

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(21) **202391200** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки  
2023.07.21

(51) Int. Cl. *C07K 16/18* (2006.01)  
*A61P 27/02* (2006.01)

(22) Дата подачи заявки  
2021.10.22

---

(54) **АНТИТЕЛА ПРОТИВ Sema3A И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ  
ТРОМБОТИЧЕСКОГО ЗАБОЛЕВАНИЯ СЕТЧАТКИ**

---

(31) 20203645.5

(32) 2020.10.23

(33) EP

(86) PCT/EP2021/079301

(87) WO 2022/084490 2022.04.28

(71) Заявитель:  
**БЁРИНГЕР ИНГЕЛЬХАЙМ  
ИНТЕРНАЦИОНАЛЬ ГМБХ (DE)**

(72) Изобретатель:

**Томас Лео, Баккер Ремко Александер  
(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)**

---

(57) Настоящее изобретение в целом относится к антителам и их фрагментам, нацеленным на семафорин 3A (Sema3A) для применения в лечении тромботического заболевания сетчатки глаза.

**A1**

**202391200**

**202391200**

**A1**

## АНТИТЕЛА ПРОТИВ СЕМА3А И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ТРОМБОТИЧЕСКОГО ЗАБОЛЕВАНИЯ СЕТЧАТКИ

5

### **ОБЛАСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ**

**[0001]** Настоящее изобретение в основном относится к антителам и их фрагментам, нацеленным на семафорин 3А (Sema3A) для применения в лечении тромботического заболевания сетчатки.

10

### **ПРЕДПОСЫЛКИ СОЗДАНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ**

**[0002]** Окклюзия вен сетчатки (RVO) представляет собой ограничение или блокировку кровотока, выходящего из сетчатки, и является вторым наиболее распространенным заболеванием сосудов сетчатки после диабетической ретинопатии. Вызывая различную степень потери зрения, окклюзия центральной вены сетчатки (CRVO) и окклюзия ветвей вены сетчатки (BRVO) могут осложняться макулярным отеком, который может привести к полной слепоте.

15

**[0003]** Не существует доступного лечения для устранения окклюзий вен сетчатки. Однако неоваскуляризацию радужной оболочки или сетчатки или отек макулы можно лечить с помощью инъекций анти-VEGF или стероидов. Другие терапевтические подходы включают использование лазера и хирургии. Однако ни один из существующих терапевтических подходов не обеспечивает надежного, безопасного и успешного исхода у пациентов, страдающих от RVO. Следовательно, до сих пор существует неудовлетворенная потребность в новых терапевтических подходах для эффективного лечения тромботических заболеваний сетчатки.

20

25

### **КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ**

**[0004]** Sema3A является эндогенным секретлируемым белком, принадлежащим к семейству семафоринов класса 3 (Sema3), которые первоначально были идентифицированы как молекулы аксонального поиска пути и участвуют в поиске пути сосудов и формировании сети. Нейропилин 1 и 2 (Nrp1 и Nrp2) и плексины типа A/D (Plxns) действуют как лиганды, связывающие и передающие сигнал субъединиц рецепторных комплексов Sema3 на поверхности эндотелиальных клеток (EC). Как особый член семейства Sema3,

30

Sema3A сначала связывается исключительно с Nrp1, а затем соединяется с Плексином A1-4 в виде комплекса (Nrp1/PlexA1-4). В этом рецепторном комплексе Nrp1 действует как связывающий элемент, тогда как PlexA1-4 действует как элемент, передающий сигнал.

5           **[0005]**     Семафорин 3А человека представляет собой белок, раскрытый в SEQ ID NO: 22 и доступный как Эталонная последовательность под регистрационным номером NCBI NP\_006071.1. Кроме того, человеческий Sema3A кодируется геном ID: 10371 (NCBI).

10           **[0006]**     Sema3A изучается в отношении ангиогенеза и метастазирования опухолей в течение многих лет, но его влияние на неоваскуляризацию сетчатки до сих пор неясно. Авторы изобретения продемонстрировали, что Семафорин 3А секретируется гипоксическими ганглиозными клетками сетчатки и действует как вазорепульсивный стимул. Sema3A отталкивает новые сосуды от ишемической области, вызывая коллапс цитоскелета в этих клетках. Не желая связываться  
15           какой-либо теорией, авторы изобретения предположили, что это может объяснить, почему ревазуляризация ишемических областей не происходит, а вместо этого активация Sema3A приводит к патологической неоваскуляризации в область стекловидного тела.

20           **[0007]**     Семафорин 3А секретируется гипоксическими нейронами в ишемизированной/аваскулярной сетчатке, тем самым ингибируя сосудистую регенерацию сетчатки и усиливая патологическую преретинальную неоваскуляризацию.

25           **[0008]**     Авторы изобретения использовали свое понимание биологии Sema3A и воздействия на сетчатку для разработки новой терапевтической стратегии лечения тромботических заболеваний сетчатки. Таким образом, **в первом аспекте** настоящее изобретение относится к антителу против Sema3A или его антигенсвязывающему фрагменту для применения в лечении тромботического заболевания сетчатки, при этом указанное антитело против Sema3A или его антигенсвязывающий фрагмент содержит

30           –       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

– переменную 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).

5        **[0009]**     В одном варианте воплощения указанное антитело против Sema3A или его антигенсвязывающий фрагмент содержит:

– переменную 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

10        – переменную 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:

– переменная 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

– переменная 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).

25        **[0010]**     В другом варианте воплощения указанное антитело против Sema3A или его антигенсвязывающий фрагмент содержит:

– переменную 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

30

– переменную 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.

**[0011]** В еще одном другом варианте воплощения указанное антитело против Sema3A или его антигенсвязывающий фрагмент содержит:

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

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

**[0012]** В другом варианте воплощения указанное антитело против Sema3A или его антигенсвязывающий фрагмент содержит:

a. переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 7 и SEQ ID NO: 11, соответственно;

b. переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 8 и SEQ ID NO: 11, соответственно;

c. переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 9 и SEQ ID NO: 12, соответственно; или

d. переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 10 и SEQ ID NO: 13, соответственно.

**[0013]** В еще одном другом варианте воплощения указанное антитело против Sema3A 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.

5 **[0014]** В конкретном варианте воплощения указанное антитело против Sema3A или его антигенсвязывающий фрагмент содержит:

a. тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14, и лёгкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15;

10 b. тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16, и лёгкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15;

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

15 d. тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19, и лёгкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20.

20 **[0015]** В конкретном предпочтительном варианте воплощения указанное антитело против Sema3A представляет собой гуманизированное антитело против Sema3A.

25 **[0016]** В предпочтительном варианте воплощения указанное тромботическое заболевание сетчатки выбирают из группы, состоящей из окклюзии вен сетчатки (RVO), включая окклюзию центральной вены сетчатки (CRVO), окклюзию вен полушарий сетчатки (HRVO), окклюзию ветвей вен сетчатки (BRVO), и окклюзионного заболевания артерий сетчатки. В еще одном предпочтительном варианте воплощения указанное тромботическое заболевание сетчатки выбирают из группы, состоящей из окклюзии вен сетчатки (RVO), включая окклюзию центральной вены сетчатки (CRVO), окклюзию вен полушарий сетчатки (HRVO) и окклюзию ветвей вен сетчатки (BRVO).

30 **[0017]** Во втором аспекте настоящее изобретение обеспечивает антитело против Sema3A или его антигенсвязывающий фрагмент, который связывается по меньшей мере с одним аминокислотным остатком в пределах аминокислотных областей 370-382 Sema3A человека, как показано в SEQ ID NO: 22, для применения в лечении тромботического заболевания сетчатки глаза.

Предпочтительно, указанное тромботическое заболевание сетчатки выбирают из группы, состоящей из окклюзии вен сетчатки (RVO), включая окклюзию центральной вены сетчатки (CRVO), окклюзию вен полушарий сетчатки (HRVO), окклюзию ветвей вен сетчатки (BRVO), и окклюзионного заболевания артерий сетчатки.

**[0018]** В одном варианте воплощения указанное антитело против Sema3A или его антигенсвязывающий фрагмент связывается по меньшей мере с одним аминокислотным остатком в пределах аминокислотных областей, представленных в SEQ ID NO: 21 (DSTKDLPDDVITF). В предпочтительном варианте воплощения настоящее изобретение обеспечивает антитело против Sema3A или его антигенсвязывающий фрагмент, который связывает аминокислотные области, представленные в SEQ ID NO: 21, для применения в лечении тромботического заболевания сетчатки глаза.

**[0019]** В одном варианте воплощения настоящее изобретение обеспечивает антитело против Sema3A или его антигенсвязывающий фрагмент для применения в лечении тромботического заболевания сетчатки глаза путем ингибирования вазорепрессивного действия SemaA, путем улучшения реваскуляризации сетчатки и/или путем снижения проницаемости гемато-ретинального барьера.

**[0020]** В предпочтительном варианте воплощения настоящее изобретение обеспечивает антитело против Sema3A или его антигенсвязывающий фрагмент для применения в лечении тромботического заболевания сетчатки глаза у пациента, страдающего от диабетической макулярной ишемии, предпочтительно способствуя регенерации сосудов в ишемизированной сетчатке (реваскуляризация) и предотвращая патологическую неоваскуляризацию стекловидного тела глаза.

**[0021]** В другом предпочтительном варианте воплощения настоящее изобретение обеспечивает антитело против Sema3A или его антигенсвязывающий фрагмент для применения в лечении тромботического заболевания сетчатки глаза у пациента, страдающего от диабетического макулярного отёка, предпочтительно путем снижения проницаемости гематоретинального барьера.

**[0022]** В другом предпочтительном варианте воплощения настоящее изобретение обеспечивает антитело против Sema3A или его

антигенсвязывающий фрагмент для применения в лечении тромботического заболевания сетчатки глаза, путем ингибирования Sema3A-индуцированной проницаемости гематоретинального барьера и/или Sema3A-индуцированной регрессии сосудов из ишемических областей.

5           **[0023]**     **В четвертом аспекте** настоящее изобретение обеспечивает фармацевтическую композицию, содержащую антитело против Sema3A или его антигенсвязывающий фрагмент и фармацевтически приемлемый носитель для применения в лечении тромботического заболевания сетчатки глаза.

#### **КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ РИСУНКОВ**

10           **[0024]**     **ФИГУРА 1: План исследования**

**[0025]**     На фигуре изображен протокол исследования применения антитела по данному изобретению путем интравитреальной инъекции при ишемии сетчатки с использованием модели окклюзии вены сетчатки у мышей. Протокол лечения включает введение в ранней фазе после лазерного облучения (Исследование 1) и введения в поздней фазе через 7 дней после лазерного облучения (Исследование 2). В основном, антитело против Sema3A и/или анти-VEGF ловушку вводят интравитреально либо сразу после лазерного облучения (Исследование 1), либо через 7 дней после лазерного облучения (Исследование 2) в глаза мышам.

20           **[0026]**     Указанное исследование включает следующие 4 этапа:

**[0027]**     Этап 1 относится к анализу отека и повреждения, включая гистологический анализ (окрашивание гематоксилином и эозином или H&E) и оптическую когерентную томографию (ОСТ).

**[0028]**     Этап 2 относится к исследованию кровотока с помощью лазерной спекл-флоуграфии.

**[0029]**     Этап 3 относится к исследованию неперфузированной области сетчатки в плоской сетчатке после инъекции флуоресцеина-декстрана.

**[0030]**     Этап 4 относится к экспрессии белка (с вестерн-блоттом).

30           **[0031]**     **Фигура 2: Глазной кровоток с помощью лазерной спекл-флоуграфии**

**[0032]**     На фигуре иллюстрируются изменения глазного кровотока с помощью лазерной спекл-флоуграфии через 1 или 8 дней после лазерного облучения с носителем, антителом против Sema3A по данному изобретению, VEGF-ловушкой Eylea® или комбинацией антитело против Sema3A по данному

изобретению и VEGF-ловушки Eylea®. На фигуре 2А показаны результаты введения в ранней фазе после лазерного облучения, на Фигуре 2В показаны результаты введения в поздней фазе после лазерного облучения. Данные представлены как среднее  $\pm$  SEM ( $n = 5$ ).  $## P < 0,01$  (по сравнению с группой, получавшей носитель).

## **ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ**

### **[0033] Определения**

**[0034]** Стандартная структура антитела или иммуноглобулина хорошо известна специалисту в данной области, эти молекулы представляют собой гетеротетрамерные гликопротеины, обычно около 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 гетеротримерная молекула образована посредством ковалентной дисульфидной связи между двумя идентичными тяжелыми цепями гетеродимеров. Хотя легкая и тяжелая цепи связаны друг с другом одной дисульфидной связью, количество дисульфидных связей между двумя тяжелыми цепями зависит от изотипа иммуноглобулина. Каждая тяжелая и легкая цепь также имеет регулярно расположенные внутрицепочечные дисульфидные мостики. Каждая тяжелая цепь имеет на amino-конце 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 связан 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 контактную область (интерфейс) между переменными доменами легкой и тяжелой цепей (Chothia и соавт., 1985, J. Mol. Biol. 186: 651-663.)

**[0035]** Некоторые домены в составе переменных доменов сильно различаются между разными антителами, т. е. являются «гиперпеременными». Эти гиперпеременные домены 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 комплементарность области (CDR) или гипервариабельные петли (HVL). CDR определяются сравнением последовательностей в Kabat и соавт., 1991, в: *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5-ое изд. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md., тогда как HVL структурно определяются в соответствии с трехмерной структурой вариабельного домена, как описано Chothia и Lesk, 1987, J. Mol. Biol. 196: 901-917. В тех случаях, когда эти два метода приводят к несколько разным идентификациям CDR, предпочтение отдается структурному определению. Как определено Kabat, CDR-L1 расположен примерно в остатках 24–34, CDR-L2 примерно в остатках 50-56 и CDR-L3 примерно в остатках 89-97 в вариабельном домене легкой цепи; CDR-H1 расположен примерно в остатках 31-35, CDR-H2 примерно в остатках 50-65 и CDR-H3 примерно в остатках 95-102 в вариабельном домене тяжелой цепи. Таким образом, CDR1, CDR2, CDR3 тяжелой и легкой цепей определяют уникальные и функциональные свойства, специфичные для данного антитела.

**[0036]** Три CDR в каждой из тяжелой и легкой цепей разделены каркасными областями (FR), которые содержат последовательности, которые имеют тенденцию быть менее вариабельными. От amino-конца до карбокси-конца вариабельных доменов тяжелой и легкой цепи FR и CDR располагаются в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 и FR4. Конфигурация FR, состоящая в основном из  $\beta$ -листов, приводит CDR в каждой из цепей в непосредственную близость друг к другу, а также к CDR из другой цепи. Полученная конформация вносит свой вклад в сайт связывания антигена (см. Kabat и соавт., 1991, NIH Publ. No. 91-3242, том I, стр. 647-669), хотя не все остатки CDR обязательно непосредственно участвуют в связывании антигена.

**[0037]** Остатки FR и константные домены Ig не участвуют непосредственно в связывании антигена, но способствуют связыванию антигена и/или опосредуют эффекторную функцию антитела. Считается, что некоторые остатки FR оказывают значительное влияние на связывание антигена по меньшей мере тремя путями: за счет нековалентного связывания непосредственно с эпитопом, за счет взаимодействия с одним или несколькими остатками CDR и за счет воздействия на контактную область между тяжелой и легкой цепями. Константные домены не участвуют непосредственно 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).

5 [0038] Легкие цепи иммуноглобулинов позвоночных относятся к одному из двух четко различающихся классов, каппа ( $\kappa$ ) и лямбда ( $\lambda$ ), на основе аминокислотной последовательности константного домена. Для сравнения, тяжелые цепи иммуноглобулинов млекопитающих относятся к одному из пяти основных классов в соответствии с последовательностью константных доменов: 10 IgA, IgD, IgE, IgG и IgM. IgG и IgA далее делятся на подклассы (изотипы), например, IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub>, IgG<sub>4</sub>, IgA<sub>1</sub> и IgA<sub>2</sub>, соответственно. Константные домены тяжелой цепи, соответствующие различным классам иммуноглобулинов, называются  $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\gamma$  и  $\mu$ , соответственно. Субъединичные структуры и трехмерные конфигурации классов нативных иммуноглобулинов хорошо известны.

15 [0039] Термины «антитело», «антитело против Sema3A», «гуманизированное антитело против Sema3A» и «вариант гуманизированного антитела против Sema3A» используются в данном документе в самом широком смысле и конкретно охватывают моноклональные антитела (включая 20 полноразмерные моноклональные антитела), мультиспецифические антитела (например, биспецифические антитела) и фрагменты антител, такие как переменные домены и другие части антитела, которые проявляют желаемую биологическую активность, например, связывание с Sema3A.

[0040] Термин «моноклональное антитело» (mAb) относится к антителу популяции по существу гомогенного антитела; то есть отдельные антитела в 25 этой популяции идентичны, за исключением встречающихся в природе мутаций, которые могут присутствовать в незначительных количествах. Моноклональные антитела являются высокоспецифичными, будучи направленными против одной антигенной детерминанты, «эпитопа». Таким образом, модификатор «моноклональный» указывает на, по существу, однородную популяцию антител, 30 направленных на идентичный эпитоп, и не должен толковаться как требующий продукции антитела каким-либо конкретным способом. Следует понимать, что моноклональные антитела могут быть получены любым способом или методологией, известными в данной области техники; включая, например, гибридомный метод (Kohler и соавт., 1975, Nature 256:495), или методы

рекомбинантной ДНК, известные в данной области техники (см., например, U.S. Pat. No. 4,816,567) или методы выделения моноклональных рекомбинантно полученных с использованием фаговых библиотек антител с использованием методов, описанных в Clackson и соавт., 1991, Nature 352: 624-628, и Marks и соавт., 1991, J. Mol. Biol. 222: 581-597.

**[0041]** Химерные антитела состоят из переменных областей тяжелой и легкой цепи антитела одного вида (например, отличного от человека млекопитающего, такого как мышь), и константных областей тяжелой и легкой цепи антитела другого вида (например, человека) и можно получить путем связывания последовательностей ДНК, кодирующих переменные области антитела из первого вида (например, мыши), с последовательностями ДНК константных областей антитела из второго вида (например, человека) и трансформации хозяина экспрессионным вектором, содержащим связанные последовательности, позволяющие ему 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 или зародышевой последовательности.

Химерные антитела могут включать фрагменты такого антитела при условии, что фрагмент антитела проявляет желаемую биологическую активность исходного антитела, например связывание с тем же эпитопом (см., например, U.S. Pat. No. 4,816,567; и Morrison и соавт., 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 6851-6855).

**[0042]** Термины «фрагмент антитела», «антигенсвязывающий фрагмент», «фрагмент антитела против Sema3A», «фрагмент гуманизованного антитела против Sema3A», «вариантный фрагмент гуманизованного антитела против Sema3A» относятся к части полноразмерного антитела против Sema3A, в котором сохранена переменная область или функциональная способность, например, специфическое связывание эпитопа Sema3A. Примеры фрагментов антител включают, но не ограничиваются ими, фрагменты Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fd, Fv, scFv и scFv-Fc, диатело, линейное антитело, одноцепочечное антитело, минитело, диатело, образованное из фрагментов антител, и мультиспецифические антитела, образованные из фрагментов антител.

**[0043]** Полноразмерные антитела можно обрабатывать ферментами, такими как папаин или пепсин, для получения полезных фрагментов антител. Расщепление папаином используется для получения двух идентичных антигенсвязывающих фрагментов антител, называемых "Fab" фрагментами, каждый из которых имеет один антигенсвязывающий сайт, и остаточный "Fc" фрагмент. Фрагмент Fab также содержит константный домен легкой цепи и домен  $C_{H1}$  тяжелой цепи. Обработка пепсином дает фрагмент  $F(ab')_2$ , который имеет два сайта связывания антигена и все еще способен сшивать антиген.

**[0044]** Fab' фрагменты отличаются от Fab-фрагментов наличием дополнительных остатков, включая один или несколько цистеинов, из шарнирной области антитела на С-конце домена  $C_{H1}$ . Фрагменты антитела  $F(ab')_2$  представляют собой пары фрагментов Fab', связанных остатками цистеина в шарнирной области. Также известны другие химические соединения фрагментов антител.

**[0045]** Фрагмент «Fv» содержит полный сайт распознавания и связывания антигена, состоящий из димера одного переменного домена тяжелой цепи и одного переменного домена легкой цепи в тесной нековалентной ассоциации. В этой конфигурации три CDR каждого переменного домена взаимодействуют, чтобы определить сайт связывания антигена на поверхности димера  $V_H-V_L$ . В совокупности шесть CDR придают антигенсвязывающую специфичность антителу.

**[0046]** «Одноцепочечный Fv» или «scFv» фрагмент антитела представляет собой вариант одноцепочечного Fv, содержащий домены  $V_H$  и  $V_L$  антитела, где домены присутствуют в одной полипептидной цепи.

Одноцепочечный Fv способен распознавать и связывать антиген. scFv полипептид 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, в *The Pharmacology of monoclonal Antibodies*, том 113, под ред. Rosenberg и Moore, Springer-Verlag, New York, стр. 269-315).

**[0047]** Другие распознаваемые фрагменты антител включают те, которые содержат пару tandemных Fd-сегментов ( $V_H-C_{H1}-V_H-C_{H1}$ ) для образования пары антигенсвязывающих областей. Эти «линейные антитела»

могут быть биспецифическими или моноспецифическими, как описано, например, в Zapata и соавт. 1995, Protein Eng. 8(10): 1057-1062.

5 [0048] Гуманизированное антитело или фрагмент гуманизированного антитела представляет собой специфический тип химерного антитела, который включает вариант аминокислотной последовательности иммуноглобулина или его фрагмент, который способен связываться с заданным антигеном и который содержит одну или несколько FR областей, имеющих по существу аминокислотную последовательность иммуноглобулина человека и одну или несколько CDR, имеющих по существу аминокислотную последовательность иммуноглобулина нечеловеческого происхождения. Эта нечеловеческая аминокислотная последовательность, часто называемая «импортной» последовательностью, обычно берется из «импортного» домена антитела, в частности, вариабельного домена. Как правило, гуманизированное антитело включает по меньшей мере CDR или HVL нечеловеческого антитела, встроенные между FR областями вариабельного домена тяжелой или легкой цепи человека.

15 [0049] Настоящее изобретение описывает специфические гуманизированные антитела против Sema3A, которые содержат CDR, полученные из мышиноного или химерного антитела, встроенные между FR областями вариабельных доменов тяжелой и легкой цепей последовательности зародышевой линии человека. Следует понимать, что некоторые мышинные FR остатки могут быть важны для функции гуманизированного антитела, и поэтому некоторые из остатков вариабельных доменов тяжелой и легкой цепей зародышевой линии человека модифицируют, чтобы они были такими же, как и в соответствующей мышинной последовательности.

20 [0050] Используемые здесь выражения «антитело по данному изобретению» и «антитело против Sema3A по данному изобретению» относятся к антителу против Sema3A или его антигенсвязывающему фрагменту, описанному в настоящем документе. Предпочтительно, указанные выражения относятся к любому антителу, содержащему 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 лёгкой 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).

**[0051]** В одном аспекте гуманизованное антитело против Sema3A содержит по существу все из по меньшей мере одного, а обычно двух  
5  
вариабельных доменов (например, содержащиеся в Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fabc и Fv-фрагментах), в которых все или практически все из CDR соответствуют CDR нечеловеческого иммуноглобулина, и, в частности, в данном случае CDR представляют собой мышинные последовательности, а FR представляют собой FR области консенсусной или зародышевой последовательности человеческого  
10  
иммуноглобулина. В другом аспекте гуманизованное антитело против Sema3A также включает по меньшей мере часть Fc-области иммуноглобулина, как правило, иммуноглобулина человека. Обычно антитело будет содержать как легкую цепь, так и по меньшей мере вариабельный домен тяжелой цепи. Антитело также может включать одну или несколько из C<sub>H1</sub>, шарнирной, C<sub>H2</sub>,  
15  
C<sub>H3</sub> и/или C<sub>H4</sub> областей тяжелой цепи, в зависимости от ситуации.

**[0052]** Гуманизованное антитело против Sema3A может быть выбрано из любого класса иммуноглобулинов, включая IgM, IgG, IgD, IgA и IgE, и любого изотипа, включая IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub>, IgG<sub>4</sub>, IgA<sub>1</sub> и IgA<sub>2</sub>. Например, константный домен может представлять собой константный домен,  
20  
связывающий комплемент, когда желательно, чтобы гуманизованное антитело проявляло цитотоксическую активность, и изотипом обычно является IgG<sub>1</sub>. Если такая цитотоксическая активность нежелательна, константный домен может быть другого изотипа, например, IgG<sub>2</sub>. Альтернативное гуманизованное антитело против Sema3A может содержать последовательности из более чем  
25  
одного класса или изотипа иммуноглобулинов, и выбор конкретных константных доменов для оптимизации желаемых эффекторных функций находится в пределах компетенции специалистов в данной области. В конкретных вариантах воплощения настоящее изобретение обеспечивает антитела, которые представляют собой антитела IgG<sub>1</sub> и, более конкретно,  
30  
антитела IgG<sub>1</sub>, характеризующиеся сниженной эффекторной функцией.

**[0053]** Предпочтительно, антитело против Sema3A по настоящему изобретению представляет собой гуманизованное антитело в формате IgG1KO.

**[0054]** Нет необходимости, чтобы FR и CDR, или HVL, гуманизированного антитела против Sema3A точно соответствовали родительским последовательностям. Например, один или несколько остатков в импортной CDR, или HVL, или консенсусной последовательности или зародышевой FR последовательности могут быть изменены (например, подвергнуты мутагенезу) путем замены, вставки или делеции таким образом, что полученный аминокислотный остаток больше не был идентичен исходному остатку в соответствующем положении в любой исходной последовательности, но антитело, тем не менее, сохраняло функцию связывания с Sema3A. Такие изменения обычно не будут обширными и будут консервативными изменениями. Обычно по меньшей мере 75% остатков гуманизированного антитела будут соответствовать остаткам родительских последовательностей консенсусной или зародышевой области FR и импортированной CDR, чаще по меньшей мере 90% и наиболее часто более 95% или более 98%, или более 99%.

**[0055]** Остатки иммуноглобулина, которые влияют на поверхность раздела между переменными областями тяжелой и легкой цепей («интерфейс  $V_L$ - $V_H$ »), представляют собой остатки, которые влияют на близость или ориентацию двух цепей по отношению друг к другу. Некоторые остатки, которые могут участвовать в межцепочечных взаимодействиях, включают  $V_L$  остатки 34, 36, 38, 44, 46, 87, 89, 91, 96 и 98 и  $V_H$  остатки 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 № 6407213 также обсуждается, что в это взаимодействие могут быть вовлечены такие остатки, как  $V_L$  остатки 43 и 85 и  $V_H$  остатки 43 и 60. Хотя эти остатки указаны только для человеческого IgG, они применимы к разным видам. Важные остатки антител, которые, вполне возможно, будут участвовать в межцепочечных взаимодействиях, выбирают для замены в консенсусной последовательности.

**[0056]** Термины «консенсусная последовательность» и «консенсусное антитело» относятся к аминокислотной последовательности, которая содержит наиболее часто встречающийся аминокислотный остаток в каждом месте во всех иммуноглобулинах любого конкретного класса, изотипа или субъединичной структуры, например, переменного домена человеческого иммуноглобулина. Консенсусная последовательность может быть основана на иммуноглобулинах

определенного вида или многих видов. Под "консенсусной" последовательностью, структурой или антителом понимается консенсусная последовательность человека, как описано в некоторых вариантах воплощения, и она относится к аминокислотной последовательности, которая содержит наиболее часто встречающиеся аминокислотные остатки в каждом месте во всех человеческих иммуноглобулинах любого определенного класса, изоформа или субъединичной структуры. Таким образом, консенсусная последовательность содержит аминокислотную последовательность, имеющую в каждом положении аминокислоту, которая присутствует в одном или нескольких известных иммуноглобулинах, но которая может не полностью дублировать всю аминокислотную последовательность любого отдельного иммуноглобулина. Консенсусная последовательность варибельной области не получена ни из какого природного антитела или иммуноглобулина. Kabat и соавт., 1991, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5-ое изд. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md., и их варианты. FR консенсусных последовательностей тяжелой и легкой цепей и их варианты обеспечивают полезные последовательности для получения гуманизированного антитела против Sema3A. См., например, патенты США №№ 6.037.454 и 6.054.297.

**[0057]** Последовательности зародышевой линии человека естественным образом обнаруживаются в человеческой популяции. Комбинация этих генов зародышевой линии создает разнообразие антител. Последовательности антител зародышевой линии для легкой цепи антитела происходят из консервативных  $v$ -генов и  $j$ -генов каппа или лямбда зародышевой линии человека. Точно так же последовательности тяжелых цепей происходят из  $v$ -,  $d$ - и  $j$ -генов зародышевой линии (LeFranc, M-P, and LeFranc, G, «The Immunoglobulin Facts Book», Academic Press, 2001).

**[0058]** «Изолированное» антитело представляет собой антитело, которое было идентифицировано, отделено и/или выделено из компонента его естественной среды. Загрязняющие компоненты естественной среды антитела представляют собой материалы, которые могут мешать диагностическому или терапевтическому применению антитела, и могут представлять собой ферменты, гормоны или другие белковые или небелковые растворенные вещества. В одном аспекте антитело будет очищено по меньшей мере до больше, чем 95% выделения по массе антитела.

**[0059]** Термин «эффективность антитела» относится к факторам/свойствам, которые способствуют распознаванию антигена антителом или эффективности антитела *in vivo*. В предпочтительном варианте воплощения эффективность антитела относится к способности антитела предотвращать  
5 коллапс цитоскелета в клетках сетчатки. Изменения в аминокислотной последовательности антитела могут влиять на свойства антитела, такие как складывание, 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  
10 антитела, стабильность белка и время полужизни антитела.

**[0060]** Используемые в настоящем документе термины «идентичный» или «процент идентичности» в контексте двух или более нуклеиновых кислот или последовательностей полипептидов относятся к двум или более последовательностям или подпоследовательностям, которые являются  
15 одинаковыми или имеют определенный процент нуклеотидов или аминокислотных остатков, которые являются одинаковыми при сравнении и выравнивании для максимального соответствия. Для определения процентной идентичности последовательности выравнивают для целей оптимального сравнения (например, в последовательность первой аминокислотной или  
20 нуклеиновокислотной последовательности могут быть введены гэпы для оптимального выравнивания со второй аминокислотной или нуклеиновокислотной последовательностью). Затем сравнивают аминокислотные остатки или нуклеотиды в соответствующих положениях аминокислот или положениях нуклеотидов. Когда положение в первой  
25 последовательности занято тем 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 позиций, общих для последовательностей (т.е. % идентичности = количество идентичных  
30 позиций/общее количество позиций (например, перекрывающихся позиций)  $\times$  100). В некоторых вариантах воплощения две сравниваемые последовательности имеют одинаковую длину после того, как гэпы введены в последовательности, если это необходимо (например, за исключением дополнительной последовательности, выходящей за пределы сравниваемых

последовательностей). Например, при сравнении последовательностей  
вариабельной области не учитываются последовательности лидерного и/или  
константного домена. Для сравнения последовательностей между двумя  
последовательностями «соответствующая» CDR относится к CDR в одном и том  
5 же месте в обеих последовательностях (например, CDR-H1 каждой  
последовательности).

**[0061]** Определение процента идентичности или процента сходства  
между двумя последовательностями может быть выполнено с использованием  
математического алгоритма. Предпочтительным неограничивающим примером  
10 математического алгоритма, используемого для сравнения двух  
последовательностей, является алгоритм Karlin и Altschul, 1990, Proc. Natl. Acad.  
Sci. USA 87: 2264-2268, модифицированный, как описано в Karlin и Altschul,  
1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 5873-5877. Такой алгоритм включен в  
программы NBLAST и XBLAST Altschul и соавт., 1990, J. Mol. Biol. 215: 403-  
15 410. Поиск нуклеотидов BLAST можно проводить с помощью программы  
NBLAST, оценка = 100, длина слова = 12, для получения нуклеотидных  
последовательностей, гомологичных нуклеиновой кислоте, кодирующей  
интересующий белок. Поиск белков BLAST может быть выполнен с помощью  
программы XBLAST, оценка = 50, длина слова = 3, для получения  
20 аминокислотных последовательностей, гомологичных интересующему белку.  
Для получения выравниваний с гэпами в целях сравнения можно использовать  
Gapped BLAST, как описано в Altschul и соавт., 1997, Nucleic Acids Res.  
25: 3389-3402. В качестве альтернативы PSI-Blast можно использовать для  
повторного поиска, который обнаруживает отдаленные отношения между  
25 молекулами (там же). 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 Myers и Miller, CABIOS  
30 (1989). Такой алгоритм включен в программу ALIGN (версия 2.0), которая  
является частью программного пакета выравнивания последовательностей GCG.  
При использовании программы ALIGN для сравнения аминокислотных  
последовательностей можно использовать таблицу весовых остатков PAM120,  
штраф за длину гэпа 12 и штраф за гэп 4. Дополнительные алгоритмы анализа

последовательности известны в данной области и включают в себя ADVANCE и ADAM, как описано у Torellis и Robotti, 1994, Comput. Appl. Biosci. 10: 3-5; и FASTA, описанные в Pearson и Lipman, 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 2444-8. В FASTA *ktup* является опцией управления, которая устанавливает чувствительность и скорость поиска. Если *ktup*=2, сходные области в двух сравниваемых последовательностях обнаруживаются путем просмотра пар выровненных остатков; если *ktup*=1, исследуются одиночные выровненные аминокислоты. *ktup* может быть установлен на 2 или 1 для белковых последовательностей или от 1 до 6 для последовательностей ДНК. Значение по умолчанию, если *ktup* не указан, равно 2 для белков и 6 для ДНК. Альтернативно, выравнивание белковых последовательностей можно проводить с использованием алгоритма CLUSTAL W, как описано у Higgins и соавт., 1996, Methods Enzymol. 266: 383-402.

**[0062]** Используемые в данном описании выражения «клетка», «клеточная линия» и «клеточная культура» используются взаимозаменяемо, и все такие обозначения включают их потомство. Таким образом, «трансформанты» и «трансформированные клетки» включают первичную исследуемую клетку и культуры, полученные из неё, независимо от количества переносов.

**[0063]** Термин «млекопитающее» для целей лечения относится к любому животному, классифицируемому как млекопитающее, включая людей, домашних и сельскохозяйственных животных, а также животных из зоопарка, спортивных или домашних животных, таких как собаки, лошади, кошки, коровы и другие животные. Предпочтительно, млекопитающим является человек.

**[0064]** Используемый в данном описании термин «тромботическое заболевание» относится к образованию кровяного сгустка внутри кровеносного сосуда, препятствующего току крови по системе кровообращения. Предпочтительно, выражение «тромботическое заболевание сетчатки» относится к тромботическому заболеванию сетчатки, выбранному из группы, состоящей из окклюзии вен сетчатки, включая окклюзию центральной вены сетчатки (CRVO), окклюзию вен полушарий сетчатки (HRVO), окклюзию ветвей вен сетчатки (BRVO), и окклюзионного заболевания артерий сетчатки. В предпочтительном варианте воплощения выражение «тромботическое заболевание сетчатки» относится к окклюзии вен сетчатки (RVO).

**[0065]** Оклюзия вен сетчатки является наиболее распространенным заболеванием сосудов сетчатки после диабетической ретинопатии. В зависимости от области ретинального венозного оттока, эффективно окклюзированного, она широко классифицируется как окклюзия центральной вены сетчатки (CRVO), окклюзия вен полушарий сетчатки (HRVO) или окклюзия ветвей вен сетчатки (BRVO). Было замечено, что каждый из них имеет два подтипа. Клиническая картина RVO в целом проявляется переменной безболезненной потерей зрения с любой комбинацией признаков глазного дна, состоящих из извитости сосудов сетчатки, кровоизлияний в сетчатку (в форме пятен и язычков пламени), ватоподобных пятен, отека диска зрительного нерва и макулярного отека. При CRVO кровоизлияния в сетчатку обнаруживаются во всех четырех квадрантах глазного дна, в то время как при HRVO они ограничены либо верхним, либо нижним полушарием глазного дна. При BRVO кровоизлияния в основном локализуются в области, дренируемой окклюзированной ветвью вены сетчатки. Потеря зрения происходит вторично из-за макулярного отека или ишемии.

**[0066]** «Заболевание» или «расстройство», как используется в данном описании, представляет собой любое состояние, при котором может помочь лечение гуманизированным антителом против Sema3A, раскрытым в данном описании. Это включает хронические и острые расстройства или заболевания, включая те патологические состояния, которые предрасполагают млекопитающего к рассматриваемому расстройству.

**[0067]** Термин «интравитреальная инъекция» имеет свое обычное значение в данной области техники и относится к введению антитела против Sema3A или его антигенсвязывающего фрагмента в стекловидное тело пациента.

**[0068]** Термин «подкожное введение» относится к введению антитела против Sema3A или его антигенсвязывающего фрагмента под кожу животного или человека, предпочтительно в карман между кожей и подлежащей тканью, путем относительно медленной, продолжительной доставки из резервуара с лекарственным средством. Защип или оттягивание кожи вверх и в сторону от подлежащих тканей может привести к образованию кармана.

**[0069]** 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, продолжительной доставки из резервуара лекарственного средства в течение периода время, включая, не ограничиваясь указанными, 30 минут или меньше или 90 минут или меньше. Необязательно инфузия может быть осуществлена путем подкожной имплантации насоса для доставки лекарственного средства, имплантированного под кожу животного или человека, при этом насос доставляет заданное количество лекарственного средства в течение заданного периода времени, такого как 30 минут, 90 минут, или периода времени, охватывающего продолжительность схемы лечения.

**[0070]** Термин «подкожный болюс» относится к введению лекарственного средства под кожу пациента - животного или человека, где болюсное введение лекарственного средства составляет менее приблизительно 15 минут, в другом аспекте менее 5 минут и в еще одном аспекте менее чем 60 секунд. В еще одном аспекте введение осуществляется в карман между кожей и подлежащей тканью, где карман может быть создан зажимом или оттягиванием кожи вверх и в сторону от подлежащей ткани.

**[0071]** Термин «терапевтически эффективное количество» используется для обозначения количества антитела против Sema3A или его антигенсвязывающего фрагмента, которое облегчает или ослабляет один или более симптомов заболеваний, подлежащих лечению. При этом именно это количество имеет положительный результат для пациента. Эффективность можно измерить обычными способами, в зависимости от состояния, подлежащего лечению. Например, при заболеваниях или нарушениях глаз/сетчатки, характеризующихся клетками, экспрессирующими Sema3A, эффективность можно измерить путем определения показателей ответа, например восстановления зрения или путем оценки времени задержки до прогрессирования заболевания.

**[0072]** Термины «лечение» и «терапия» и т. п., используемые в настоящем описании, как предполагают, включают терапевтические, а также профилактические или подавляющие меры в отношении заболевания или расстройства, приводящих к любому клинически желательному или благоприятному эффекту, включая, но не ограничиваясь указанными, смягчение или облегчение одного или нескольких симптомов, регресс, замедление или прекращение прогрессирования этого заболевания или расстройства. Таким образом, например, термин лечение включает введение антитела против Sema3A

или его антигенсвязывающего фрагмента до или после появления симптома заболевания или расстройства, тем самым предотвращая или устраняя один или несколько признаков заболевания или расстройства. В качестве другого примера термин включает введение антитела против Sema3A или антигенсвязывающего фрагмента после клинического проявления заболевания для борьбы с симптомами заболевания. Кроме того, введение антитела против Sema3A или его антигенсвязывающего фрагмента после начала и после развития клинических симптомов, если введение влияет на клинические параметры заболевания или расстройства, независимо от того, приводит ли лечение к облегчению заболевания, включает «лечение» или «терапию», как используется в данном описании. Более того, при условии, что композиции по данному изобретению либо сами по себе, либо в комбинации с другим терапевтическим агентом облегчают или улучшают по меньшей мере один симптом заболевания, подлежащего лечению, по сравнению с этим симптомом при отсутствии применения композиции антитела против Sema3A или его антигенсвязывающего фрагмента, результат следует рассматривать как эффективное лечение основного заболевания независимо от того, облегчаются ли все симптомы заболевания или нет.

**[0073]** Термин «вкладыш в упаковку» используется для обозначения инструкций, обычно включаемых в коммерческие упаковки терапевтических продуктов, которые содержат информацию о показаниях, применении, введении, противопоказаниях и/или предупреждениях, касающихся использования таких терапевтических продуктов.

**[0074] Антитело настоящего изобретения для применения в лечении тромботического заболевания сетчатки глаза**

**[0075]** В первом аспекте настоящее изобретение относится к антителу против Sema3A или его антигенсвязывающему фрагменту для применения в лечении тромботического заболевания сетчатки глаза.

**[0076]** В предпочтительном варианте воплощения указанное тромботическое заболевание сетчатки выбирают из группы, состоящей из окклюзии вен сетчатки (RVO), включая окклюзию центральной вены сетчатки (CRVO), окклюзию вен полушарий сетчатки (HRVO), окклюзию ветвей вен сетчатки (BRVO), и окклюзионного заболевания артерий сетчатки.

**[0077]** В другом предпочтительном варианте воплощения указанное антитело представляет собой гуманизированное антитело против Sema3A, более предпочтительно гуманизированное моноклональное антитело против Sema3A.

**[0078]** При первоначальной характеристике была создана библиотека антител, нацеленных на варианты Sema3A, путем помещения областей CDR мышинового антитела в FR консенсусных вариабельных доменов тяжелой и легкой цепи человека и, кроме того, путем конструирования FR с различными изменениями. В результате было получено гуманизированное антитело, направленное против Sema3A, с улучшенными свойствами, как описано в данном описании. Последовательности антитела по данному изобретению показаны в таблице 1 ниже.

**[0079] Таблица 1:**

Название	Аминокислотная последовательность	SEQ ID NO
HCDR1	SYYSMS	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	QQGYSFPYT	SEQ ID NO: 6
V <sub>H</sub> – вариант 1	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS SYYSMSWVRQA PGKGLEWVST IIKSGGYAAY PDSVKDRFTI SRDNSKNTLY LQMSSLRAED TAVYYCVRGG QGAMDYWGQG TTVTSS	SEQ ID NO: 7
V <sub>H</sub> – вариант 2	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFPPS SYYSMSWVRQA PGKGLEWVST IIKSGGYAAY PDSVKDRFTI SRDNSKNTLY LQMSSLRAED TAVYYCVRGG QGAMDYWGQG TTVTSS	SEQ ID NO: 8
V <sub>H</sub> – вариант 3	EVQLVESGGG LVQLGGSLRL SCAASGFTFS SYYSMSWVRQA PGKGLEWVST IIKSGGYAAY PDSVKDRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCVKGG QGAMDYWGQG TTVTSS	SEQ ID NO: 9
V <sub>H</sub> - вариант 4	EVQLVESGGG LLQLGGSLRL SCAASGFTFS SYYSMSWVRQA PGKGLEWVST IIKSGGYAAY PDSVKDRFTI SRDNSKNTLN LQMNSLRAED TAVYYCVKGG QGAMDYWGQG TTVTSS	SEQ ID NO: 10
V <sub>L</sub> – вариант а	EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSIG DYLHWYQQKP GQAPRLLIK Y ASQSIGIPA RFSGSGSGTD FTLTISLEP EDFAVYYCQQ GYSFPYTFGG GTKLEIK	SEQ ID NO: 11
V <sub>L</sub> – вариант б	EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSIG DYLHWYQQKP GQAPRLLIYY ASQSIGIPA RFSGSGSGTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQQ GYSFPYTFGG GTKLEIK	SEQ ID NO: 12
V <sub>L</sub> - вариант с	EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSIG DYLHWYQQKP GQAPRLLIK Y ASQSIGIPA RFSGSGSGTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQQ GYSFPYTFGG GTKLEIK	SEQ ID NO: 13

Название	Аминокислотная последовательность	SEQ ID NO
Клон с тяжелой цепью I	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS SYMSWVRQA PGKGLEWVST IKSGGYAYY 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 YKTTTPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSPG	SEQ ID NO: 14
Клон с легкой цепью I	EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSIG DYLHWYQQKP GQAPRLLIK Y ASQSISGIPA RFSGSGSGTD FTLTITSLEP EDFAVYYCQQ GYSFPYTFGG GTKLEIKRTV AAPSVFIFPP SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYLSSTLT LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN RGEN	SEQ ID NO: 15
Клон с тяжелой цепью II	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFPPS SYMSWVRQA PGKGLEWVST IKSGGYAYY 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 YKTTTPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSPG	SEQ ID NO: 16
Клон с тяжелой цепью III	EVQLVESGGG LVQLGGSLRL SCAASGFTFS SYMSWVRQA PGKGLEWVST IKSGGYAYY 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 YKTTTPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSPG	SEQ ID NO: 17
Клон с легкой цепью III	EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSIG DYLHWYQQKP GQAPRLLIY Y ASQSISGIPA RFSGSGSGTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQQ GYSFPYTFGG GTKLEIKRTV AAPSVFIFPP SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYLSSTLT LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN RGEN	SEQ ID NO: 18

Название	Аминокислотная последовательность	SEQ ID NO
Клон с тяжелой цепью IV	EVQLVESGGG LLQLGGSLRL SCAASGFTFS SYYMSWVRQA PGKGLEWVST IKSGGYAYY 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 YKTTTPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVME ALHNHYTQKS LSLSPG	SEQ ID NO: 19
Клон с легкой цепью IV	EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSIG DYLHWYQQKP GQAPRLLIK Y ASQSISGIPA RFSGSGSGTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQQ GYSFPYTFGG GTKLEIKRTV AAPSVFIFPP SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYLSSTLT LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN RGEC	SEQ ID NO: 20

**[0080]** В одном варианте воплощения настоящее изобретение

обеспечивает антитело против Sema3A или его антигенсвязывающий фрагмент для применения в лечении тромботического заболевания сетчатки глаза, где указанное антитело против Sema3A или его антигенсвязывающий фрагмент

5 содержит:

– переменную 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

10 – переменную 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).

**[0081]** В другом варианте воплощения настоящее изобретение

15 обеспечивает антитело против Sema3A или его антигенсвязывающий фрагмент для применения в лечении тромботического заболевания сетчатки глаза, где указанное антитело против Sema3A или его антигенсвязывающий фрагмент содержит:

– переменную 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%

20

идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 или SEQ ID NO: 10; и

- переменную 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.

**[0082]** В другом варианте воплощения настоящее изобретение обеспечивает антитело против Sema3A или его антигенсвязывающий фрагмент для применения в лечении тромботического заболевания сетчатки глаза, где указанное антитело против Sema3A или его антигенсвязывающий фрагмент содержит:

- переменную 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

- переменную 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:

- переменная 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

- переменная 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).

**[0083]** В еще одном другом варианте воплощения, настоящее изобретение обеспечивает антитело против Sema3A или его

антигенсвязывающий фрагмент для применения в лечении тромботического заболевания сетчатки глаза, где указанное антитело против Sema3A или его антигенсвязывающий фрагмент содержит:

- переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 или SEQ ID NO: 10; и
- переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12 или SEQ ID NO: 13.

**[0084]** В предпочтительном варианте воплощения настоящее изобретение обеспечивает антитело против Sema3A или его антигенсвязывающий фрагмент для применения в лечении тромботического заболевания сетчатки глаза, где указанное антитело против Sema3A или его антигенсвязывающий фрагмент содержит:

- переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 7 и SEQ ID NO: 11, соответственно;
- переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 8 и SEQ ID NO: 11, соответственно;
- переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 9 и SEQ ID NO: 12, соответственно; или
- переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 10 и SEQ ID NO: 13, соответственно.

**[0085]** В еще одном другом варианте воплощения настоящее изобретение обеспечивает антитело против Sema3A или его антигенсвязывающий фрагмент для применения в лечении тромботического заболевания сетчатки глаза, где указанное антитело против Sema3A 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.

**[0086]** В конкретном варианте воплощения настоящее изобретение относится к антителу против Sema3A или его антигенсвязывающему фрагменту для применения в лечении тромботического заболевания сетчатки глаза, где указанное антитело против Sema3A или его антигенсвязывающий фрагмент содержит:

а. тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14, и лёгкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15, при этом указанное антитело называют “клон I”;

б. тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16, и лёгкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15, при этом указанное антитело называют “клон II”;

в. тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17, и лёгкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18, при этом указанное антитело называют “клон III”; или

г. тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19, и лёгкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20, при этом указанное антитело называют “клон IV”.

**[0087]** Мутанты IgG1-КО были получены путем введения мутаций в область Fc. Мутации, направленные на снижение или ингибирование эффекторной функции, хорошо известны специалистам в данной области техники и подробно описаны в предшествующем уровне техники, например, в Wang и соавт., *Protein Cell* 2018, 9(1): 63–73 и Stewart и соавт. *Journal for ImmunoTherapy of Cancer* 2014, 2:29. Как правило, не ограничивающий список мутаций, введенных в Fc-область IgG1 для снижения эффекторной функции Fc, включает:

- L234A и L235A;
- L234A, L235A и N297Q;
- L234A, L235A и P329G; или
- L234A, L235A и D265A;

где остатки пронумерованы согласно индексу EU по Kabat.

**[0088]** В предпочтительном варианте воплощения антитело данного изобретения включает две мутации L234A и L235A в Fc области для снижения эффекторной функции.

**[0089]** CDR, раскрытые в настоящем описании и показанные в SEQ ID NO: 1 - 6, представлены в соответствии с нумерацией по Kabat и суммированы в таблице 2 ниже с положением по Kabat.

**[0090]** **Таблица 2:**

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

**[0091]** Антитело против Sema3A по данному изобретению связывается с высокой аффинностью с Sema3A человека. В одном варианте воплощения, касающемся этого аспекта, антитело против Sema3A по данному изобретению связывается с Sema3A человека при  $K_D < 50$  пМ. В другом варианте воплощения, указанное антитело против Sema3A по данному изобретению связывается с Sema3A человека при  $K_D < 35$  пМ, как показано в Примере 2. В предпочтительном варианте воплощения, указанное антитело против Sema3A по данному изобретению связывается с Sema3A человека при  $K_D < 30$  пМ.

**[0092]** Антитело против Sema3A по данному изобретению также связывается с Sema3A яванского макака, Sema3A мыши, Sema3A крысы и Sema3A кролика.

**[0093]** Антитело против Sema3A по данному изобретению предотвращает индуцированный Sema3A коллапс цитоскелета в клетках сетчатки с функциональной активностью менее 100 пМ, предпочтительно менее 80 пМ, более предпочтительно менее 70 пМ. В предпочтительном варианте воплощения антитело против Sema3A по данному изобретению предотвращает индуцированный Sema3A коллапс цитоскелета в клетках сетчатки с функциональной эффективностью 69 пМ, как показано в **Примере 2**.

**[0094]** В еще одном аспекте доказано, что антитело против Sema3A по данному изобретению имеет низкий риск иммуногенности, как описано в **Примере 3**. Это основано на прогнозировании *in silico* иммуногенности

антитела. Риск иммуногенности обычно оценивают с помощью различных хорошо известных способов, таких как компьютерный алгоритм для прогнозирования эпитопов Т-клеток, основного фактора, влияющего на иммуногенность.

5           **[0095]**     Действительно, сообщалось, что последовательности, содержащие эпитопы Т-клеток, присутствующие в представляющих интерес белках, могут быть рассчитаны с помощью алгоритма, основанного на вычислительном матричном подходе, доступном под названием EpiMatrix (производится EpiVax). Специалист в данной области может обратиться к Van  
10 Walle и соавт., Expert Opin Biol Ther. Март 2007; 7(3): 405-18 и Jawa и соавт., Clin Immunol. Декабрь 2013; 149(3): 534-55.

**[0096]**     Авторы изобретения показали, что антитело данного изобретения проявляет более выгодные свойства, чем другие антитела или фрагменты, нацеленные на Sema3A, упомянутые в предшествующем уровне техники и  
15 описанные в настоящем документе.

**[0097]**     Авторы изобретения сравнили аффинность связывания антитела, нацеленного на Sema3A, раскрытого в WO 2014123186 (Chiome Bioscience), с аффинностью антитела по данному изобретению. Антитела WO 2014123186 раскрыты для применения при лечении болезни Альцгеймера. Настоящий  
20 **Пример 4** показывает, что антитело данного изобретения, как доказано, обладает более высокой аффинностью связывания с Sema3A человека, чем антитело предшествующего уровня техники, раскрытое Chiome Bioscience.

**[0098]**     Авторы изобретения также сравнили свойства антитела в соответствии с настоящим изобретением с фрагментами ScFv, как описано в WO  
25 2017074013 (Samsung). Эти фрагменты раскрыты для применения при лечении различных видов рака. Настоящий **Пример 5** показывает, что антитело данного изобретения, как доказано, обладает более высокой аффинностью связывания с Sema3A человека, чем фрагменты антител предшествующего уровня техники, раскрытые в WO 2017074013.

30           **[0099]**     Более высокая аффинность связывания продлевает время нейтрализации Sema3A после интравитреальной инъекции антитела и позволяет снизить частоту инъекций. Кроме того, более высокая аффинность связывания позволяет вводить более низкие дозы, ограничивая потенциальные побочные эффекты. Таким образом, антитело данного изобретения обеспечивает

технические преимущества по сравнению с антителом предшествующего уровня техники. Улучшенная аффинность связывания и уменьшенная частота инъекций значительно улучшают эффективность лечения пациентов, которым это необходимо. Это также дает ценные преимущества для пациента, особенно

5 улучшенную приверженность к лечению и соблюдение режима приема лекарств.

**[00100] Гуманизация и варианты аминокислотной последовательности**

**[00101]** Дополнительное вариантное антитело против Sema3A и фрагменты антитела могут быть сконструированы на основе набора CDR, идентифицированных в последовательностях, представленных в SEQ ID NO: 1 -

10 6. Следует понимать, что в указанном вариантном антителе против Sema3A и фрагментах антитела аминокислотная последовательность CDR остается неизменной, но окружающие области, например, регионы FR могут быть сконструированы. Варианты аминокислотной последовательности антитела

15 против Sema3A могут быть получены путем внесения соответствующих нуклеотидных изменений в ДНК антитела против Sema3A или путем пептидного синтеза. Такие варианты включают, например, делеции и/или вставки и/или замены остатков в аминокислотных последовательностях антитела против Sema3A из примеров в настоящем документе. Любая комбинация делеций,

20 вставок и замен делается для получения конечной конструкции при условии, что конечная конструкция обладает желаемыми характеристиками. Аминокислотные замены также могут изменять посттрансляционные процессы гуманизированного или вариантного антитела против Sema3A, такие как изменение числа или положения сайтов гликозилирования.

**[00102]** 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.

**[00103]** В одном аспекте настоящее изобретение включает молекулы нуклеиновых кислот, которые кодируют варианты аминокислотной последовательности антитела против Sema3A, раскрытые в данном описании. Молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие варианты аминокислотной последовательности антитела против Sema3A, получают различными способами,

известными в данной области. Эти способы включают, помимо прочего, выделение из природного источника (в случае встречающихся в природе вариантов аминокислотной последовательности) или получение с помощью олигонуклеотид-опосредованного (или сайт-направленного) мутагенеза, ПЦР-мутагенеза и кассетного мутагенеза более ранней подготовленной вариантной или невариантной версии антитела против Sema3A.

**[00104]** В некоторых вариантах воплощения антитело против Sema3A представляет собой фрагмент антитела. Существуют способы, разработанные для получения фрагментов антител. Фрагменты могут быть получены посредством протеолитического расщепления интактного антитела (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 могут быть получены непосредственно в рекомбинантных клетках-хозяевах. Например, фрагменты Fab'-SH могут быть непосредственно выделены из *E.coli* и химически связаны с образованием фрагментов F(ab')<sub>2</sub> (см., например, Carter и соавт., 1992, *Bio/Technology* 10: 163-167). С помощью другого подхода фрагменты F(ab')<sub>2</sub> могут быть выделены непосредственно из рекомбинантной культуры клеток-хозяев. Специалисту в данной области техники будут очевидны и другие способы получения фрагментов антител.

**[00105]** Антитела против Sema3A и их антигенсвязывающие фрагменты могут включать модификации.

**[00106]** В некоторых вариантах воплощения может быть желательно использовать фрагмент антитела против Sema3A, а не интактное антитело. Может оказаться желательным модифицировать фрагмент антитела, чтобы увеличить время его полужизни в сыворотке. Этого можно достичь, например, путем включения эпитопа связывания рецептора реутилизации 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 слита с фрагментом антитела либо на конце, либо в середине, например, с помощью ДНК или пептидного синтеза. См., например, WO 96/32478.

**[00107]** В других вариантах воплощения настоящее изобретение включает ковалентные модификации антитела против Sema3A. Ковалентные модификации включают модификацию цистеинильных остатков, гистидильных

остатков, лизинильных и аминоконцевых остатков, аргинильных остатков, тирозильных остатков, карбоксильных боковых групп (аспартильных или глутамиловых), глутаминильных и аспарагинильных остатков или серильных или треонильных остатков. Другой тип ковалентной модификации включает химическое или ферментативное связывание гликозидов с антителом. Такие модификации могут быть выполнены 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 аминоконцевыми остатками.

**[00108]** Удаление любых углеводных фрагментов, присутствующих на антителе, может быть осуществлено химическим или ферментативным путем. Химическое дегликозилирование описано Nakimuddin и соавт., 1987, Arch. Biochem. Biophys. 259: 52 и Edge и соавт., 1981, Anal. Biochem., 118: 131. Ферментативное расщепление углеводных фрагментов на антителе может быть достигнуто с помощью различных эндо- и экзогликозидаз, как описано Thotakura и соавт., 1987, Meth. Enzymol 138: 350.

**[00109]** Другой тип применимой ковалентной модификации включает связывание антитела с одним из множества небелковых полимеров, например, полиэтиленгликолем, полипропиленгликолем или полиоксиалкиленами, способом, изложенным в одном или нескольких из патента США № 4,640,835, патента США № 4,496,689, патента США № 4,301,144, патента США № 4,670,417, патента США № 4,791,192 и патента США № 4,179,337.

**[00110]** **Связывание эпитопа**

**[00111]** **Во втором аспекте** изобретение относится к антителу, распознающему специфический «Sema3A антигенный эпитоп» и «Sema3A эпитоп» для применения в лечении тромботического заболевания сетчатки глаза. В частности, указанное антитело или его фрагмент связываются с Sema3A эпитопом человека с SEQ ID NO: 22.

**[00112]** В одном аспекте данное изобретение относится к антителу против Sema3A или его антигенсвязывающему фрагменту для применения в лечении тромботического заболевания сетчатки глаза, где указанное антитело против Sema3A или его антигенсвязывающий фрагмент связывается по меньшей

мере с одним аминокислотным остатком в пределах аминокислотных областей 370-382 Sema3A человека, как изложено в SEQ ID NO: 22.

5 [00113] В другом аспекте данное изобретение относится к антителу против Sema3A или его антигенсвязывающему фрагменту для применения в лечении тромботического заболевания сетчатки глаза, где указанное антитело против Sema3A или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с SEQ ID NO: 21.

[00114] Последовательности SEQ ID NO: 21 и 22 показаны в таблице 3 ниже.

10 [00115] **Таблица 3:**

Название	Последовательность	SEQ ID NO:
Sema3A эпитоп	DSTKDLPDDV ITF	21
Sema3A человека	NYQNGKNNVPRKLKLSYKEMLESNNVITFNGLANSSSYHTFLLD EERSRLYVGAKDHIFSFDLVNIKDFQKIVWPVSYTRRDECKWA GKDILKECANFIKVLKAYNQTHLYACGTGAFHPICTYIEIGHHP EDNIFKLENSHFENGRGKSPYDPKLLTASLLIDGELYSGTAADF MGRDFAIFRTLGHNNPIRTEQHDSRWLNDPKFISAHLISESDNPE DDKVYFFFRENAIDGEHSGKATHARIGQICKNDFGGHRSLVNK WTTFLKARLICSVPGPNGIDTHFDELQDVFLMNFKDPKNPVVY GVFTTSSNIFKGSAVCMYSMSDVRRVFLGPYAHRDGPNYQWV PYQGRVPYPRPGTCSKTFGGFDSTKDLPDDVITFARSHPAMYN PVFPMNRPVIVIKTDVNYQFTQIVVDRVDAEDGQYDVMFIGTD VGTVLKVV SIPKETWYDLEEV LLEEMTVFREPTAISAMELSTKQ QQLYIGSTAGVAQLPLHRCDIYGKACAECCLARDPYCAWDGS ACSRYFPTAKRRTRRQDIRNGDPLTHCSDLHHDNHHGHSPEERI IYGVENSSTFLECSPKSQRALVYWQFQRRNEERKEEIRVDDHIIR TDQGLLLRSLQKDSGNYLCHAVEHGFQITLLKVTLEVIDTEHL EELLHKDDDGDGSKTKEMSNSMTPSQKVWYRDFMQLINHPNL NTMDEFCEQVWKRDRKQRRQRPGHTPGNSNKWKHLQENKKG RNRRTHEFERAPRSV	22

15 [00116] Используемые в настоящем документе термины «Sema3A антигенный эпитоп» и «Sema3A эпитоп» относятся к молекуле (например, пептиду) или фрагменту молекулы, способному связываться с антителом против Sema3A или его антигенсвязывающим фрагментом. Эти термины дополнительно включают, например, Sema3A антигенную детерминанту, распознаваемую любым из антител или фрагментов антител по данному изобретению, которая имеет комбинацию CDR легкой и тяжелой цепей, выбранную из CDR тяжелой цепи SEQ ID NO 1 - 3 и CDR легкой цепи SEQ ID NO: 4 - 6.

[00117] Sema3A антигенные эпитопы могут быть включены в белки, фрагменты белков, пептиды и подобные. Эпитопы чаще всего представляют собой белки, короткие олигопептиды, миметики олигопептидов (т.е. органические соединения, которые имитируют свойства связывания антител антигена Sema3A) или их комбинации.

[00118] Было обнаружено, что антитело или фрагменты антитела по данному изобретению связываются с уникальным эпитопом Sema3A человека. Предпочтительно, антитело против Sema3A или его антигенсвязывающий фрагмент связывается по меньшей мере с одним аминокислотным остатком в пределах аминокислотных областей 370–382 внеклеточного домена Sema3A человека с SEQ ID NO: 22. Этот эпитоп расположен близко к границе раздела Sema3A и рецептора Plexin A. Связывание антитела с этим эпитопом ингибирует образование сигнального голорецепторного комплекса лиганда Sema3A, рецептора Plexin A и корецептора Nrp1, что приводит к интерференции с биологическими эффектами такой передачи сигналов.

[00119] В контексте эпитопного связывания фраза «связывается в пределах аминокислотных областей X-Y...» означает, что антитело против Sema3A или его антигенсвязывающий фрагмент связывается по меньшей мере с одним, предпочтительно всеми, аминокислотным остатком в аминокислотной области, указанной в последовательности.

[00120] 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.

#### [00121] **Терапевтические применения**

[00122] В одном варианте воплощения настоящее изобретение обеспечивает анти-Sema3A или антигенсвязывающий фрагмент для применения в лечении тромботического заболевания сетчатки глаза путем ингибирования вазорепрессивного эффекта SemaA, путем улучшения реваскуляризации сетчатки и/или путем снижения проницаемости гемато-ретиального барьера. Авторы изобретения действительно разработали антитело, нацеленное на Sema3A, которое чрезвычайно полезно для:

- перенаправления ангиогенеза в ишемические области для улучшения реваскуляризации сетчатки;

- предотвращения патологической неоваскуляризации области стекловидного тела; и

5 - предотвращения нарушения гемато-ретиального барьера.

**[00123]** Как упоминалось ранее, Sema3A представляет собой вазорепульсивный сигнал, секретируемый гипоксическими ганглиозными клетками сетчатки. Связываясь с нейропилином-1, он активирует внутриклеточную передачу сигналов плексиновых рецепторов на эндотелиальных клетках, что приводит к разборке актиновых волокон. Это приводит к коллапсу цитоскелета в филоподиях верхушечных клеток, специализированных эндотелиальных клеток, которые направляют рост новых сосудов и препятствуют сосудистой регенерации ишемизированных участков сетчатки. Авторы изобретения показали, что модулирование вазорепульсивного действия с помощью нейтрализующего Sema3A антитела будет увеличивать количество верхушечных клеток и перенаправлять ангиогенез в сторону ишемических областей, таких как патологически увеличенная фовеальная аваскулярная зона у людей с диабетической макулярной ишемией.

**[00124]** Авторы изобретения продемонстрировали в **Примере 1** уместность и превосходство терапевтической стратегии, основанной на использовании антитела против Sema3A данного изобретения. Они действительно показали, что антитело данного изобретения уменьшает кистозный отек и подавляет истончение сетчатки во внутреннем ядерном слое мышинной модели RVO. Кроме того, авторы изобретения показали, что глазной кровотоком улучшается при введении антитела против Sema3A данного изобретения в мышинной модели RVO. Наконец, авторы изобретения продемонстрировали, что антитело против Sema3A данного изобретения уменьшает размер неперфузируемых областей сетчатки в мышинной модели RVO.

**[00125]** В одном варианте воплощения настоящее изобретение обеспечивает анти-Sema3A или антигенсвязывающий фрагмент для применения в лечении тромботического заболевания сетчатки глаза путем ингибирования вазорепрессивного эффекта SemaA, путем улучшения реваскуляризации сетчатки и/или путем снижения проницаемости гемато-ретиального барьера.

**[00126]** В предпочтительном варианте воплощения настоящее изобретение обеспечивает антитело против Sema3A или его антигенсвязывающий фрагмент для применения в лечении тромботического заболевания сетчатки глаза у пациента, страдающего от диабетической макулярной ишемии, предпочтительно путем регенерации сосудов в ишемизированной сетчатке (реваскуляризация) и предотвращения патологической неоваскуляризации области стекловидного тела глаза.

**[00127]** В другом предпочтительном варианте воплощения настоящее изобретение обеспечивает антитело против Sema3A или его антигенсвязывающий фрагмент для применения в лечении тромботического заболевания сетчатки глаза у пациента, страдающего от диабетического макулярного отека, предпочтительно путем снижения проницаемости гемато-ретиального барьера.

**[00128]** В другом предпочтительном варианте воплощения настоящее изобретение обеспечивает антитело против Sema3A или его антигенсвязывающий фрагмент для применения в лечении тромботического заболевания сетчатки глаза, путем ингибирования Sema3A-индуцированной проницаемости гемато-ретиального барьера и/или Sema3A-индуцированной вазорегрессии из ишемизированных зон.

**[00129]** В четвертом аспекте настоящее изобретение обеспечивает фармацевтическую композицию, содержащую антитело против Sema3A или его антигенсвязывающий фрагмент и фармацевтически приемлемый носитель для применения в лечении тромботического заболевания сетчатки глаза.

**[00130]** Антитело против Sema3A или его антигенсвязывающий фрагмент или фармацевтическую композицию данного изобретения вводят любым подходящим способом, включая интравитреальное, пероральное, парентеральное, подкожное, внутрибрюшинное, внутрилегочное и интраназальное введение. Парентеральные инфузии включают внутримышечное, внутривенное, внутриартериальное, внутрибрюшинное или подкожное введение. Кроме того, антитело против Sema3A целесообразно вводить путем пульсирующей инфузии, особенно со снижением дозы антитела. В одном аспекте дозирование проводят путем инъекций, наиболее предпочтительно внутривенных или подкожных инъекций, частично в зависимости от того,

является ли введение кратковременным или длительным. Предпочтительно, антитело против Sema3A вводят путем интравитреальной инъекции в глаз.

5 [00131] Для профилактики 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, предыдущая терапия, история болезни пациента и реакция на антитело, а также на усмотрение лечащего врача. Антитело подходящим образом вводят пациенту за один раз или в течение серии введений.

10 [00132] В предпочтительном варианте воплощения диапазон доз данного изобретения, применяемый на инъекцию, обычно составляет от 1 мг/глаз до 10 мг/глаз, от 1,5 мг/глаз до 5 мг/глаз, более предпочтительно от 2 мг/глаз до 3 мг/глаз и даже более предпочтительно примерно 2,5 мг/глаз.

15 [00133] Термин «подавление» используется в настоящем документе в том же контексте, что и «улучшение», и «облегчение», для обозначения ослабления или уменьшения одного или нескольких признаков заболевания.

20 [00134] Композиция антитела будет составлена, дозирована и введена в соответствии с надлежащей медицинской практикой. Факторы, которые следует учитывать в этом контексте, включают конкретное заболевание, подлежащее лечению, конкретного млекопитающего, подлежащего лечению, клиническое состояние отдельного пациента, причину заболевания, место доставки агента, 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 глаз или сетчатки, на которые направлено данное изобретение.

25 [00135] Антитело не должно быть, но необязательно, включено в состав одного или нескольких агентов, используемых в настоящее время для профилактики или лечения тромботических заболеваний сетчатки. Эффективное количество таких других агентов зависит от количества антитела против Sema3A, присутствующего в составе, типа нарушения или лечения и других факторов, обсуждавшихся выше. Их обычно применяют в тех же дозировках и при тех же путях введения, что и ранее, или примерно от 1 до 99% ранее использовавшихся дозировок.

30

**[00136]** Известны различные системы доставки, которые можно использовать для введения антитела против Sema3A или его антигенсвязывающего фрагмента. Способы введения включают, но не ограничиваются ими, интравитреальный, глазные капли, внутрикожный, 5 внутримышечный, внутрибрюшинный, внутривенный, подкожный, интраназальный, эпидуральный и пероральный пути. Антитело против Sema3A или его антигенсвязывающий фрагмент можно вводить, например, путем инфузии, болюса или инъекции, и его можно вводить вместе с другими биологически активными агентами. Введение может быть системным или 10 местным. В предпочтительных вариантах воплощения введение осуществляют путем интравитреальной инъекции (инъекции в стекловидное тело). Составы для таких инъекций могут быть приготовлены, например, в предварительно заполненных шприцах.

**[00137]** Антитело против Sema3A или его антигенсвязывающий фрагмент 15 можно вводить в виде фармацевтических композиций, содержащих терапевтически эффективное количество антитела против Sema3A или его антигенсвязывающего фрагмента и один или несколько фармацевтически совместимых ингредиентов.

**[00138]** В типичных вариантах осуществления фармацевтическую 20 композицию составляют в соответствии с обычными процедурами в виде фармацевтической композиции, адаптированной для внутривенного или подкожного введения человеку. Как правило, композиции для введения путем инъекции представляют собой растворы в стерильном изотоническом водном буфере. При необходимости фармацевтический препарат может также включать 25 солюбилизующий агент и местный анестетик, такой как лигнокаин, для облегчения боли в месте инъекции. Как правило, ингредиенты поставляются либо по отдельности, либо смешиваются друг с другом в стандартной лекарственной форме, например, в виде сухого лиофилизованного порошка или безводного концентрата в герметически закрытом контейнере, таком как 30 ампула или саше, с указанием количества активного агента. Если фармацевтический препарат должен вводиться путем инфузии, его можно дозировать с помощью флакона для инфузии, содержащего стерильную воду или физиологический раствор фармацевтической чистоты. Если фармацевтический препарат вводят путем инъекции, может быть предоставлена ампула со

стерильной водой для инъекций или физиологическим раствором, таким образом, чтобы можно было смешать ингредиенты перед введением.

**[00139]** Кроме того, фармацевтическая композиция может быть представлена в виде фармацевтического набора, включающего (а) контейнер, содержащий антитело против Sema3A или его антигенсвязывающий фрагмент в лиофилизированной форме, и (б) второй контейнер, содержащий фармацевтически приемлемый разбавитель (например, стерильную воду) для инъекций. Фармацевтически приемлемый разбавитель можно использовать для восстановления или разведения лиофилизированного антитела против Sema3A или его антигенсвязывающего фрагмента. Необязательно с таким контейнером (контейнерами) может быть уведомление в форме, предписанной государственным органом, регулирующим производство, применение или продажу фармацевтических или биологических продуктов, которое отражает одобрение агентства по производству, применению или продаже для введения человеку.

**[00140]** Количество антитела против Sema3A или антигенсвязывающего фрагмента, которое является эффективным при лечении или профилактике заболеваний глаз или сетчатки, можно определить стандартными клиническими методами. Кроме того, необязательно можно использовать анализы *in vitro*, чтобы помочь определить оптимальные диапазоны дозировок. Точная доза, используемая в составе, также будет зависеть от пути введения и стадии расстройства и должна определяться в соответствии с мнением лечащего врача и обстоятельствами каждого пациента. Эффективные дозы могут быть экстраполированы из кривых доза-ответ, полученных в тест-системах *in vitro* или на животных моделях.

**[00141]** Например, токсичность и терапевтическую эффективность антитела против Sema3A или его антигенсвязывающего фрагмента можно определить в культурах клеток или на экспериментальных животных с помощью стандартных фармацевтических процедур определения ED<sub>50</sub> (доза, терапевтически эффективная у 50% популяции). Предпочтительным является антитело против Sema3A или его антигенсвязывающий фрагмент, обладающий большим терапевтическим индексом.

**[00142]** Данные, полученные в результате анализов клеточных культур и исследований на животных, можно использовать для определения диапазона

дозировок для применения у людей. Дозировка антитела против Sema3A или его антигенсвязывающего фрагмента обычно находится в диапазоне циркулирующих концентраций, который включает ED<sub>50</sub> с небольшой токсичностью или без таковой. Дозировка может варьироваться в пределах этого диапазона в зависимости от используемой лекарственной формы и используемого пути введения. Для любого антитела против Sema3A или его антигенсвязывающего фрагмента, используемого в этом способе, терапевтически эффективная доза может быть первоначально оценена на основе анализов клеточных культур. Доза может быть составлена на животных моделях для достижения диапазона концентраций в циркулирующей плазме, который включает IC<sub>50</sub> (т. е. концентрацию тестируемого соединения, при которой достигается полумаксимальное ингибирование симптомов), как определено в клеточной культуре. Такая информация может быть использована для более точного определения полезных доз для человека. Уровни в плазме можно измерить, например, с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии, ELISA и т. п.

**[00143]** Для интравитреальной инъекции антитела против Sema3A обычно предпочтительны более длительные интервалы между обработками. Благодаря улучшенной аффинности и эффективности связывания антитело против Sema3A по данному изобретению можно вводить через более длительные интервалы времени.

**[00144]** В одном варианте воплощения 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 наиболее предпочтительно каждые 12 недель. В еще одном предпочтительном варианте воплощения антитело против Sema3A данного изобретения вводят один раз каждые 3 месяца.

**[00145]** Поскольку объем, который можно вводить в глаз, строго ограничен, очень важно, чтобы антитело против Sema3A можно было приготовить в высокой концентрации. Кроме того, эффективность антитела против Sema3A имеет большое значение, поскольку мощное антитело может проявлять свое действие даже в более низких дозах и, таким образом, продлевать активность, а также интервалы между обработками.

**[00146]** Антитела по данному изобретению 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 по данному изобретению могут быть  
5 приготовлены в жидком составе приблизительно 50 мг/мл.

**[00147]** Типичная доза, которую можно вводить пациенту, составляет примерно 2,5 мг/глаз. Типичные буферные компоненты, которые можно использовать для такой композиции, включают, например, ацетат натрия, PS20 и дигидрат трегалозы.

10 **[00148]** В одном варианте воплощения, антитело против Sema3A готовят с 10 мМ гистидинового буфера, 240 мМ сахарозы, 0,02 мас./об. % полисорбата 20 при pH 5,5 с конечной концентрацией белка 60 мг/мл.

**[00149]** В некоторых вариантах воплощения фармацевтические композиции, содержащие антитело против Sema3A или его антигенсвязывающий  
15 фрагмент, могут дополнительно содержать терапевтический агент, либо конъюгированный, либо неконъюгированный со связывающим агентом.

**[00150]** Что касается терапевтических схем комбинированного введения, в конкретном варианте воплощения антитело против Sema3A или его антигенсвязывающий фрагмент вводят одновременно с терапевтическим  
20 агентом. В другом конкретном варианте воплощения терапевтический агент вводят до или после введения антитела против Sema3A или его антигенсвязывающего фрагмента в течение по меньшей мере от одного часа до нескольких месяцев, например, по меньшей мере за один час, пять часов, 12 часов, за день, неделю, месяц или три месяца до или после введения антитела  
25 против Sema3A или его антигенсвязывающего фрагмента.

**[00151] Способ лечения**

**[00152]** В другом аспекте данное изобретение также охватывает любой способ лечения или профилактики тромботического заболевания сетчатки, в котором указанное антитело против Sema3A или его антигенсвязывающий  
30 фрагмент включает введение пациенту, которому это необходимо, причем указанный способ включает введение антитела против Sema3A данного изобретения.

**[00153]** Предпочтительно данное изобретение относится к способу лечения или профилактики тромботического заболевания сетчатки,

включающему введение пациенту, которому это необходимо, фармацевтически эффективного количества антитела по данному изобретению.

[00154] Все раскрытые технические признаки, описанные в данном описании, применимы к указанному способу лечения.

5 [00155] **Готовое изделие**

[00156] В другом аспекте включено готовое изделие, содержащее материалы, полезные для лечения описанных выше нарушений. Указанное готовое изделие включает контейнер и этикетку. Подходящие контейнеры включают, например, бутылки, флаконы, шприцы и пробирки. Контейнеры могут быть изготовлены из различных материалов, таких как стекло или пластик. Контейнер содержит композицию, которая эффективна для лечения состояния, и может иметь стерильный порт доступа. Например, контейнер может представлять собой пакет для внутривенного раствора или флакон с пробкой, прокалываемой иглой для подкожных инъекций. Активный агент в композиции представляет собой антитело против Sema3A или его антигенсвязывающий фрагмент. Этикетка на контейнере или связанная с ним указывает, что композиция используется для лечения выбранного состояния. Готовое изделие может дополнительно содержать второй контейнер, содержащий фармацевтически приемлемый буфер, такой как фосфатно-солевой буфер, раствор Рингера и раствор декстрозы. Кроме того, он может включать другие материалы, желательные с коммерческой точки зрения и с точки зрения пользователя, в том числе другие буферы, разбавители, фильтры, иглы, шприцы и листы-вкладыши с инструкциями по применению.

[00157] Изобретение далее описано в следующих примерах, которые не предназначены для ограничения объема данного изобретения.

**ПРИМЕРЫ**

[00158] **Пример 1: Эффекты антитела против Sema3A в модели окклюзии вен сетчатки у мышей**

[00159] В этом исследовании типичное антитело против Sema3A по данному изобретению оценивали для интравитреальной терапии антителами при ишемии сетчатки с использованием модели окклюзии вен сетчатки у мышей. Кроме того, для дифференциации и нейтрализации сигнальной оси Sema3A/Nrp1 от оси VEGF/Nrp1 также оценивают монотерапию с антителом против Sema3A и его комбинацию с антителом против VEGF.

**[00160] I. Материалы**

**[00161] А. План клинического исследования**

**[00162]** План клинического исследования проиллюстрирован на Фигуре

1. Данный пример включает 4 следующих этапа:

- 5
- Этап 1: Отек и повреждение (Гистологический анализ, оптическая когерентная томография (ОСТ))
  - Этап 2: Кровоток (лазерная спекл-флоуграфия)
  - Этап 3: Неперфузионная область сетчатки (окрашенная флуоресцеином плоская сетчатка)
  - Этап 4: Экспрессия белка (WB)
- 10

**[00163] В. Исследуемое/эталонное соединение**

**[00164]** Авторы изобретения протестировали антитело примера по данному изобретению: клон I. Указанное антитело содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14, и лёгкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15.

15

**[00165]** Авторы изобретения протестировали и сравнили указанное антитело против Sema3A с коммерчески доступной анти-VEGF ловушкой Eylea®.

Соединения разводили буфером Avastin (60 мг/мл  $\alpha, \alpha$ -трегалозы дегидрата, 5,8 мг/мл фосфата натрия (одноосновный, моногидрат), 1,2 мг/мл фосфата натрия (двухосновный, безводный), 0,4 мг/мл полисорбата 20, pH 6,2) до концентрации 10 мг/мл.

20

**[00166] С. Группы и протокол**

**[00167]** В таблице 4 ниже приведены различные группы и типы протоколов, используемых для каждой группы.

25

**[00168] Таблица 4:**

	Индукция	Эталонные/ Исследуемые реагенты	Дозировка ** (мг/кг)	Путь введения	Количество животных
1	Нормальный	Носитель		IVT	5x2
2	RVO	Носитель		IVT	5x2
3	RVO	анти-Sema3A данного изобретения	10 мкг/глаз	IVT	5x2
4	RVO	анти-VEGF (Eylea®)	10 мкг/глаз	IVT	5x2
5	RVO	анти-Sema3A данного изобретения анти-VEGF (Eylea®)	10 мкг/глаз 10 мкг/глаз	IVT	5x2

RVO - окклюзия вен сетчатки; IVT - интравитреальная инъекция

**[00169]** D. Реагенты

**[00170]** Различные используемые реагенты обобщены в следующей таблице 5.

**[00171]** Таблица 5:

Название реагента	Поставщик	№ по каталогу
Бенгальский розовый	Wako	184-00272
Immuno Star® LD	Wako	290-69904
Конъюгированный с флуоресцеином декстран	Sigma-Aldrich	FD2000S-5G
динатрия гидрофосфат 12-вода: Na <sub>2</sub> HPO <sub>3</sub> · 12H <sub>2</sub> O	Nacalai Tesque	31723-35
натрия дигидрофосфат дигидрат: NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	Nacalai Tesque	31718-15
параформальдегид	Nacalai Tesque	162-16065
кеталар	Daiichi Sankyo Propharma	GYA0038
ксилазин	Bayer Healthcare	KP0C7DJ
Гематоксилин 560MX	Leica	3801575
Спиртовой эозин Y515	Leica	3801615
Хлорид калия	Wako	160-22115
Хлорид натрия	Kishida Chemical	008-71265
дигидрофосфат калия	Nacalai Tesque	28720-65

5

**[00172]** E. Антитела для вестерн-блот анализа экспрессии белка

**[00173]** Наконец, антитела, используемые специально для анализа экспрессии белка *in vitro* с помощью вестерн-блоттинга, обобщены в таблице 6 ниже.

10

**[00174]** Таблица 6:

Название/Цель	Происхождение	Поставщик	№ по каталогу	Номер партии
Nrp1	кролик	abcam	ab81321	GR212288-38
TNFα	мышь	Santa Cruz Biotechnology	sc-52746	J1317
ПлексинA1	кролик	abcam	ab23391	GR285914-16
β актин	мышь	Sigma-Aldrich	A2228	067M4856V

**[00175]** **II. СПОСОБЫ**

**[00176]** A. Животные и мышинная модель RVO:

**[00177]** Все эксперименты на животных проводили в соответствии с заявлением Ассоциации исследований в области зрения и офтальмологии (ARVO) об использовании животных в исследованиях в области офтальмологии и зрения, и эксперименты были одобрены и контролировались Институциональным комитетом по уходу за животными и их использованию Фармацевтического университета Гифу.

15

[00178] Самцов мышей ddY в возрасте 8 недель получали от Japan SLC (Shizuoka, Japan) и содержали при  $23 \pm 3^\circ\text{C}$  при 12-часовых циклах свет/темнота (свет включался с 08:00 до 20:00). Мышей анестезировали смесью кетамина (120 мг/кг) и ксилазина (6 мг/кг). RVO получали с помощью лазерной фотокоагуляции (532 нм, мощность 50 мВт, продолжительность 5000 мс, размер пятна 50 мкм) трех вен сетчатки правого глаза каждого животного после внутривенного введения 8 мг/мл красителя бенгальского розового с использованием лазерной системы с визуальным наведением, прикрепленной к микроскопу для визуализации сетчатки Micron IV (Phoenix Research Laboratories, Inc.).

[00179] Антитело против Sema3A данного изобретения и/или анти-VEGF ловушку интравитреально вводили сразу или через 7 дней после лазерного облучения в правый глаз каждой мыши в дозе 10 мкг/глаз и объеме инъекции 2 мкл.

[00180] *В. Гистология*

[00181] Окрашивание гематоксилином и эозином (H&E) выполняли для визуализации гистологических изменений срезов глаза мыши. Глаза, использованные для гистологического анализа, погружали по меньшей мере на 48 часов при  $4^\circ\text{C}$  в 4% параформальдегид (ПФА). Через диск зрительного нерва каждого глаза вырезали шесть срезов (5 мкм), заливали парафином и окрашивали гематоксилином и эозином. Изображения фотографировали с помощью флуоресцентного микроскопа (BZ-710; Keyence). Толщину внутреннего ядерного слоя (INL) диска зрительного нерва измеряли на фотографиях через каждые 240 мкм от диска зрительного нерва по направлению к периферии с помощью изображения J (National Institutes of Health, Bethesda). Данные трех срезов, выбранных случайным образом из шести срезов, усреднялись для каждого глаза.

[00182] *С. Измерение кровотока с помощью лазерной спекл-флоуграфии:*

[00183] Изображения средней скорости размытия (MBR), индекс относительной скорости кровотока, получали непрерывно с использованием устройства лазерной спекл-флоуграфии (LSFG; Softcare) со скоростью 30 кадров в секунду в течение периода времени приблизительно 4 с. Измеренная площадь глазного дна составила примерно  $3,8 \times 3$  мм (ширина  $\times$  высота) с расчетным проникновением в ткани 0,5–1 мм. После получения изображения области

сосудов и тканей в области диска зрительного нерва автоматически обнаруживались с помощью программного обеспечения LSFG Analyzer (версия 3.1.14.0; Software Co., Ltd.) с использованием так называемой функции выделения сосудов.

5           **[00184]**    *D. Визуализация неперфузированной области сетчатки:*

**[00185]**    Мышам инъецировали 0,5 мл 20 мг/мл конъюгированного с флуоресцеином декстрана, растворенного в ФСБ, в хвостовые вены перед отбором проб. Глаза энуклеировали и фиксировали в течение 7 часов в 4% ПФА, после чего готовили плоские препараты сетчатки. Изображения плоских  
10           препаратов сетчатки были получены с помощью Metamorph (Universal Imaging Corp) и проанализированы с использованием программного обеспечения для обработки изображений ImageJ для определения размера неперфузированных областей сетчатки.

**[00186]**    *E. Вестерн-блот анализ экспрессии белка*

15           Вестерн-блот анализ проводили стандартным способом. Иммунореактивные полосы делали видимыми с помощью Immuno Star® LD, и их плотность измеряли с помощью анализатора люминесцентных изображений LAS-4000 (Fuji Film Co. Ltd.). Для количественного анализа сигналы общего белка использовали в качестве контроля нагрузки для сигналов фосфопротеинов.

20           **[00187]**    **III. РЕЗУЛЬТАТЫ**

**[00188]**    *A. Антитело против Sema3A по данному изобретению уменьшает кистозный отек и истончение сетчатки во внутреннем ядерном слое мышинной модели RVO.*

**[00189]**    Авторы изобретения исследовали, может ли кистозный отек,  
25           вызванный RVO, уменьшиться введением антитела против Sema3A по данному изобретению.

**[00190]**    Протокол лечения для этого эксперимента включает раннюю фазу введения после лазерного облучения и позднюю фазу введения через 7 дней после лазерного облучения. В основном, антитело против Sema3A и/или анти-  
30           VEGF ловушку вводят интравитреально либо сразу, либо через 7 дней после лазерного облучения в правый глаз каждой мыши в дозе 10 мкг/глаз.

**[00191]**    Толщина истончения внутреннего ядерного слоя сетчатки (INL) заметно увеличилась через 1 день после лазерного облучения, и это увеличение было подавлено введением антител против Sema3A по данному изобретению.

Комбинация антитела данного изобретения с анти-VEGF ловушкой, а также одной анти-VEGF ловушкой, достигла такого же эффекта в этой ранней фазе после индукции RVO.

5 [00192] Для изучения эффекта антитела против Sema3A на истончение внутреннего ядерного слоя сетчатки (INL) на поздней фазе после индукции RVO мышам интравитреально вводили антитело против Sema3A данного изобретения и/или анти-VEGF ловушку через 7 дней после лазерного облучения.

10 [00193] Толщина INL значительно уменьшилась через 8 дней после лазерного облучения в группе, получавшей носитель. Введение анти-VEGF ловушки увеличивало степень истончения сетчатки. Однако интравитреальное введение антитела против Sema3A данного изобретения через 7 дней после лазерного облучения подавляло истончение сетчатки.

15 [00194] Результаты показывают, что антитело данного изобретения подавляет истончение сетчатки, подтверждая его полезное применение при лечении тромботического заболевания сетчатки, такого как RVO. Результаты также отличают антитело данного изобретения от лечения анти-VEGF ловушкой, поскольку последняя не обеспечивает полезных эффектов на всех фазах после индукции RVO.

20 [00195] В. Глазной кровоток улучшается при введении антитела против Sema3A данного изобретения в мышинной модели RVO.

[00196] Авторы изобретения исследовали изменения глазного кровотока через 1 или 8 дней после лазерного облучения с помощью антитела против Sema3A данного изобретения с помощью лазерной спекл-флуографии.

25 [00197] Протокол лечения для этого эксперимента включает раннюю фазу введения после лазерного облучения и позднюю фазу введения через 7 дней после лазерного облучения. В основном, антитело против Sema3A и/или анти-VEGF ловушку вводят интравитреально либо сразу, либо через 7 дней после лазерного облучения в правый глаз каждой мыши в дозе 10 мкг/глаз.

30 [00198] Авторы изобретения показали, что кровоток значительно уменьшился через 1 день после лазерного облучения в группе, получавшей носитель.

[00199] При раннем введении после лазерного облучения снижение кровотока уменьшалось в 1 день после введения антитела против Sema3A данного изобретения и введения. Введение анти-VEGF ловушки приводило к

такому же эффекту на кровоток. Комбинация антитела против Sema3A данного изобретения и анти-VEGF ловушки сразу после лазерного облучения приводила к более выраженному уменьшению снижения кровотока в этой ранней фазе после индукции RVO (**Фигура 2А**).

5           **[00200]** Авторы изобретения исследовали глазной кровоток с помощью антитела против Sema3A и/или анти-VEGF ловушки через 7 дней после лазерного облучения правого глаза каждой мыши в дозе 10 мкг/глаз (поздняя фаза введения после лазерного облучения). Кровоток был значительно снижен через 8 дней после лазерного облучения в группе, получавшей носитель.

10           **[00201]** Результаты показывают, что инъекция анти-VEGF ловушки увеличивала степень снижения кровотока в сетчатке. Напротив, кровоток при введении антитела против Sema3A данного изобретения был значительно лучше, чем в группе, получавшей носитель. Комбинация антитела против Sema3A данного изобретения с анти-VEGF ловушкой в этой поздней фазе после  
15 индукции RVO нейтрализует положительный эффект антитела против Sema3A данного изобретения (**Фигура 2В**).

**[00202]** Эти данные показывают, что антитело данного изобретения значительно улучшает кровоток во всех фазах после индукции RVO. Кроме того, они демонстрируют превосходство антитела данного изобретения в улучшении  
20 кровотока по сравнению с терапевтической стратегией, основанной только на анти-VEGF.

**[00203]** *С. Антитело против Sema3A данного изобретения снижает размер неперфузированных областей сетчатки в мышинной модели RVO.*

**[00204]** Чтобы исследовать влияние антитела против Sema3A на размер  
25 неперфузированных областей, авторы изобретения инъецировали интравитреально либо сразу, либо через 7 дней после лазерного облучения антитело против Sema3A по данному изобретению и/или анти-VEGF ловушку.

**[00205]** Введение антитела против Sema3A сразу после лазерного облучения приводило к значительному уменьшению размера  
30 неперфузированных областей через 1 день после лазерного облучения по сравнению с группой, получавшей носитель. Введение анти-VEGF ловушки или комбинации антитела против Sema3A данного изобретения с анти-VEGF ловушкой дает примерно такой же эффект.

[00206] Что касается поздней фазы введения после лазерного облучения, авторы изобретения показали, что размер неперфузированных областей увеличивался при введении анти-VEGF ловушки через 7 дней после лазерного облучения. Напротив, авторы изобретения показали, что введение антитела против Sema3A данного изобретения через 7 дней после лазерного облучения приводило к уменьшению размера неперфузированных областей по сравнению с группой, получавшей носитель. Введение комбинации антитела против Sema3A данного изобретения с анти-VEGF ловушкой нейтрализовало положительный эффект антитела против Sema3A данного изобретения.

[00207] Эти результаты показывают, что антитело против Sema3A данного изобретения уменьшает размер неперфузированных областей через 7 дней в большей степени, чем стратегия, основанная на терапевтическом использовании анти-VEGF ловушки. Это подтверждает полезное применение антитела данного изобретения при лечении тромботических заболеваний, таких как RVO.

[00208] D. Экспрессия TNF- $\alpha$  и Sema3A-связанного рецептора (Plexin A1 (плексин A1) и Neuropilin1 (нейропилин 1)), снижается антителом против Sema3A в мышечной модели RVO

[00209] Исследовали экспрессию белка TNF- $\alpha$  и Sema3A-связанного рецептора (плексин A1 и нейропилин 1).

[00210] Экспрессию компонентов TNF- $\alpha$  и Sema3A-связанного рецептора (плексин A1 и нейропилин 1), определяли после интравитреальной инъекции антитела против Sema3A данного изобретения и/или анти-VEGF ловушки сразу или через 7 дней после лазерного облучения.

[00211] Экспрессия TNF- $\alpha$  и плексина A1 повышалась в группе, получавшей носитель, через 1 день после лазерного облучения. Ранняя инъекция антитела против Sema3A сильно снижала уровни экспрессии по сравнению с группой, получавшей носитель. Такой же эффект достигался с комбинацией антитела против Sema3A данного изобретения с анти-VEGF ловушкой. В то время как анти-VEGF ловушка сама по себе также снижала TNF- $\alpha$  в этой ранней фазе после индукции RVO, она не оказывала существенного влияния на экспрессию плексина A1.

[00212] TNF- $\alpha$  и нейропилин 1 повышались в группе, получавшей носитель, через 8 дней после лазерного облучения. Однако введение антитела

против Sema3A данного изобретения снижало эти факторы в поздней фазе. С другой стороны, инъекция анти-VEGF ловушки не влияла на экспрессию Nrp1 и увеличивала TNF- $\alpha$  по сравнению с группой, получавшей носитель, в этой поздней фазе после индукции RVO. Комбинация антитела против Sema3A данного изобретения с анти-VEGF ловушкой ослабила эффекты антитела против Sema3A данного изобретения.

**[00213] IV. ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

**[00214]** В целом, эти данные показывают, что уровни экспрессии Sema3A-связанного рецептора и воспалительных факторов были повышены в глазах с RVO.

**[00215]** Инъекция антитела против Sema3A по данному изобретению в ранней фазе после индукции RVO значительно уменьшала отек сетчатки, размер неперфузированных областей и уменьшение кровотока. Кроме того, была снижена повышенная экспрессия TNF- $\alpha$  и Sema3A-связанного рецептора (Плексин A1).

**[00216]** Кроме того, инъекция антитела против Sema3A в поздней фазе после индукции RVO также улучшала эти патологические симптомы, а повышенная экспрессия TNF- $\alpha$  и Sema3A-связанного рецептора (нейропелин1) снижалась.

**[00217]** Понижающая регуляция TNF- $\alpha$  и Sema3A-связанного рецептора (нейропелин 1 и плексин A1), возможно, способствовала улучшению патологических симптомов в мышинной модели RVO после введения антитела против Sema3A данного изобретения.

**[00218]** Настоящие данные подтверждают, что антитело данного изобретения является весьма перспективным для лечения пациентов, страдающих тромботическим заболеванием сетчатки, особенно RVO. В частности, антитело против Sema3A данного изобретения проявляет благотворное действие на всех фазах после индукции RVO, что отличает его от анти-VEGF ловушки.

**[00219] Пример 2: Аффинность и клеточная активность**

**[00220] А) Аффинность**

**[00221]** Подвижный буфер для этого эксперимента и все разведения (за исключением оговоренных случаев) проводили в ФСБ-Т-ЭДТА с 0,01% Tween 20 [100 мкл 100% Tween 20 добавляли к 2 л ФСБ-Т-ЭДТА, чтобы

получить окончательную концентрацию Tween 20 0,01%]. Сенсорный чип GLM нормализовали и предварительно подготовили в соответствии с рекомендациями производителя. Сенсорный чип активировали равной смесью EDC/s-NHS в горизонтальном направлении в течение 300 с при скорости потока 30 мкл/мин и иммобилизовали с помощью Human Fab Binder (10 мкг/мл в 10 мМ ацетате, рН 5,0) в горизонтальном направлении в течение 300 с при скорости потока 30 мкл/мин, в результате чего на поверхности остается ~ 6739-7414 RU Human Fab Binder. Сенсорный чип дезактивировали 1М раствором этаноламина HCl в горизонтальном направлении в течение 300 с при скорости потока 30 мкл/мин. Сенсорный чип стабилизировали в течение 18 с при помощи 10 мМ глицина, рН 2,1 при скорости потока 100 мкл/мин 1 раз горизонтально и 1 раз вертикально.

**[00222]** Авторы изобретения протестировали антитело примера по данному изобретению (клон I). Указанное антитело (0,5 мкг/мл) захватывали на поверхности Human Fab Binder вертикально в течение 300 с при скорости потока 25 мкл/мин, что дает уровень захвата ~180 RU. Исходный уровень стабилизировали введением ФСБ-Т-ЭДТА в течение 60 с при скорости потока 40 мкл/мин горизонтально. Аналит вводили горизонтально над захваченным антителом в течение 600 с при скорости потока 40 мкл/мин и диссоциации в течение 7200 с. Концентрации аналитов составляли 0 нМ, 0,625 нМ, 1,25 нМ, 2,5 нМ, 5 нМ и 10 нМ. Поверхность регенерировали введением 10 мМ глицина, рН 2,1, в течение 18 с при скорости потока 100 мкл/мин один раз горизонтально и один раз вертикально. ФСБ-Т-ЭДТА вводили в течение 60 с со скоростью потока 25 мкл/мин однократно вертикально.

Промежутки между пятнами (взаимодействия с поверхностью сенсора) и холостой анализ (ФСБ-Т-ЭДТА с 0,01% Tween20 или 0 нМ аналита) вычитали из необработанных данных. Затем сенсограммы были глобально приспособлены к связыванию Ленгмюра 1:1, чтобы получить значения скорости ассоциации ( $k_a$ ), скорости диссоциации ( $k_d$ ) и аффинности ( $K_D$ ).

**[00223] В) Клеточная активность**

**[00224]** Для определения функциональной активности в анализе коллапса цитоскелета кривые концентрация Sema3A - ответ объединяли с возрастающими концентрациями антитела в качестве экспериментов по сдвигу  $IC_{50}$ . Для расчета значения  $pA2$  (отрицательный логарифм концентрации антитела, необходимой для сдвига кривой концентрации Sema3A - ответ на коэффициент 2) был

построен график Gaddum Schild. Активность в пМ рассчитывали по значению pA2 как =АКТИВНОСТЬ(10;-X).

[00225] Результаты представлены в таблице 7 ниже.

[00226] **Таблица 7:**

Молекула	Аффинность (K <sub>d</sub> ) [пМ]					Функциональный антагонизм в анализе коллапса цитоскелета (A <sub>2</sub> ) [пМ]
	Человек	Яванский макак	Мышь	Крыса	Кролик	Человек
Антитело по данному изобретению (клон I)	29	28	27	27	42	69

5

[00227] **Пример 3: Оценка иммуногенности антитела по данному изобретению**

[00228] Авторы изобретения оценили предполагаемую иммуногенность антитела примера по данному изобретению, клон I. Указанное антитело содержит тяжелую цепь и легкую цепь, содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 14 и SEQ ID NO: 15, соответственно.

[00229] Для этой цели они использовали инструмент *in silico* для прогнозирования эпитопов Т-клеток (EpiMatrix разработанный EpiVax).

[00230] Путем скрининга последовательностей многих изолятов антител человека компания EpiVax идентифицировала несколько высококонсервативных лигандов HLA, которые, как полагают, обладают регуляторным потенциалом. Экспериментальные данные свидетельствуют о том, что многие из этих пептидов на самом деле активно толерогенны у большинства субъектов. Эти высококонсервативные, регуляторные и неизбирательные эпитопы Т-клеток теперь известны как Tregitope (Т регуляторные эпитопы) (De Groot и соавт. Blood. 15 окт 2008; 112(8): 3303-11). Иммуногенный потенциал неэпитопов, содержащихся в гуманизированных антителах, можно эффективно контролировать в присутствии значительного количества Tregitope.

[00231] Для целей анализа иммуногенности антител компания EpiVax разработала шкалу EpiMatrix с поправкой на Tregitope, и соответствующий прогноз антитерапевтического ответа антител. Чтобы рассчитать показатель EpiMatrix с поправкой на Tregitope, баллы Tregitope вычитают из белкового

25

показателя EpiMatrix. Было показано, что показатели с поправкой на Tregitore хорошо коррелируют с наблюдаемым клиническим иммунным ответом для набора из 23 коммерческих антител (De Groot и соавт. Clin Immunol. 2009 May; 131(2): 189-201).

5 [00232] Результаты по шкале EpiMatrix суммированы в таблице 8 ниже.

[00233] **Таблица 8:**

Молекула	Тяжелая цепь (% челов.)		EpiVax (VH)	EpiVax (Vκ)	Легкая цепь (% челов.)	
	FR	V-ген			FR	V-ген
Антитело данного изобретения (клон I)	97	91	-27,27	-21,79	98	88

10 [00234] Последовательности антитела данного изобретения имеют нижний предел шкалы EpiMatrix, что указывает на то, что антитело данного изобретения обладает сильно ограниченным потенциалом иммуногенности. Указанная шкала EpiMatrix хорошо известна специалистам в данной области техники и может быть найдена среди прочего на Фигуре 2 публикации Mufarregе и соавт. Clin Immunol. март 2017; 176: 31-41.

15 [00235] **Пример 4: Сравнение аффинности связывания между антителом данного изобретения и антителом Chiome**

[00236] В целях сравнения авторы изобретения разработали гуманизированное антитело против Sema3A, раскрытое в WO 2014123186 (Chiome Bioscience), со следующими характеристиками:

- 20
- тяжелая цепь, как показано в SEQ ID NO: 11 в WO2014123186, и
  - легкая цепь, как показано в SEQ ID NO: 12 в WO2014123186.

Авторы изобретения разработали 2 формы этого антитела:

- 25
- одна, отформатированная на IgG1KO Fc, именуемая в дальнейшем «Chiome антитело А» и
  - одна, отформатированная на IgG1KO-FcRn нуль, именуемая в дальнейшем «Chiome антитело В».

[00237] Антитело против Fab человека (GE Healthcare) с высокой поверхностной плотностью было иммобилизовано на GLM-чипе (BioRad) посредством прямого связывания с амином по 6 горизонтальным каналам в соответствии с руководством производителя BioRad.

[00238] Антитело по данному изобретению (клон I) и антитела Chiome были захвачены на поверхности антитела против Fab человека через 5 из 6 вертикальных каналов с минимальной поверхностной плотностью для анализа кинетического связывания. Sema3A человека готовили в буфере ФСБ-Т-ЭДТА (BioRad) в концентрациях 100, 50, 25, 12,5, 10, 6,25, 5, 2,5, 1,25, 0,625 и 0 нМ. Инъекцию буфера ФСБ-Т-ЭДТА использовали в качестве двойного эталона для анализа кинетических данных. Каждый из растворов Sema3A человека и буфера ФСБ-Т-ЭДТА вводили одновременно через 6 горизонтальных каналов в течение 10 минут при скорости потока 40 мкл/мин с последующей 2-часовой фазой диссоциации. Поверхности регенерировали путем 18-секундной инъекции 10 мМ глицина HCl с pH 2,1 (GE Healthcare) при скорости потока 100 мкл/мин с последующей 60-секундной инъекцией ФСБ-Т-ЭДТА при скорости потока 25 мкл/мин. Сенсограммы связывания были приспособлены к модели Ленгмюра 1:1 для расчета скорости ассоциации, скорости диссоциации и аффинности.

[00239] Кинетические и аффинные данные антитела по данному изобретению и связывания антитела Chiome с Sema3A человека перечислены в таблице 9 ниже.

[00240] **Таблица 9:**

Название образца	$K_D$ к Sema3A человека
Chiome антитело А	56,4 нМ
Chiome антитело В	55,9 нМ
Антитело по данному изобретению (клон I)	32,0 пМ

[00241] Заключение

Результаты показывают, что антитело по данному изобретению обладает более высокой аффинностью связывания с Sema3A человека, чем антитело предшествующего уровня техники, раскрытое в WO 2014123186 (Chiome Bioscience).

[00242] **Пример 5: Сравнение аффинности связывания между антителом по данному изобретению и Samsung scFv**

[00243] Сравнили фрагменты scFv, раскрытые в WO2017074013 (Samsung).

[00244] В целях сравнения авторы изобретения разработали 3 раскрытых фрагмента scFv («Samsung scFv») с признаками, раскрытыми в таблице 10 ниже.

**[00245] Таблица 10:**

Название антитела	Последовательности	SEQ ID NO, как представлено в WO2017074013
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

**[00246]** Антитело против His с высокой поверхностной плотностью (GE Healthcare) иммобилизовали на GLM-чипе (BioRad) посредством прямого связывания с амином по 6 горизонтальным каналам в соответствии с руководством производителя BioRad. Samsung scFv антитела были захвачены на поверхности антитела против His по 5 из 6 вертикальных каналов с минимальной поверхностной плотностью для анализа кинетического связывания. Sema3A человека готовили в буфере ФСБ-Т-ЭДТА (BioRad) в концентрациях 100, 50, 25, 12,5, 10, 6,25, 5, 2,5, 1,25, 0,625 и 0 нМ. Инъекцию буфера ФСБ-Т-ЭДТА использовали в качестве двойного эталона для анализа кинетических данных. Каждый из растворов Sema3A человека и буфера ФСБ-Т-ЭДТА вводили одновременно через 6 горизонтальных каналов в течение 10 минут при скорости потока 40 мкл/мин с последующей 1-часовой фазой диссоциации. Поверхности регенерировали путем 18-секундной инъекции 10 мМ глицина HCl с pH 2,1 (GE Healthcare) со скоростью потока 100 мкл/мин с последующей инъекцией 60 секунд ФСБ-Т-ЭДТА со скоростью потока 25 мкл/мин. Сенсограммы связывания были приспособлены к модели Ленгмюра 1:1 для расчета скорости ассоциации, скорости диссоциации и аффинности.

**[00247]** Связывание антитела данного изобретения с Sema3A человека (клон I) осуществляли с использованием аналогичного способа, но для захвата антитела данного изобретения использовали козий античеловеческий IgG (Invitrogen). Связывание антитела данного изобретения и Samsung ScFv с Sema3A яванского макака, мыши, крысы или кролика также осуществляли с использованием тех же способов.

**[00248]** Кинетические и аффинные данные антитела по данному изобретению и Samsung scFv перечислены в таблице 11 ниже.

[00249] **Таблица 11:**

Название антитела	$K_D$ к Sema3A человека (пМ)	$K_D$ к Sema3A яванского макака (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 данного изобретения (клон I)	34,7	35,0	35,0	23,5	40,1

[00250] Заключение

[00251] Антитело данного изобретения обладает более высокой аффинностью связывания с Sema3A человека, яванского макака, мыши или кролика, чем 3 Samsung scFv, как раскрыто в WO2017074013.

## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Антитело против Sema3A или его антигенсвязывающий фрагмент для применения в лечении тромботического заболевания сетчатки глаза, при этом  
5 указанное антитело или его фрагмент содержит:
- переменную 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
  - 10 – переменную 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).
- 15 2. Антитело против Sema3A или его антигенсвязывающий фрагмент для применения по п. 1, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит:
- переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по  
20 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
  - переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по  
25 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.
- 30 3. Антитело против Sema3A или его антигенсвязывающий фрагмент для применения по п. 1, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит:
- переменную 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 лёгкой 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:

- 10 – 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 лёгкой 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 для применения по п. 1, где 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
- 25 – вариабельную область лёгкой 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 для применения по п. 1, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит:

- а. вариабельную область тяжелой цепи и вариабельную область лёгкой цепи, содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 7 и SEQ ID NO: 11, соответственно;

b. вариабельную область тяжелой цепи и вариабельную область лёгкой цепи, содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 8 и SEQ ID NO: 11, соответственно;

5 c. вариабельную область тяжелой цепи и вариабельную область лёгкой цепи, содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 9 и SEQ ID NO: 12, соответственно; или

d. вариабельную область тяжелой цепи и вариабельную область лёгкой цепи, содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 10 и SEQ ID NO: 13, соответственно.

10

**6.** Антитело против Sema3A или его антигенсвязывающий фрагмент для применения по п. 1, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит:

15 – тяжелую цепь, содержащую, предпочтительно состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, 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.

20 **7.** Антитело против Sema3A или его антигенсвязывающий фрагмент для применения по п. 1, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит:

25 a. тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14, и лёгкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15;

b. тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16, и лёгкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15;

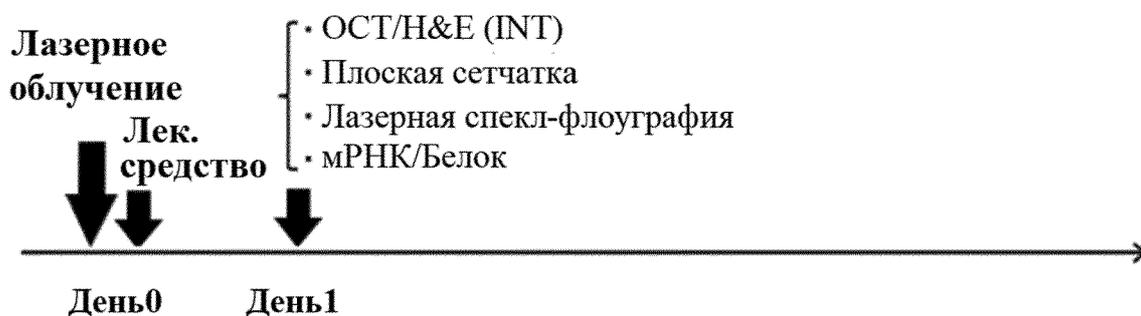
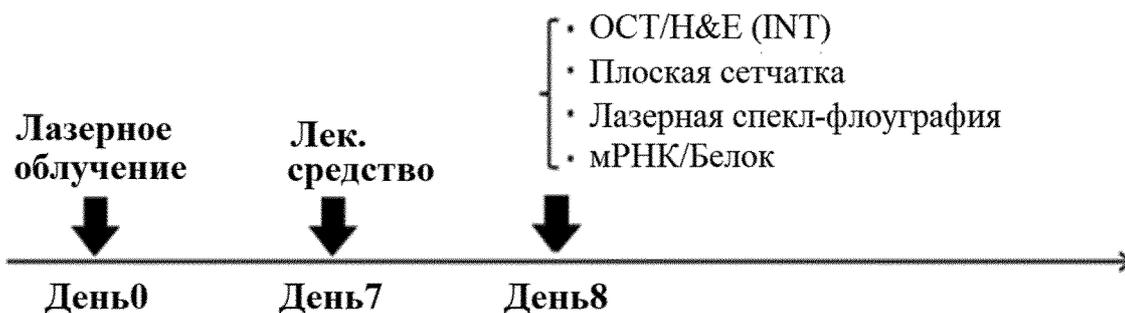
30 c. тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17, и лёгкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18; или

d. тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19, и лёгкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20.

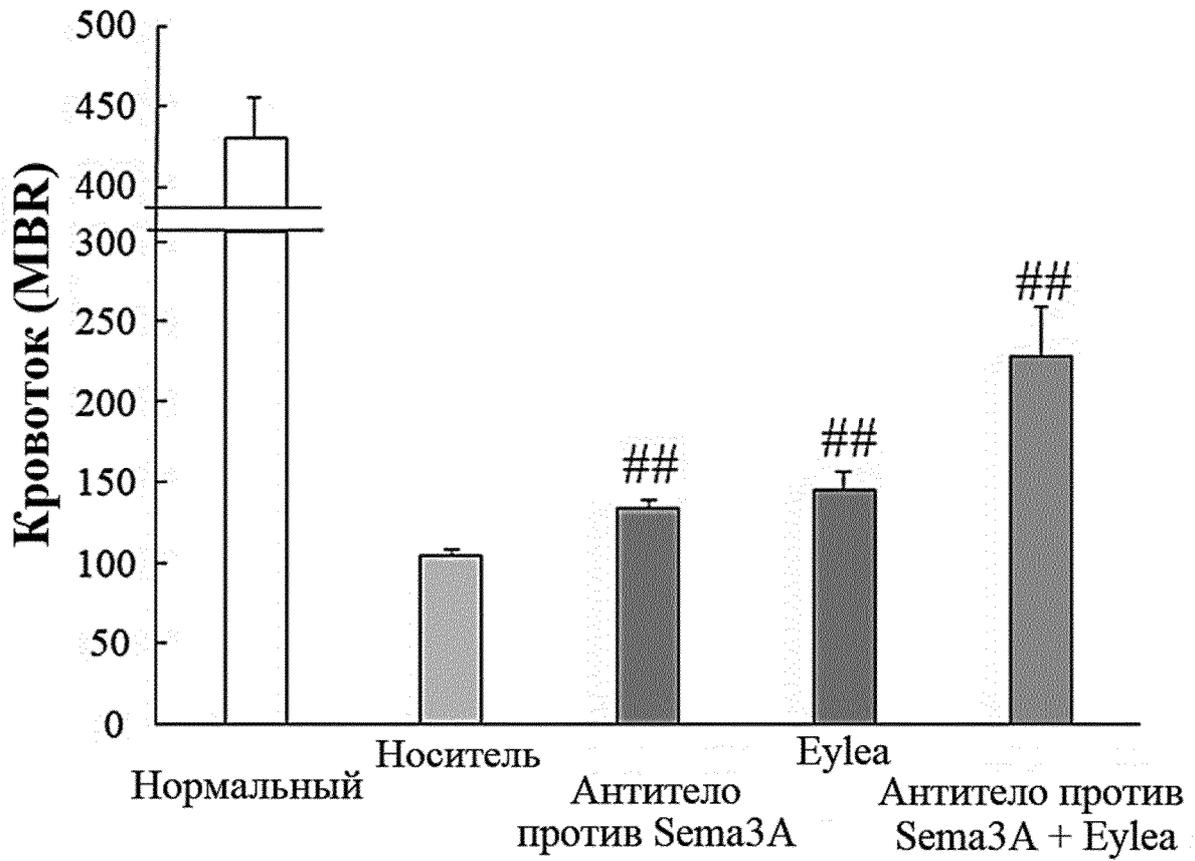
8. Антитело против Sema3A или его антигенсвязывающий фрагмент для применения по любому из п.п. 1 – 7, где указанное тромботическое заболевание сетчатки выбирают из группы, состоящей из окклюзии вен сетчатки (RVO),  
5 включая окклюзию центральной вены сетчатки (CRVO), окклюзию вен полушарий сетчатки (HRVO), окклюзию ветвей вен сетчатки (BRVO), и окклюзионного заболевания артерий сетчатки.
9. Антитело против Sema3A или его антигенсвязывающий фрагмент для применения в лечении тромботического заболевания сетчатки, где указанное антитело или его фрагмент связывается по меньшей мере с одним  
10 аминокислотным остатком в пределах аминокислотных областей 370-382 Sema3A человека, как представлено в SEQ ID NO: 22.
10. Антитело против Sema3A или его антигенсвязывающий фрагмент для применения по п. 8, где указанное антитело или его фрагмент связывается с SEQ  
15 ID NO: 21.
11. Антитело против Sema3A или его антигенсвязывающий фрагмент для применения по любому из п.п. 1 - 10 у пациента, страдающего от диабетической  
20 макулярной ишемии, способствуя регенерации сосудов в ишемизированной сетчатке (реваскуляризация) и предотвращая патологическую неоваскуляризацию области стекловидного тела глаза.
12. Антитело против Sema3A или его антигенсвязывающий фрагмент для применения по любому из п.п. 1 - 10 у пациента, страдающего от диабетического  
25 макулярного отёка, путем снижения проницаемости гемато-ретиального барьера.
13. Фармацевтическая композиция, содержащая антитело или его  
30 антигенсвязывающий фрагмент по любому из п.п. 1 - 12 и фармацевтически приемлемый носитель для применения в лечении тромботического заболевания сетчатки, выбранного из группы, состоящей из окклюзии центральной вены

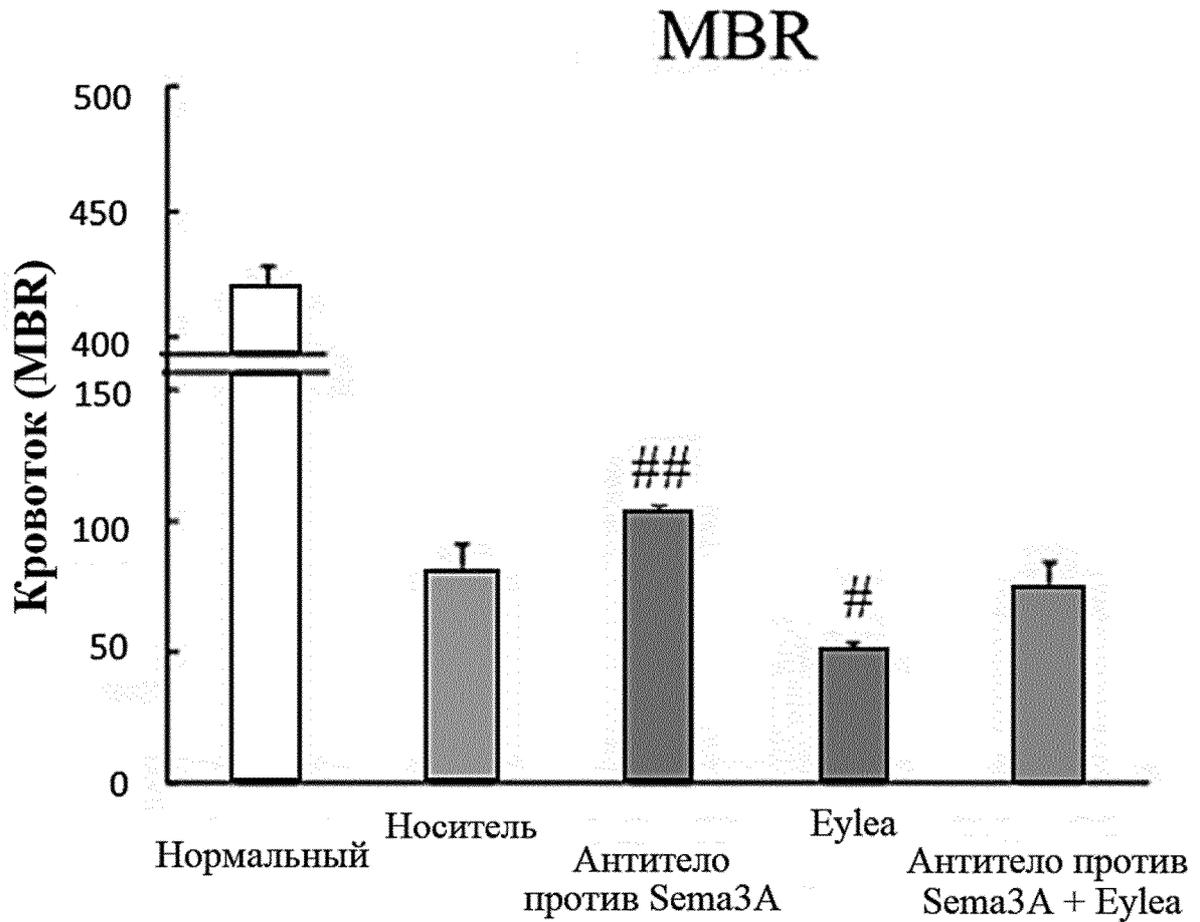
сетчатки (CRVO), окклюзии ветвей вен сетчатки (BRVO) и окклюзионного заболевания артерий сетчатки.

- 5 **14.** Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент для применения по любому из п.п. **1 - 12** или фармацевтическая композиция для применения по п. **13**, в которой указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент вводят парентеральным путем, внутривенным путем, интравитреальным путем или подкожным путем.
- 10 **15.** Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из п.п. **1 - 12** или фармацевтическая композиция для применения по п. **13**, в которой указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент вводят интравитреальным путем.

**Исследование 1. Введение в ранней фазе после лазерного облучения****Исследование 2. Введения в поздней фазе после лазерного облучения****ФИГУРА 1**

## MBR

ФИГУРА 2А



**ФИГУРА 2В**