), могут быть отобраны путем роста клеток в среде, содержащей агент отбора для селективного маркера, такого как аминокликозидный антибиотик, например канамицин, неомицин или G418. См., например, Патент США № 4,965,199.

Если рекомбинантная продукция осуществляется в дрожжевой клетке в качестве клетки-хозяина, то ген TRP1, присутствующий в дрожжевой плазмиде YRp7 (Stinchcomb и соавт., 1979, Nature 282: 39) можно использовать в качестве селективного маркера. Ген TRP1 обеспечивает селективный маркер для мутантного штамма дрожжей, лишённого способности расти в триптофане, например, ATCC № 44076

или PER4-1 (Jones, 1977, Genetics 85:12). Присутствие повреждения *trp1* в геноме дрожжевой клетки-хозяина затем обеспечивает эффективную среду для обнаружения трансформации по росту в отсутствие триптофана. Точно так же штаммы дрожжей с дефицитом *Leu2r*, такие как ATCC 20,622 и 38,626 дополняются известными плазмидами, несущими ген *LEU2*.

Кроме того, векторы, полученные из кольцевой плазмиды *pKD1* размером 1,6 мкм, можно использовать для трансформации дрожжей *Kluuyveromyces*. Альтернативно, система экспрессии для крупномасштабного продуцирования рекомбинантного химозина теленка была описана для *K. lactis* (Van den Berg, 1990, Bio/Technology 8:135). Также были описаны стабильные мультикоопийные векторы экспрессии для секреции зрелого рекомбинантного человеческого сывроточного альбумина промышленными штаммами *Kluuyveromyces* (Fleeg и соавт., 1991, Bio/Technology 9:968-975).

Векторы экспрессии и клонирования обычно содержат промотор, который распознается организмом-хозяином и функционально связан с молекулой нуклеиновой кислоты, кодирующей антитело против *Sema3A* или его полипептидную цепь. Промоторы, подходящие для использования с прокариотическими хозяевами, включают промотор *rhoA*, системы промоторов β -лактамазы и лактозы, щелочную фосфатазу, промоторную систему триптофана (*trp*) и гибридные промоторы, такие как промотор *tac*. Также подходят другие известные бактериальные промоторы. Промоторы для использования в бактериальных системах также будут содержать последовательность Шайна-Дальгамо (*S.D.*), функционально связанную с ДНК, кодирующей гуманизированное антитело против *Sema3A*.

Известно много эукариотических промоторных последовательностей. Практически все эукариотические гены имеют богатую АТ область, расположенную примерно на 25-30 оснований выше сайта, где начинается транскрипция. Другая последовательность, обнаруженная на 70-80 оснований выше начала транскрипции многих генов, представляет собой область *CNCAAT*, где *N* может быть любым нуклеотидом. На 3'-конце большинства эукариотических генов находится последовательность *AATAAA*, которая может быть сигналом для добавления поли-А-хвоста к 3'-концу кодирующей последовательности. Все эти последовательности подходящим образом вставляются в эукариотические векторы экспрессии.

Примеры подходящих промотирующих последовательностей для использования с дрожжевыми хозяевами включают промоторы для 3-фосфоглицераткиназы или других гликолитических ферментов, таких как енолаза, глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа, гексокиназа, пируватдекарбоксилаза, фосфофруктокиназа, глюкозо-6-фосфат-изомераза, 3-фосфоглицератмутаза, пируваткиназа, триозофосфат-изомераза, фосфоглюкозо-изомераза и глюкокиназа.

Индукцибельные промоторы обладают дополнительным преимуществом, заключающимся в том, что транскрипция регулируется условиями роста. К ним относятся промоторные области дрожжей для алкогольдегидрогеназы 2, изоцитохрома *C*, кислой фосфатазы, производных ферментов, связанных с метаболизмом азота, металлотioneина, глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы и ферментов, ответственных за утилизацию мальтозы и галактозы. Подходящие векторы и промоторы для использования в экспрессии дрожжей дополнительно описаны в EP 73,657. Усилители дрожжей также преимущественно используются с промоторами дрожжей.

Транскрипция антитела против *Sema3A* из векторов в клетках-хозяевах млекопитающих контролируется, например, промоторами, полученными из геномов вирусов, таких как вирус полиомы, вирус оспы птиц, аденовирус (такой как аденовирус 2), вирус папилломы крупного рогатого скота, вирус саркомы птиц, цитомегаловирус, ретровирус, вирус гепатита В и обезьяний вирус 40 (SV40), из промоторов гетерологичных млекопитающих, например, промотора актина или промотора иммуноглобулина, или из промоторов теплового шока, при условии, что такие промоторы совместимы с системами клеток-хозяев.

Ранний и поздний промоторы вируса SV40 удобно получать в виде рестрикционного фрагмента SV40, который также содержит ориджин репликации вируса SV40. Непосредственно ранний промотор цитомегаловируса человека удобно получать в виде рестрикционного фрагмента *HindIII E*. Система для экспрессии ДНК у млекопитающих-хозяев с использованием вируса папилломы крупного рогатого скота в качестве вектора раскрыта в Патенте США № 4,419,446. Модификация этой системы описана в Патенте США № 4,601,978. См. также Reyes и соавт., 1982, Nature 297:598-601, раскрывающую экспрессию кДНК человеческого *p*-интерферона в клетках мыши под контролем промотора тимидинкиназы из вируса простого герпеса. Альтернативно, в качестве промотора можно использовать длинный концевой повтор вируса саркомы Рауса.

Другим полезным элементом, который можно использовать в рекомбинантном векторе экспрессии, является энхансерная последовательность, которую используют для увеличения транскрипции ДНК, кодирующей антитело против *Sema3A*, высшими эукариотами. В настоящее время известно множество энхансерных последовательностей генов млекопитающих (например, глобин, эластаза, альбумин, α -фетопротейн и инсулин). Тем не менее, обычно используют энхансер вируса эукариотических клеток. Примеры включают энхансер SV40 на сайте позднего ориджина репликации (100-270 пар оснований), энхансер раннего промотора цитомегаловируса, энхансер полиомы на сайте позднего ориджина репликации и энхансеры аденовируса. См. также Yaniv, 1982, Nature 297:17-18 для описания усиливающих элементов для активации эукариотических промоторов. Энхансер может быть сплайсирован в вектор в

положении 5' или 3' относительно последовательности, кодирующей антитело против Sema3A, но предпочтительно он расположен в сайте 5' от промотора.

Векторы экспрессии, используемые в эукариотических клетках-хозяевах (дрожжи, грибки, насекомые, растения, животные, люди или нуклеированные клетки из других многоклеточных организмов) также могут содержать последовательности, необходимые для прекращения транскрипции и стабилизации мРНК. Такие последовательности обычно доступны из 5'- и иногда 3'-нетранслируемых областей эукариотических или вирусных ДНК или кДНК. Эти области содержат нуклеотидные сегменты, транскрибируемые как полиаденилированные фрагменты в нетранслируемой части мРНК, кодирующей антитело против Sema3A. Одним из полезных компонентов терминации транскрипции является область полиаденилирования бычьего гормона роста. См. WO 94/11026 и раскрытый в ней вектор экспрессии. В некоторых вариантах осуществления антитела против Sema3A можно экспрессировать с использованием системы SNEF. (См., например, Патент США № 5,888,809; описание которого включено в настоящую заявку посредством ссылки).

Подходящими клетками-хозяевами для клонирования или экспрессии ДНК в векторах в данном случае являются прокариотические, дрожжевые или высшие эукариотические клетки, описанные выше. Подходящие прокариоты для этой цели включают эубактерии, такие как граммотрицательные или грамположительные организмы, например, Enterobacteriaceae, такие как Escherichia, например, E. coli, Enterobacter, Erwinia, Klebsiella, Proteus, Salmonella, например, Salmonella typhimurium, Serratia, например, Serratia marcescans и Shigella, а также Bacilli, такие как B. subtilis и B. licheniformis (например, B. licheniformis 41 P, раскрытый в DD 266,710, опубликованный 12 апреля 1989), Pseudomonas, такие как P. Aeruginosa и Streptomyces. Одним из предпочтительных хозяев для клонирования E. coli является E. coli 294 (ATCC 31,446), хотя подходят и другие штаммы, такие как E. coli B, E. coli X1776 (ATCC 31,537) и E. coli W3110 (ATCC 27,325). Эти примеры являются скорее иллюстративными, чем ограничивающими.

Помимо прокариот, подходящими хозяевами для клонирования или экспрессии гуманизированных векторов, кодирующих антитело против Sema3A, являются эукариотические микробы, такие как нитчатые грибы или дрожжи. Saccharomyces cerevisiae, или обычные пекарские дрожжи, наиболее часто используют среди низших эукариотических микроорганизмов-хозяев. Однако, в данном случае доступны и полезны ряд других родов, видов и штаммов обычно, такие как Schizosaccharomyces pombe; хозяева Kluyveromyces, такие как, например, K. lactis, K. fragilis (ATCC 12,424), K. bulgaricus (ATCC 16,045), K. wickerhamii (ATCC 24,178), K. waltii (ATCC 56,500), K. drosophilorum (ATCC 36,906), K. thermotolerans и K. marxianus; yarrowia (EP 402,226); Pichia pastors (EP 183,070); Candida; Trichoderma reesia (EP 244,234); Neurospora crassa; Schwanniomycetes, такие как Schwanniomycetes occidentalis; и нитчатые грибы, такие как, например, Neurospora, Penicillium, Tolypocladium и хозяева Aspergillus, такие как A. nidulans и A. niger.

Подходящие клетки-хозяева для экспрессии гликозилированного антитела против Sema3A происходят из многоклеточных организмов. Примеры клеток беспозвоночных включают клетки растений и насекомых, включая, например, многочисленные штаммы и варианты бакуловирусов и соответствующие разрезающие клетки-хозяева насекомых от хозяев, таких как Spodoptera frugiperda (гусеница), Aedes aegypti (комар), Aedes albopictus (комар), Drosophila melanogaster (плодовая мушка) и Bombyx mori (шелковичный червь). Общедоступными являются разнообразные вирусные штаммы для трансфекции, например, вариант L-1 Autographa californica NPV и штамм Bm-5 от Bombyx mori NPV, и такие вирусы могут быть использованы, в частности, для трансфекции клеток Spodoptera frugiperda.

В качестве хозяев также могут быть использованы культуры растительных клеток хлопчатника, кукурузы, картофеля, сои, петунии, томата и табака.

Антитело против Sema3A в соответствии с изобретением также может быть включено в вирусные векторы, т.е. полинуклеотид, кодирующий антитело против Sema3A или его антигенсвязывающий фрагмент вводят в вирусный вектор и затем экспрессируется в организме пациента после заражения вирусом.

В другом аспекте экспрессия антитела против Sema3A осуществляется в клетках позвоночных. Размножение клеток позвоночных в культуре (культуре ткани) стало рутинной процедурой, и методы широко доступны. Примерами пригодных линий клеток-хозяев млекопитающих являются линия CV1 почки обезьяны, трансформированная посредством SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651), линия почки эмбриона человека (клетки 293 или 293, субклонированные для роста в суспензионной культуре (Graham и соавт., 1977, J. Gen Virol. 36: 59), клетки почек детенышей хомячка (BHK, ATCC CCL 10), клетки яичников китайского хомячка/-DHFR1 (CHO, Urlaub и соавт., 1980, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 4216; например, DG44), клетки сертоли мыши (TM4, Mather, 1980, Biol. Reprod. 23:243-251), клетки почек обезьян (CV1 ATCC CCL 70), клетки почек африканских зеленых мартышек (VERO-76, ATCC CRL-1587), клетки карциномы шейки матки человека (HELA, ATCC CCL 2), клетки почек собак (MDCK, ATCC CCL 34), клетки печени крысы линии Buffalo (BRL 3A, ATCC CRL 1442), клетки легких человека (W138, ATCC CCL 75), клетки печени человека (Hep G2, HB 8065), опухоль молочной железы мыши (MMT 060562, ATCC CCL51), клетки TR1 (Mather и соавт., 1982, Annals N.Y. Acad. Sci. 383: 44-68), клетки MRC 5, клетки FS4 и линии гепатомы человека (Hep G2).

Клетки-хозяева трансформируют описанными выше векторами экспрессии или клонирования для продуцирования гуманизированных антител против Sema3A и культивируют в обычных питательных

средах, модифицированных в соответствии с требованиями для индукции промоторов, отбора трансформантов или амплификации генов, кодирующих желаемые последовательности

Клетки-хозяева, используемые для получения антитела против Sema3A, описанного в настоящей заявке, можно культивировать в различных средах. Коммерчески доступные среды, такие как Ham's F10 (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, Mo.), минимальная необходимая среда ((MEM), (Sigma-Aldrich Co.), RPMI-1640 (Sigma-Aldrich Co.) и среда Игла, модифицированная по Дульбекко ((DMEM), Sigma-Aldrich Co.) пригодны для культивирования клеток-хозяев. Кроме того, любая из сред, описанных в одном или нескольких из литературных источников Ham и соавт., 1979, Meth. Enz. 58: 44, Barnes и соавт., 1980, Anal. Biochem. 102: 255, Патент США № 4,767,704, Патент США № 4,657,866, Патент США № 4,927,762, Патент США № 4,560,655, Патент США № 5,122,469, WO 90/103430 и WO 87/00195 может быть использована в качестве культуральной среды для клеток-хозяев. Любая из этих сред может быть при необходимости дополнена гормонами и/или другими факторами роста (такими как инсулин, трансферрин или эпидермальный фактор роста), солями (такими как хлорид натрия, кальция, магния и фосфат), буферами (такими как HEPES), нуклеотидами (такими как аденозин и тимидин), антибиотиками (такими как гентамицин), микроэлементами (определяемыми как неорганические соединения, обычно присутствующие в конечных концентрациях в микромолярном диапазоне) и глюкозой или эквивалентным источником энергии. Другие добавки также могут быть включены в подходящих концентрациях, которые известны специалистам в данной области. Условия культивирования, такие как температура, pH и т.п. представляют собой условия, которые ранее использовали с клеткой-хозяином, выбранной для экспрессии, и будут очевидны специалисту в данной области стандартного уровня подготовки.

При использовании рекомбинантных методов антитело можно продуцировать внутриклеточно, в периплазматическом пространстве или непосредственно секретировать в среду. Если антитело продуцируется внутриклеточно, клетки могут быть разрушены для высвобождения белка в качестве первой стадии. Частицы дебриса, либо клетки-хозяева, либо лизированные фрагменты, могут быть удалены, например, центрифугированием или ультрафильтрацией. У Carter и соавт., 1992, Bio/Technology 10:163-167 описана процедура выделения антител, которые секретируются в периплазматическое пространство *E. coli*. Вкратце, клеточную пасту размораживают в присутствии ацетата натрия (pH 3,5), EDTA и фенилметилсульфонилфторида (PMSF) в течение примерно 30 минут. Клеточный дебрис можно удалить центрифугированием. Когда антитело секретируется в среду, супернатанты таких экспрессионных систем обычно сначала концентрируют с использованием коммерчески доступного фильтра для концентрации белка, например, устройства ультрафильтрации Amicon или Millipore Pellicon. Ингибитор протеазы, такой как PMSF, может быть включен в любую из вышеупомянутых стадий для ингибирования протеолиза, а антибиотики могут быть включены для предотвращения роста случайных загрязняющих веществ. Для выделения антитела из клетки-хозяина можно использовать различные методы.

Композиция антител, полученная из клеток, может быть очищена с использованием, например, хроматографии с гидроксилпатитом, гель-электрофореза, диализа и аффинной хроматографии, при этом типичным методом очистки является аффинная хроматография. Пригодность белка А в качестве аффинного лиганда зависит от вида и изоформа любого домена Fc иммуноглобулина, присутствующего в антителе. Белок А можно использовать для очистки антител, которые основаны на тяжелых цепях гамма 1, гамма2 или гамма4 человека (см., например, Lindmark и соавт., 1983 J. Immunol. Meth. 62:1-13). Белок G рекомендуется для всех изоформ мыши и для гамма-3 человека (см., например, Guss и соавт., 1986 EMBO J. 5:1567-1575). Матрица, к которой присоединен аффинный лиганд, чаще всего представляет собой агарозу, но доступны и другие матрицы. Механически стабильные матрицы, такие как стекло с контролируемыми порами или поли(стиролдвинил)бензол обеспечивают более высокие скорости потока и более короткое время обработки, чем может быть достигнуто с агарозой. Если антитело содержит домен Снз для очистки может быть использована смола Bakerbond ABX™ (J. T. Baker, Phillipsburg, N.J.). Другие методы очистки белка, такие как фракционирование на ионообменной колонке, осаждение этанолом, ВЭЖХ с обращенной фазой, хроматография на диоксиде кремния, хроматография на гепарине SEPHA-ROSE™, хроматография на анионной или катионообменной смоле (например, колонка с полиаспарагиновой кислотой), хроматофокусирование, SDS-PAGE и осаждение сульфатом аммония также доступны в зависимости от антитела, которое необходимо выделить.

После любой предварительной стадии(й) очистки смесь, содержащая представляющее интерес антитело и примеси, может быть подвергнута хроматографии гидрофобного взаимодействия с низким pH с использованием элюирующего буфера при pH примерно 2,5-4,5, обычно проводимая при низких концентрациях соли (например, от около 0-0,25 М соли).

Также включены нуклеиновые кислоты, которые гибридизуются в условиях низкой, средней и высокой жесткости, как определено в настоящей заявке, со всей или частью (например, частью, кодирующей переменную область) нуклеотидной последовательности, представленной изолированной полинуклеотидной последовательностью(ми), которые кодируют антитело против Sema3A или фрагмент антитела. Гибридизирующаяся часть гибридизирующейся нуклеиновой кислоты обычно имеет длину по меньшей мере 15 (например, 20, 25, 30 или 50) нуклеотидов.

Гибридирующаяся часть гибридирующейся нуклеиновой кислоты по меньшей мере на 80%, например, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, или по меньшей мере на 98%, идентична последовательности части или всей нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид против Sema3A (например, варибельная область тяжелой цепи или легкой цепи) или его комплемент. Гибридирующиеся нуклеиновые кислоты описанного в настоящей заявке типа можно использовать, например, в качестве зонда для клонирования, праймера, например, праймера ПЦР, или диагностического зонда.

В одном варианте осуществления настоящее изобретение относится к выделенному полинуклеотиду или полинуклеотидам, содержащим последовательность, кодирующую тяжелую цепь, как представлено в SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, или SEQ ID NO: 19 или варибельную область тяжелой цепи, как представлено в SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 или SEQ ID NO: 10; и последовательность, кодирующую легкую цепь, как представлено в SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 18 или SEQ ID NO: 20 или варибельную область легкой цепи, как представлено в SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12 или SEQ ID NO: 13.

Следует понимать, что в указанных антителах против Sema3A и фрагментах антител последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая CDR, остается неизменной (неизменной по отношению к кодируемой ими аминокислоте, возможны эквиваленты последовательности ДНК из-за вырожденности кодонов), но могут быть сконструированы окружающие области, например, области FR

Изделия промышленного производства

В другом аспекте предлагается изделие промышленного производства, содержащее материалы, пригодные для лечения описанных выше расстройств. Изделие промышленного производства включает в себя емкость и этикетку. Подходящими емкостями являются, например, бутылки, флаконы, шприцы и пробирки. Емкости могут быть изготовлены из различных материалов, таких как стекло или пластик. Емкость содержит композицию, которая эффективна для лечения состояния и может иметь стерильное отверстие для доступа. Например, емкость может представлять собой пакет с раствором для внутривенного введения или флакон, имеющий пробку, пробиваемую иглой для подкожных инъекций. Активное средство в композиции представляет собой антитело против Sema3A или его антигенсвязывающий фрагмент. Этикетка на емкости или связанная с емкостью указывает, что композицию используют для лечения выбранного состояния. Изделие промышленного производства может дополнительно содержать вторую емкость, содержащую фармацевтически приемлемый буфер, такой как забуференный фосфатом физиологический раствор, раствор Рингера и раствор декстрозы. Оно может дополнительно включать в себя другие материалы, необходимые с коммерческой точки зрения и с точки зрения пользователя, включая другие буферы, разбавители, фильтры, иглы, шприцы и вкладыши в упаковки с инструкциями по применению.

Изобретение дополнительно описано в следующих примерах, которые не предназначены для ограничения объема изобретения.

Примеры

Пример 1: Повышенная регуляция Sema3A в стекловидном теле пациентов с DME и PDR

Экспрессию Sema3A в сетчатке образцов от людей-доноров с историей диабетической ретинопатии исследовали с помощью иммуногистохимии. Протокол иммуноокрашивания был следующим:

1. Разморозить предметные стекла и дать образцам высохнуть на воздухе в течение 30 минут при комнатной температуре (КТ);
2. Очертить образцы в коробке маркером Pap Pen и дать высохнуть;
3. Вернуть антиген в 1% SDS в течение 5 мин. при КТ;
4. Промыть предметные стекла 3 раза в PBS в течение 5 мин;
5. Блокировать срезы в растворе 1% BSA/0,3% Triton X100/PBS (блокирующий раствор) в течение 30 мин при КТ;
6. Развести 1-е антитело кролика против Sema3a (abcam, ab23393) 1:200 в блокирующем растворе. Инкубировать срезы на предметном стекле при КТ в течение ночи;
7. Промыть предметные стекла 3 раза в PBS в течение 5 мин;
8. Вторая инкубация антител с антикроличьим антителом ослы Alexa fluor546 (invitrogen, A10040) при разведении 1:400 в растворе DAPI/0,3% Triton X100/ PBS. Инкубировать срезы на предметном стекле в течение 3 часов при КТ;
9. Промыть предметные стекла 3-5 раз в PBS в течение 5 мин;
10. Покрыть срезы стеклами Aquamount и дать высохнуть на воздухе;
11. Отобразить срезы и отсортировать по интенсивности при 40-кратном увеличении.

Наборы из трех срезов на каждого донора-человека были иммуноокрашены для Sema3A. Маркировка Sema3A была независимо оценена в каждой из этих областей наблюдателями, предварительно обученными этой конкретной задаче, с использованием 5-балльной схемы оценки (0 = отсутствие обнаружения, 1 = низкая интенсивность, несколько точек, 2 = умеренная интенсивность, несколько точек, 3 = яркая интенсивность, обширное окрашивание и 4 = очень яркая интенсивность, обильное обнаружение). Наблюдатели не знали о состоянии здоровья доноров глаз. В сетчатке Sema3A был связан со стенкой сосудистой сети кровеносных сосудов сетчатки. Экспрессия Sema3A в сосудистой сети сетчатки и па-

ренхиме сетчатки была увеличена у пациентов с диабетическим отеком желтого пятна по сравнению с диабетиками без глазной патологии (фиг. 1).

Пример 2: Эффективность в анализе клеточной проницаемости

Трансцеллюлярную проницаемость измеряли по проникновению FITC-декстрана в монослой эндотелиальных клеток микрососудов сетчатки человека (HRMEC).

Вкратце, проницаемость эндотелия *in vitro* измеряли с использованием набора Millipore ("In Vitro Vascular Permeability Assay" каталожный № ECM642) и эндотелиальных клеток микрососудов сетчатки человека (HRMEC). Набор для анализа включает в себя 96-луночный приемный планшет со вставками для клеточных культур. Вставки содержат поры размером 1 мкм и покрыты коллагеном из крысиного хвоста I типа. HRMEC высевали на вставки при плотности 25000 клеток/луночку и клеткам давали возможность вырасти в монослой в течение 3 дней. Клетки обрабатывали рекомбинантным VEGF-A, Sema3A, а также антителом в соответствии с изобретением в течение ночи. Раствор высокомолекулярного FITC-декстрана, входящий в набор, был добавлен во вставку, позволяя флуоресцентным молекулам проходить через монослой эндотелиальных клеток. Проницаемость *in vitro* определяли путем измерения флуоресценции раствора лунок приемного планшета при 485 нм/535 нм (возбуждение и поглощение).

Авторы изобретения протестировали типичное антитело в соответствии с изобретением: клон I. Указанное антитело содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14 и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15.

Антитело против Sema3A в соответствии с изобретением полностью ингибировало проницаемость, индуцированную посредством Sema3A, но не проницаемость, индуцированную посредством VEGF-A (фиг. 2). Важно отметить, что эффект проницаемости Sema3A не зависит от VEGF-A. Использование контрольного антитела, направленного против TNP, подтверждает, что эффект обусловлен специфической мишенью Sema3A антителом в соответствии с изобретением.

Пример 3: Измерение коллапса цитоскелета в клеточном анализе

Клеточную активность примерного антитела в соответствии с изобретением (клон I) оценивали по методу коллапса цитоскелета в эндотелиальных клетках микрососудов сетчатки человека (HRMEC) с использованием системы XCELLigence (инструменты анализа клеток в реальном времени, коммерциализированные ACEA Biosciences). Система измеряет прикрепление и слияние клеток с помощью клеточного импеданса. HRMEC эндогенно экспрессирует нейропилин-1 (Nrp1) и плексины, которые являются компонентами холорецептора Семафорин класса 3. Связываясь с этим рецепторным комплексом, семафорины вызывают коллапс волокон F-актина в эндотелии. В этом функциональном анализе добавление рекомбинантного белка Sema3A к конфлюэнтному слою эндотелиальных клеток микрососудов сетчатки человека снижает клеточный импеданс из-за коллапса цитоскелета и последующего сжатия клеток, что измеряется как уменьшение клеточного импеданса.

Вкратце, E-Plates View были покрыты фактором прикрепления. Клетки высевали с плотностью 20000 клеток/луночку, а затем им давали возможность вырасти в монослой в нормальных условиях роста внутри устройства XCELLigence в течение ночи.

Комбинация Sema3A (или другие семафорины класса 3) с антителом против Sema3A и без него в соответствии с изобретением добавляли в присутствии 3 mM CaCl₂. Индекс клеток нормировали на момент времени до добавления веществ. Расчеты производили через 5 часов после стимуляции.

Коллапс цитоскелета, вызванный посредством Sema3A, можно полностью предотвратить с помощью антитела против Sema3A в соответствии с изобретением. Коллапс цитоскелета, вызванный другими тестируемыми семафоринами (B, C, E и F), не мог быть предотвращен антителом против Sema3A в соответствии с изобретением, что подтверждает его специфичность по отношению к антителу в соответствии с изобретением к Sema3A (фиг. 3).

Пример 4: Средство и клеточная эффективность

А) Средство

Рабочий буфер для этого эксперимента и все разведения (за исключением указанных) были выполнены в PBS-T-EDTA с 0,01% Tween20 [100 мкл 100% Tween20 добавляли к 2 л PBS-T-EDTA, чтобы конечная концентрация Tween 20 составляла 0,01 %]. Сенсорный чип GLM был нормализован и предварительно кондиционирован в соответствии с рекомендациями производителя. Сенсорный чип активировали равной смесью EDC/s-NHS в горизонтальном направлении в течение 300 секунд при скорости потока 30 мкл/мин и иммобилизовали с помощью Human Fab Binder (10 мкг/мл в 10 mM ацетате pH 5,0) в горизонтальном направлении в течение 300 секунд при скорости потока 30 мкл/мин. в результате чего на поверхности образуется ~ 6739-7414 RU человеческого Fab Binder. Сенсорный чип дезактивировали посредством 1M этаноламина HCl в горизонтальном направлении в течение 300 секунд при скорости потока 30 мкл/мин. Сенсорный чип стабилизировали в течение 18 секунд 10 mM глицина, pH 2,1 при скорости потока 100 мкл/мин 1 раз по горизонтали и 1 раз по вертикали.

Авторы изобретения протестировали примерное антитело в соответствии с изобретением (клон I). Указанное антитело (0,5 мкг/мл) было захвачено на поверхности человеческого Fab Binder вертикально в течение 300 секунд при скорости потока 25 мкл/мин, что привело к уровню захвата ~180 RU. Базовый уровень был стабилизирован путем инъекции PBS-T-EDTA в течение 60 секунд при скорости потока 40

мкл/мин. по горизонтали. Аналит впрыскивали горизонтально над захваченным антителом в течение 600 секунд при скорости потока 40 мкл/мин. и диссоциации в течение 7200 секунд. Концентрации аналитов составляли 0 нМ, 0,625 нМ, 1,25 нМ, 2,5 нМ, 5 нМ и 10 нМ. Поверхность регенерировали путем инъекции 10 мМ глицина, рН 2,1 в течение 18 секунд при скорости потока 100 мкл/мин. один раз по горизонтали и один раз по вертикали. PBS-T-EDTA впрыскивали в течение 60 секунд при скорости 25 мкл/мин один раз вертикально.

Промежуточное пятно (взаимодействие с поверхностью сенсора) и холостой пробы (PBS-T-EDTA с 0,01% Tween20 или 0 нМ аналита) вычитали из исходных данных. Затем сенсограммы были адаптированы глобально к связыванию Ленгмюра 1:1 для получения значений скорости (k_a), отклонения (k_d) и сродства (K_D).

В) Клеточная активность

Для определения функциональной активности в анализе коллапса цитоскелета кривые ответа концентрации Sema3A были объединены с возрастающими концентрациями антитела в экспериментах со сдвигом IC50. График Гэддама Шильда был выполнен для расчета значения pA_2 (отрицательный логарифм концентрации антитела, необходимый для сдвига кривой ответа концентрации Sema3A в 2 раза). Активность в пМ рассчитывали по значению pA_2 как =АКТИВНОСТЬ(10^{-X}).

Результаты приведены в табл. 6 ниже.

Таблица 6

Молекула	Сродство (K_d) [пМ]					Функциональный антагонизм в анализе коллапса цитоскелета (A_2) [пМ]
	Человек	Цино	Мышь	Крыса	Кролик	
Антитело в соответствии с изобретением (клон I)	29	28	27	27	42	69

Пример 5: Оценка иммуногенности антитела в соответствии с изобретением

Авторы изобретения оценили предполагаемую иммуногенность примерного антитела в соответствии с изобретением, клон I. Указанное антитело содержит тяжелую цепь и легкую цепь, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 14 и SEQ ID NO: 15 соответственно.

С этой целью они использовали инструмент *in silico* для прогнозирования эпитопов Т-клеток (EpiMatrix, разработанный в EpiVax).

Путем скрининга последовательностей многих изолятов антител человека в EpiVax идентифицировали несколько высококонсервативных лигандов HLA, которые, как полагают, обладают регуляторным потенциалом. Экспериментальные данные свидетельствуют о том, что многие из этих пептидов на самом деле обладают активным толерогенным действием у большинства субъектов. Эти высококонсервативные, регуляторные и беспорядочные Т-клеточные эпитопы теперь известны как трегитопы (De Groot и соавт. Blood. 2008 окт. 15; 112(8):3303-11). Иммуногенный потенциал неопэпитопов, содержащихся в гуманизированных антителах, можно эффективно контролировать в присутствии значительного количества трегитопов.

Для целей анализа иммуногенности антител компания EpiVax разработала скорректированную по трегитопу шкалу EpiMatrix и соответствующее прогнозирование ответа антител против терапевтических средств. Для расчета по шкале EpiMatrix, скорректированной по трегитопу, оценки трегитопов вычитают из оценки белка EpiMatrix. Оценки, скорректированные с учетом трегитопов, хорошо коррелируют с наблюдаемым клиническим иммунным ответом на набор из 23 коммерчески доступных антител (De Groot и соавт. Clin Immunol. 2009 May;131(2):189-201).

Результаты по шкале EpiMatrix представлены в табл. 7 ниже.

Таблица 7

Молекула	Тяжелая цепь (% человека)		EpiVax (VH)	EpiVax (VK)	Легкая цепь (% человека)	
	FR	V-ген			FR	V-ген
Антитело в соответствии с изобретением (клон I)	97	91	-27.27	-21.79	98	88

Последовательности антитела в соответствии с изобретением оценивают по нижнему пределу шкалы EpiMatrix, что указывает на то, что антитело в соответствии с изобретением имеет сильно ограниченный потенциал иммуногенности. Указанная шкала EpiMatrix хорошо известна специалистам в данной области и может быть найдена, среди прочего, на фиг. 2 публикации Mufarrete и соавт. Clin Immunol. 2017 Mar; 176:31-41.

Пример 6: Эффективность в отношении плотности ведущих клеток и бессосудистой области *in vivo* (модель OIR ретинопатии, индуцированной кислородом)

Эффект примерного антитела в соответствии с изобретением (клон I) на реваскуляризацию ишемической бессосудистой области исследовали на мышинной модели вызванной кислородом ретинопатии (OIR). Приплод мышей C57B1/6J подвергали воздействию атмосферы с 75% кислорода с 7-го до 12-го постнатального дня. Это приводит к регрессии кровеносных сосудов в центральной сетчатке и формированию бессосудистой области. После возвращения к нормоксическому состоянию эта область становится ишемической. Мышатам вводят однократную интравитреальную инъекцию 10 мкг антитела в 0,5 мкл раствора в каждый глаз под анестезией изофлураном на 12-й постнатальный день. На 17-й постнатальный день животных умерщвляют и глаза вынимают. Глаза фиксируют в формалине и готовят планшет для сетчатки, в котором кровеносные сосуды сетчатки окрашивают изолектином B4. Количество ведущих клеток (специализированных эндотелиальных клеток, инициирующих образование новых сосудов) подсчитывают на бессосудистом фронте вдоль всей сетчатки (граница между васкуляризованной периферической областью и бессосудистой центральной областью сетчатки).

Ведущие клетки были идентифицированы по их особой морфологии, показывающей расширение филоподий. Для анализа количество ведущих клеток нормализуется по длине бессосудистого фронта. Размер бессосудистой области определяется с помощью конфокального микроскопа и программного обеспечения для анализа изображений.

Антитело против Sema3A в соответствии с изобретением увеличивает плотность ведущих клеток в модели OIR мышей (фиг. 4). Кроме того, это показывает уменьшение бессосудистой области. Существует отрицательная корреляция между плотностью ведущих клеток и размером бессосудистой области, что указывает на механистическую зависимость этих двух параметров. Использование контрольного антитела, направленного против TNP, подтверждает, что эффект обусловлен специфической мишенью Sema3A антителом в соответствии с изобретением.

В целом, антитело против Sema3A в соответствии с изобретением уменьшает размер ишемической бессосудистой области в животной модели ретинопатии, вызванной кислородом, что указывает на положительный эффект при лечении диабетической ишемии желтого пятна.

Пример 7: Сравнение антитела против Sema3A и авастина $t_{1/2}$ в глазу кролика
Результаты представлены в табл. 8 ниже.

Таблица 8

	Рассчитанный $t_{1/2}$ (день)		Авастин
	Антитело в соответствии с изобретением (клон I)		
	День 0-14	Все	
Стекловидное тело	5.1	3.9	4.4
Сетчатка	6.1	4.1	4.8
Внутриглазная жидкость	4.7	3.3	4.5

Рассчитанные периоды полураспада составили 3,9, 4,1 и 3,3 дня в стекловидном теле, сетчатке и внутриглазной жидкости соответственно. Эти периоды полураспада аналогичны периодам полураспада, описанным в литературных источниках для клинически используемого рекомбинантного гуманизированного моноклонального антитела IgG1 Авастин (против VEGF, бевацизумаб, Vapri и соавт., Ophthalmology, 2007), что также было экспериментально подтверждено авторами изобретения. Эти результаты были ожидаемыми, поскольку интравитреальный клиренс полноразмерных IgG зависит главным образом от их молекулярного размера, который аналогичен антителу в соответствии с изобретением и Авастину. Следовательно, ожидается, что ПК человека, включая период полувыведения антитела в соответствии с изобретением и Авастина, будет аналогичным. Сообщаемый период полувыведения Авастина из глаз человека составляет $9,73 \pm 1,48$ дня (Hutton-Smith, 2016).

Пример 8: Сравнение средства к связыванию между антителом в соответствии с изобретением и антителом от Chiome

В целях сравнения изобретатели разработали гуманизированное антитело, направленное против Sema3A, раскрытое в WO 2014123186 (Chiome Bioscience) со следующими характеристиками:

тяжелая цепь является такой, как показана в SEQ ID NO: 11 в WO 2014123186 и

легкая цепь является такой, как показана в SEQ ID NO: 12 в WO 2014123186.

Авторы изобретения разработали 2 формы этого антитела:

одно, отформатированное на IgG1KO Fc, в дальнейшем именуемое как "антитело A от Chiome" и

одно, отформатированное на нулевом IgG1KO-FcRn, в дальнейшем именуемое как "антитело B от Chiome".

Высокая поверхностная плотность антитела против человеческого Fab (GE Healthcare) была иммобилизована на чипе GLM (BioRad) посредством прямого аминного связывания по 6 горизонтальным каналам в соответствии с руководством производителя BioRad.

Антитело в соответствии с изобретением (клон I) и антитело от Chiome были захвачены на поверхности антитела против Fab человека по 5 из 6 вертикальных каналов с минимальной поверхностной

плотностью для анализа кинетического связывания. Sema3A человека получали в буфере PBS-T-EDTA (BioRad) в концентрациях 100, 50, 25, 12,5, 10, 6,25, 5, 2,5, 1,25, 0,625 и 0 нМ.

Инъекцию буфера PBS-T-EDTA использовали в качестве двойного эталона для анализа кинетических данных. Каждый из растворов Sema3A человека и буфер PBS-T-EDTA вводили одновременно через 6 горизонтальных каналов в течение 10 мин при скорости 40 мкл/мин. с последующей фазой диссоциации в течение 2 ч. Поверхности регенерировали путем 18-секундной инъекции 10 мМ глицина HCl (GE Healthcare) при скорости потока 100 мкл/мин с последующей инъекцией 60 секунд PBS-T-EDTA при скорости потока 25 мкл/мин. Сенсограммы связывания соответствовали модели Ленгмюра 1:1 для расчета скорости ассоциации, скорости диссоциации и сродства.

Данные кинетики и сродства антитела в соответствии с изобретением и антител от Chiome, связывающихся с человеческим Sema3A, перечислены в табл. 9 ниже.

Таблица 9

Название образца	KD к HuSema3A
Антитело А от Chiome	56.4 нМ
Антитело В от Chiome	55.9 нМ
Антитело в соответствии с изобретением (клон I)	32.0 нМ

Заключение

Результаты показывают, что доказано, что антитело в соответствии с изобретением имеет более высокое сродство к связыванию с человеческим Sema3A, чем антитела из предшествующего уровня техники, раскрытые в WO2014123186 (Chiome Bioscience).

Пример 9: Сравнение сродства к связыванию между антителом в соответствии с изобретением и Samsung scFv

Сравнивали фрагменты scFv, раскрытые в WO 2017074013 (Samsung).

В целях сравнения изобретатели разработали 3 раскрытых фрагмента scFv ("Samsung scFv") с признаками, раскрытыми в табл. 10 ниже.

Таблица 10

Название антитела	Последовательности	SEQ ID NO как изложено в WO 2017074013
Samsung scFv 1	Тяжелая цепь	19
	Легкая цепь	20
Samsung scFv 2	Тяжелая цепь	21
	Легкая цепь	22
Samsung scFv 3	Тяжелая цепь	23
	Легкая цепь	24

Антитело против His с высокой поверхностной плотностью (GE Healthcare) иммобилизовали на чипе GLM (BioRad) посредством прямого аминного связывания по 6 горизонтальным каналам в соответствии с руководством производителя BioRad. Антитела Samsung scFv были захвачены на поверхности антитела против His по 5 из 6 вертикальных каналов с минимальной поверхностной плотностью для анализа кинетического связывания. Sema3A человека получали в буфере PBS-T-EDTA (BioRad) в концентрациях 100, 50, 25, 12,5, 10, 6,25, 5, 2,5, 1,25, 0,625 и 0 нМ. Инъекцию буфера PBS-T-EDTA использовали в качестве двойного эталона для анализа кинетических данных. Каждый из растворов Sema3A человека и буфер PBS-T-EDTA впрыскивали одновременно через 6 горизонтальных каналов в течение 10 мин при скорости потока 40 мкл/мин. с последующей фазой диссоциации в течение 1 часа. Поверхности регенерировали путем 18-секундной инъекции 10 мМ глицина HCl с pH 2,1 (GE Healthcare) при скорости потока 100 мкл/мин. с последующей инъекцией 60 секунд PBS-T-EDTA при скорости потока 25 мкл/мин. Сенсограммы связывания соответствовали модели Ленгмюра 1:1 для расчета скорости ассоциации, скорости диссоциации и сродства.

Связывание антитела в соответствии с изобретением с Sema3A человека (клон I) осуществляли с использованием аналогичного метода, но для захвата антитела в соответствии с изобретением использовали козий античеловеческий IgG (Invitrogen). Связывание антитела в соответствии с изобретением и Samsung ScFv с Sema3A яванского макака, мыши, крысы или кролика также осуществляли с использованием тех же методов.

Данные кинетики и сродства антитела в соответствии с изобретением и Samsung scFv перечислены в табл. 11 ниже.

Таблица 11

Название антитела	K _D к HuSema3A (пМ)	K _D к CyноSema3 A (пМ)	K _D к Sema3A мыши (пМ)	K _D к Sema3A крысы (пМ)	K _D к Sema3A кролика (пМ)
Samsung scFv 1	359	89.0	105	< 20	112

Samsung scFv 2	359	118	117	< 20	122
Samsung scFv 3	296	68.0	88.8	< 20	59.5
Антитело в соответствии с изобретением (клон I)	34.7	35.0	35.0	23.5	40.1

Заключение

Антитело в соответствии с изобретением имеет более высокое сродство связывания с Sema3A человека, яванского макака, мыши или кролика Sema3A, чем 3 Samsung scFv, как описано в WO2017074013.

Пример 10: Сравнение сродства двух антител в соответствии с изобретением

Авторы изобретения разработали два антитела, имеющие CDR, представленные в SEQ ID NO: 1-6. Два антитела различаются по области Fc в том, что:

одно антитело содержит комбинацию L234A и L235A (антитело A), а

другое антитело содержит мутацию H435A (антитело B), остатки пронумерованы в соответствии с EU индексом по Кабату.

Не было показано статистической разницы в сродстве связывания обоих антител с Sema3A человека, имеющих CDR, как представлено в SEQ ID NO: 1-6. Следовательно, сродство с Sema3A человека сохраняется в антителах, направленных против Sema3A в соответствии с изобретением.

Пример 11: Эффективность коммерчески доступных антител, направленных против Sema3A

Для сравнения авторы изобретения проверили клеточную активность коммерчески доступного антитела, нацеленного на Sema3A. Указанное антитело является коммерчески доступным от Creative Biolabs под названием "Терапевтическое антитело против SEMA3A человека, гуманизированное (CAT №: TAB-556CL)". Указанное коммерчески доступное антитело в дальнейшем будет называться как "Антитело от Creative Biolabs antibody".

Клеточную активность антитела от Creative Biolabs оценивали по методу коллапса цитоскелета в эндотелиальных клетках микрососудов сетчатки человека (HRMEC) по тому же протоколу, что и в Примере 3. Расчеты и определение активности проводили через 5 часов после стимуляции.

В этих условиях антитело от Creative Biolabs не проявляло активности в отношении коллапса цитоскелета, вызванного посредством Sema3A. Коллапс цитоскелета, вызванный посредством Sema3A, действительно не мог быть предотвращен антителом от Creative Biolabs.

Таким образом, доказано, что антитело от Creative Biolabs не предотвращает вызванный посредством Sema3A коллапс цитоскелета в клетках сетчатки, тогда как в тех же условиях антитело в соответствии с изобретением предотвращает. Это подтверждает удивительный и неожиданный эффект антитела в соответствии с изобретением.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Антитело против Sema3A или его антигенсвязывающий фрагмент, которые содержат:
вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1 (H-CDR1); аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2 (H-CDR2); и аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3 (H-CDR3); и

вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4 (L-CDR1); аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5 (L-CDR2); и аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6 (L-CDR3).

2. Антитело против Sema3A или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1, при этом антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит:

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 или SEQ ID NO: 10; и

вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12 или SEQ ID NO: 13.

3. Антитело против Sema3A или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1, при этом антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит:

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 или SEQ ID NO: 10; и

вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, по мень-

шей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12 или SEQ ID NO: 13;

при этом:

вариабельная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1 (H-CDR1); аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2 (H-CDR2); и аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3 (H-CDR3); и

вариабельная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4 (L-CDR1); аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5 (L-CDR2); и аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6 (L-CDR3).

4. Антитело против Sema3A или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1, при этом антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит:

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 или SEQ ID NO: 10 и

вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12 или SEQ ID NO: 13.

5. Антитело против Sema3A или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1, при этом антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит:

а. вариабельную тяжелую цепь и вариабельную легкую цепь, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 7 и SEQ ID NO: 11, соответственно;

б. вариабельную тяжелую цепь и вариабельную легкую цепь, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 8 и SEQ ID NO: 11, соответственно;

в. вариабельную тяжелую цепь и вариабельную легкую цепь, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 9 и SEQ ID NO: 12, соответственно; или

г. вариабельную тяжелую цепь и вариабельную легкую цепь, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 10 и SEQ ID NO: 13, соответственно.

6. Антитело против Sema3A или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1, при этом антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит:

тяжелую цепь, содержащую, предпочтительно состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17 или SEQ ID NO: 19; и

легкую цепь, содержащую, предпочтительно состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 18 или SEQ ID NO: 20.

7. Антитело против Sema3A или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1, при этом антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит:

а. тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15;

б. тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15;

в. тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18; или

г. тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20.

8. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по одному из пп.1-7, где указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент включены в состав, пригодный для парентерального пути, внутривенного пути, интравитреального пути или подкожного пути введения.

9. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по одному из пп.1-7, где указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент включены в состав, пригодный для интравитреального пути введения.

10. Применение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по одному из пп.1-7 для получения лекарственного средства.

11. Применение по п.10 для получения лекарственного средства для ингибирования вазорепрессивного действия Sema3A.

12. Применение по п.10 для получения лекарственного средства для улучшения ревазуляризации сетчатки.

13. Применение антитела или антигенсвязывающего фрагмента по одному из пп.1-7 для получения лекарственного средства для лечения или предупреждения заболевания глаза или сетчатки.

14. Применение по п.13, при котором указанное заболевание выбирают из группы, включающей диабетическую ретинопатию, включая пролиферативную диабетическую ретинопатию и непролиферативную диабетическую ретинопатию, ишемическую ретинопатию, диабетический отёк желтого пятна, диабетическую ишемию желтого пятна, возрастной отёк жёлтого пятна, неоваскуляризацию сетчатки, глаукому и хориоидальную неоваскуляризацию.

15. Применение по п.14, при котором указанное заболевание представляет собой диабетический

отёк желтого пятна и/или диабетическую ишемию желтого пятна.

16. Применение по п.14, при котором указанное заболевание представляет собой диабетическую ретинопатию.

17. Применение по п.14, при котором указанное заболевание представляет собой не пролиферативную диабетическую ретинопатию.

18. Применение по п.14, при котором указанное заболевание представляет собой пролиферативную диабетическую ретинопатию.

19. Применение по п.13 или 14, при котором:

указанное заболевание представляет собой диабетическую ишемию желтого пятна и

указанное антитело или антигенсвязывающий фрагмент способствует регенерации сосудов в ишемической сетчатке (ревазуляризация) и предотвращает патологическую неоваскуляризацию стекловидного тела глаза.

20. Применение по п.13 или 14, при этом:

указанное заболевание представляет собой диабетический отёк желтого пятна, и

указанное антитело или антигенсвязывающий фрагмент снижает проницаемость гематоретинального барьера.

21. Применение по п.20, при этом указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент ингибирует вызванную посредством Sema3A проницаемость гематоретинального барьера и/или вызванную посредством Sema3A вазорегрессию из ишемических областей.

22. Фармацевтическая композиция, содержащая антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по одному из пп.1-7 и фармацевтически приемлемый носитель.

23. Фармацевтическая композиция по п.22, где фармацевтическая композиция приготовлена в виде состава, пригодного для введения парентеральным путем, внутривенным путем, интравитреальным путем или подкожным путем.

24. Фармацевтическая композиция по п.23, где фармацевтическая композиция приготовлена в виде состава, пригодного для введения интравитреальным путем.

25. Выделенный полинуклеотид, содержащий:

последовательность, кодирующую тяжелую цепь, как представлено в SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17 или SEQ ID NO: 19, или вариательную область тяжелой цепи, как представлено в SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 или SEQ ID NO: 10; и

последовательность, кодирующую легкую цепь, как представлено в SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 18 или SEQ ID NO: 20, или вариательную область легкой цепи, как представлено в SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12 или SEQ ID NO: 13.

26. Вектор экспрессии, содержащий выделенный полинуклеотид по п.25.

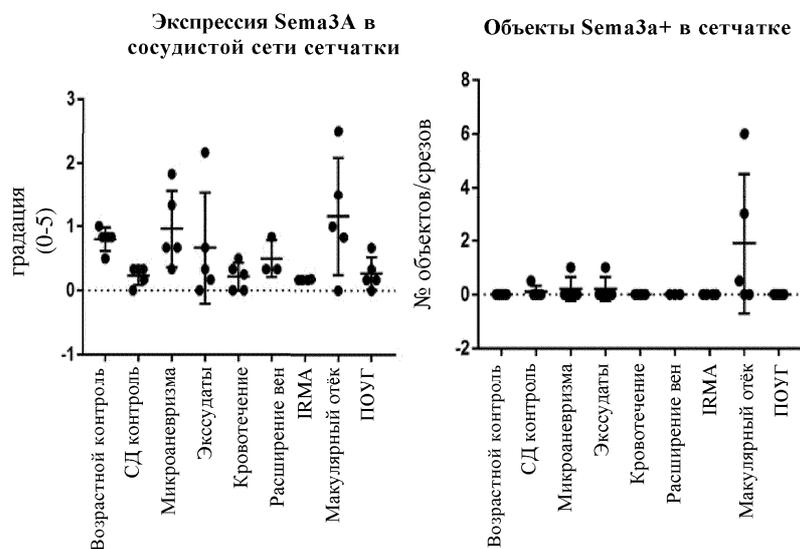
27. Клетка-хозяин, содержащая выделенный полинуклеотид по п.25 или вектор экспрессии по п.26.

28. Способ получения антитела против Sema3A или его антигенсвязывающего фрагмента, включающий в себя:

а. получение клетки-хозяина по п.27; и

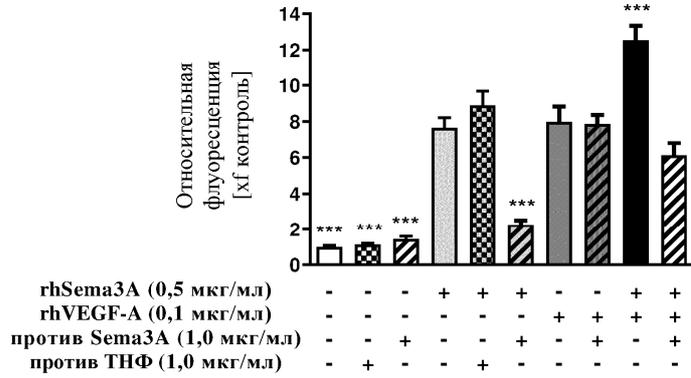
б. культивирование клетки-хозяина.

29. Способ по п.28, дополнительно включающий в себя восстановление и очистку антитела или его антигенсвязывающего фрагмента.



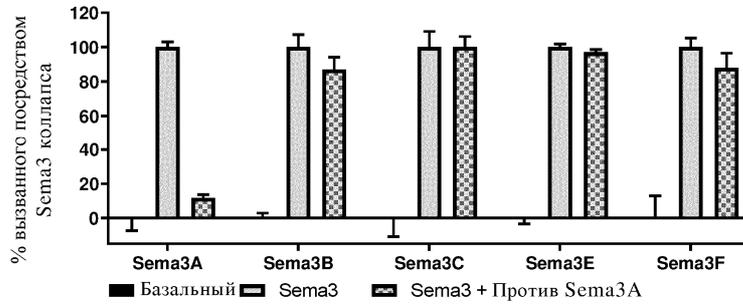
Фиг. 1

Трансвел-анализ проницаемости *in vitro*
(Проникновение FITC-декстрана в монослой HRMEC)



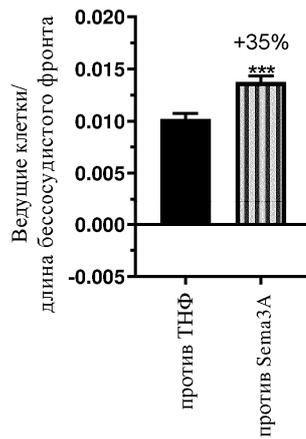
Фиг. 2

Коллапс цитоскелета в HRMEC (Xcelligence)

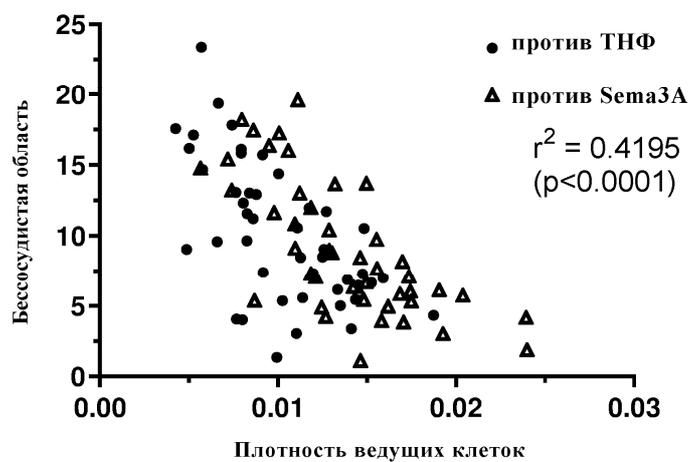


Фиг. 3

Плотность ведущих клеток

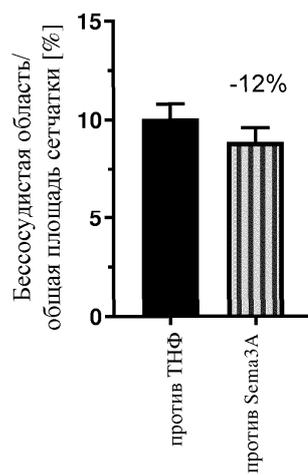


Фиг. 4А

Плотность ведущих клеток
по сравнению с бессосудистой областью

Фиг. 4В

Бессосудистая область



Фиг. 4С