

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 821 814**

51 Int. Cl.:

**A61K 39/395** (2006.01)

**A61K 39/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **10.10.2014 PCT/US2014/060129**

87 Fecha y número de publicación internacional: **16.04.2015 WO15054628**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.10.2014 E 14853023 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.07.2020 EP 3054976**

54 Título: **Uso de moléculas de unión a semaforina-4D para el tratamiento de la aterosclerosis**

30 Prioridad:

**10.10.2013 US 201361889421 P**

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

**27.04.2021**

73 Titular/es:

**VACCINEX, INC. (100.0%)  
1895 Mt. Hope Avenue  
Rochester, NY 14620, US**

72 Inventor/es:

**ZAUDERER, MAURICE**

74 Agente/Representante:

**LEHMANN NOVO, María Isabel**

ES 2 821 814 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Uso de moléculas de unión a semaforina-4D para el tratamiento de la aterosclerosis

## 5 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La semaforina 4D (SEMA4D), también conocida como CD100, es una proteína transmembrana (por ejemplo, SEQ ID NO: 1 (humana); SEQ ID NO: 2 (murina)) que pertenece a la clase IV de la familia génica de la semaforinas. SEMA4D se expresa en la superficie celular como un homodímero, pero tras la activación celular, SEMA4D puede liberarse de la superficie celular mediante escisión proteolítica para generar sSEMA4D, una forma soluble de la proteína, que también tiene actividad biológica. Véase Suzuki *et al.*, *Nature Rev. Immunol.* 3:159-167 (2003); Kikutani *et al.*, *Nature Immunol.* 9:17-23 (2008).

SEMA4D tiene un nivel elevado de expresión en los órganos linfoides, incluidos el bazo, el timo y los ganglios linfáticos, y en los órganos no linfoides, tales como el cerebro, el corazón y los riñones. En los órganos linfoides, SEMA4D se expresa abundantemente en los linfocitos T en reposo, pero solo se expresa débilmente en los linfocitos B en reposo y en las células presentadoras de antígeno (APC, por sus siglas en inglés), tales como las células dendríticas (DC, por sus siglas en inglés). Sin embargo, su expresión presenta un aumento regulado en estas células después de la activación por diversos estímulos inmunológicos. La liberación de SEMA4D soluble de las células inmunitarias también aumenta por la activación celular.

La aterosclerosis ha sido reconocida como una enfermedad inflamatoria en la cual las células inmunitarias desempeñan funciones cruciales durante la evolución de la enfermedad (Hansson GK *et al.*, *Nat Rev Immunol* 6: 508-519, 2006). Los macrófagos expresan moléculas CD40 y los linfocitos T tienen el ligando de CD40 (CD40L o CD154) en sus superficies celulares (Mach F *et al.*, *Circulation* 96: 396-399, 1997; y Mach F *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 1931-36, 1997). La unión de CD40 con CD40L en células inmunitarias en el interior de las placas induce la secreción de proteasas y mediadores proinflamatorios, lo que expande la activación inflamatoria (Mach F *et al.*, *Circulation* 96: 396-399, 1997). El bloqueo de la unión de CD40 o la desactivación del gen CD40L puede retrasar el desarrollo de la placa aterosclerótica en ratones propensos a la aterosclerosis (Mach F *et al.*, *Nature* 394: 200-203, 1998; y Lutgens E *et al.*, *Nat Med* 11: 1313-1316, 1999). Se ha publicado que la unión de CD40 en las células inmunitarias con anticuerpos estimulantes anti-CD40 induce la expresión de Sema4D (CD100) (Kumanogoh A *et al.*, *Immunity* 13: 621-31, 2000).

Se ha implicado SEMA4D en varios procesos, tales como la mejora de la respuesta inmunitaria, angiogénesis, morfogénesis epitelial y remodelación ósea (Kruger RP *et al.*, *Nat Rev Mol Cell Biol* 6: 789-800, 2005; Pasterkamp R.J., *Nat Rev Neurosci* 13:605-618, 2012; y Kang S *et al.*, *Seminars in Cell & Dev Biol* 24:163-171, 2013). Los linfocitos, macrófagos, células endoteliales y plaquetas en las placas ateroscleróticas expresan plexina-B1 en su superficie de la membrana, un receptor con mucha afinidad por Sema4D (Basile JR *et al.*, *Mol Cell Biol* 25: 6889-6898, 2005; Delaire S *et al.*, *J Immunol* 166: 4348-4354, 2001; y Chabbert-de Ponnat I *et al.*, *Int Immunol* 17: 439-447, 2005). Sema4D expresada por los linfocitos T o liberado de la membrana de los linfocitos T puede, por lo tanto, tener ciertos efectos en las células ubicadas en las placas ateroscleróticas (Basile JR *et al.*, *Mol. Cell Biol* 25: 6889-6898, 2005; Delaire S *et al.*, *J Immunol* 166: 4348-4354, 2001; y Chabbert-de Ponnat I *et al.*, *Int Immunol* 17: 439-447, 2005). Estudios previos revelaron actividad proangiogénica de Sema4D en las células endoteliales *in vitro* e *in vivo* (Conrotto P *et al.*, *Blood* 105: 4321-4329, 2005; y Basil JR *et al.*, *Cancer Res* 64: 5212-5224, 2004). Además, se observó un nivel elevado de expresión de Sema4D en varios carcinomas de células escamosas, lo que sugiere una función crucial de Sema4D en la angiogénesis inducida por tumores *in vivo* (Basile JR *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 9017-9022, 2006.). Por lo tanto, Sema4D puede afectar el crecimiento de la placa, por ejemplo, promoviendo el proceso de neovascularización que ocurre en el ateroma. De hecho, un estudio reveló que la eliminación del gen Sema4D en ratones con deficiencia de ApoE (ApoE <sup>-/-</sup>) propensos a la aterosclerosis retrasó el crecimiento de placas ateroscleróticas y la neovascularización en el área de la placa, lo que sugiere que el bloqueo de la señal de Sema4D durante la fase de progresión de la aterosclerosis puede prevenir la neovascularización y el crecimiento de placas (Yukawa K *et al.*, *Int. J Mol. Med.* 26: 39-44, 2010).

El documento US 2010/040617 A1 se refiere a un método para inhibir en un paciente la activación de plaquetas en el sistema cardiovascular de un paciente, comprendiendo el método: administrar una cantidad eficaz de un inhibidor de SEMA4D/CD100 al paciente o a las células del paciente, suficiente para inhibir la activación de plaquetas; e inhibir de esta manera la elevación o aumento de la activación de plaquetas.

Zhu *et al.*, *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*, vol. 29 (7), 2009, 1039-1045 notifica que la pérdida de expresión de sema4D reduce la hiperactividad plaquetaria por lo demás encontrada en la dislipidemia y confiere protección contra el desarrollo de la aterosclerosis.

## COMPENDIO BREVE DE LA INVENCION

65 El objeto de la invención está definido por las reivindicaciones adjuntas.

La presente invención se refiere a una cantidad eficaz de un anticuerpo aislado o fragmento de unión al antígeno de este que se une específicamente a la Semaforina-4D (SEMA4D) para su uso en un tratamiento para inhibir, suprimir, reducir o retrasar el crecimiento de placas ateroscleróticas en un sujeto que padece aterosclerosis, donde el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este comprende una cadena pesada variable (VH) que comprende las CDR 1-3 de VH que comprenden las SEQ ID NOs 6, 7 y 8, respectivamente, y una cadena ligera variable (VL) que comprende las CDR 1-3 de VL que comprenden las SEQ ID NO 14, 15 y 16, respectivamente.

En una realización, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este puede inhibir, retrasar o reducir la neovascularización alrededor de las placas ateroscleróticas en un sujeto.

En una realización, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este inhibe la interacción de SEMA4D con su receptor. En una realización, el receptor es Plexina-B1, Plexina-B2 o CD72.

En una realización, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este inhibe la transducción de la señal de la Plexina-B1 mediada por SEMA4D.

En una realización, el sujeto padece una enfermedad cardiovascular. En una realización, la enfermedad cardiovascular se selecciona del grupo constituido por cardiopatía coronaria, cardiopatía isquémica, arteriopatía coronaria, cardiomiopatía, cardiopatía hipertensiva, insuficiencia cardíaca, cardiopatía pulmonar, disritmias cardíacas, endocarditis cardiopatía inflamatoria, cardiomegalia inflamatoria, miocarditis, cardiopatía valvular, enfermedad cerebrovascular, arteriopatía periférica, cardiopatía congénita, cardiopatía reumática y una combinación de estas.

En una realización, la VH y VL comprenden, respectivamente, la SEQ ID NO: 9 y la SEQ ID NO: 17.

En una realización, la VH y VL comprenden, respectivamente, la SEQ ID NO: 10 y la SEQ ID NO: 18.

En la presente se divulgan métodos para utilizar moléculas de unión a la semaforina 4D para el tratamiento de la aterosclerosis. De acuerdo con los aspectos ilustrados en la presente, se divulga un método para reducir, inhibir, suprimir y/o retrasar la formación de placas ateroscleróticas en un sujeto que padece aterosclerosis, que incluye administrar al sujeto una cantidad eficaz de una molécula de unión aislada que se une y bloquea específicamente la actividad de la semaforina 4D (SEMA4D). En ciertas realizaciones, se divulgan métodos para inhibir, suprimir, reducir o retrasar el crecimiento de placas ateroscleróticas en un sujeto que padece aterosclerosis, que comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz de una molécula de unión aislada que se une específicamente a Semaforina-4D (SEMA4D). En ciertas realizaciones, la molécula de unión inhibe la interacción de SEMA4D con su receptor. En ciertas realizaciones, el receptor es Plexina-B1 o Plexina-B2. En ciertas realizaciones, la molécula de unión inhibe la transducción de señales de Plexina-B1 mediada por SEMA4D. En ciertas realizaciones de los métodos mencionados anteriormente, el sujeto padece una enfermedad cardiovascular. En ciertas realizaciones, la enfermedad cardiovascular se selecciona del grupo constituido por cardiopatía coronaria (también cardiopatía isquémica o arteriopatía coronaria), cardiomiopatía, cardiopatía hipertensiva, insuficiencia cardíaca, cardiopatía pulmonar, disritmias cardíacas, endocarditis cardiopatía inflamatoria, cardiomegalia inflamatoria, miocarditis, cardiopatía valvular, enfermedad cerebrovascular, arteriopatía periférica, cardiopatía congénita, cardiopatía reumática y una combinación de estas. En ciertas realizaciones de cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, la molécula de unión aislada se une específicamente al mismo epítopo de SEMA4D que un anticuerpo monoclonal de referencia VX15/2503 o 67. En ciertas realizaciones de cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, la molécula de unión aislada inhibe de manera competitiva la unión específica de un anticuerpo monoclonal de referencia VX15/2503 o 67 a SEMA4D. En ciertas realizaciones de cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, la molécula de unión aislada comprende un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este. En ciertas realizaciones de cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este comprende una cadena pesada variable (VH) que comprende las CDR 1-3 de VH que comprenden las SEQ ID NO 6, 7 y 8, respectivamente, y una cadena ligera variable (VL) que comprende las CDR 1-3 de VL que comprenden las SEQ ID NO 14, 15 y 16, respectivamente. En ciertas realizaciones de cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, la VH y el VL comprenden, respectivamente, la SEQ ID NO: 9 y la SEQ ID NO: 17 o SEQ ID NO: 10 y la SEQ ID NO: 18. En ciertas realizaciones de cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, el método incluye además inhibir, retrasar, reducir o retrasar la neovascularización alrededor de las placas ateroscleróticas.

También se divulgan métodos para inhibir, retrasar, reducir o retrasar la neovascularización en un sujeto que padece aterosclerosis, que comprenden administrar al sujeto una cantidad eficaz de una molécula de unión aislada que se une específicamente a la Semaforina-4D (SEMA4D). En ciertas realizaciones, la molécula de unión inhibe la interacción de SEMA4D con su receptor. En ciertas realizaciones, el receptor es Plexina-B1. En ciertas realizaciones, la molécula de unión inhibe la transducción de señales de Plexina-B1 mediada por SEMA4D. En ciertas realizaciones de cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, el sujeto padece una enfermedad cardiovascular. En ciertas realizaciones, la enfermedad cardiovascular se selecciona del grupo constituido por cardiopatía coronaria (también cardiopatía isquémica o arteriopatía coronaria), cardiomiopatía, cardiopatía hipertensiva, insuficiencia cardíaca, cardiopatía pulmonar, disritmias cardíacas, endocarditis cardiopatía inflamatoria, cardiomegalia inflamatoria, miocarditis, cardiopatía valvular, enfermedad cerebrovascular, arteriopatía periférica, cardiopatía congénita, cardiopatía reumática y una combinación de estas. En ciertas realizaciones de cualquiera de los métodos mencionados

anteriormente, la molécula de unión aislada se une específicamente al mismo epítipo de SEMA4D que un anticuerpo monoclonal de referencia VX15/2503 o 67. En ciertas realizaciones de cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, la molécula de unión aislada inhibe de manera competitiva la unión específica de un anticuerpo monoclonal de referencia VX15/2503 o 67 a SEMA4D. En ciertas realizaciones de cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, la molécula de unión aislada comprende un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este. En ciertas realizaciones de cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este comprende una cadena pesada variable (VH) que comprende las CDR 1-3 de VH que comprenden las SEQ ID NO 6, 7 y 8, respectivamente, y una cadena ligera variable (VL) que comprende las CDR 1-3 de VL que comprenden las SEQ ID NO 14, 15 y 16, respectivamente. En ciertas realizaciones de cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, la VH y el VL comprenden, respectivamente, la SEQ ID NO: 9 y la SEQ ID NO: 17 o SEQ ID NO: 10 y la SEQ ID NO: 18.

También se divulgan métodos para tratar a un sujeto que padece aterosclerosis comprenden: administrar a un sujeto del que se ha determinado que tiene placas ateroscleróticas una cantidad eficaz de una molécula de unión aislada que se une específicamente a la Semaforina-4D (SEMA4D), para de esa manera inhibir, retrasar, reducir o retrasar el crecimiento de placas ateroscleróticas. En ciertas realizaciones, se proporciona la determinación mediante el análisis de una imagen o una muestra del paciente. En ciertas realizaciones de cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, se determina que el paciente tiene placas ateroscleróticas y se trata si el número, tamaño o características de las placas ateroscleróticas en el paciente están por encima de un número, tamaño o carácter umbral predeterminados. En ciertas realizaciones de cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, se determina que el paciente tiene placas ateroscleróticas y se trata si el número, tamaño o carácter de las placas ateroscleróticas en el paciente es indicativo de aterosclerosis cuando se compara con una o más muestras de control. En ciertas realizaciones de cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, se determina que el paciente tiene placas ateroscleróticas y se trata si el nivel de CRP y/o LDL en la muestra está por encima de un valor umbral predeterminado, está elevado en relación con una muestra de control o es indicativo por lo demás de placas ateroscleróticas. En ciertas realizaciones de cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, se determina que el paciente tiene placas ateroscleróticas y se trata si las imágenes obtenidas determinan que el número, tamaño o carácter de las placas ateroscleróticas están por encima de un valor umbral predeterminado, están elevados en relación con una muestra de control o son indicativos por lo demás de placas ateroscleróticas. En ciertas realizaciones de los métodos, la obtención de imágenes puede comprender la angiografía coronaria, ecografía intravascular (IVUS, por sus siglas en inglés), ecografía de la carótida, tomografía computarizada coronaria (CT, por sus siglas en inglés), obtención de imágenes por resonancia magnética (MRI, por sus siglas en inglés), tomografía por emisión de positrones (PET, por sus siglas en inglés), tomografía de coherencia óptica (OCT, por sus siglas en inglés), espectroscopía de infrarrojo cercano (NIRS, por sus siglas en inglés) y NIR fluorescente. En ciertas realizaciones de cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, se determina que el paciente tiene placas ateroscleróticas y se trata si se determina que el paciente tiene una o más placas ateroscleróticas vulnerables. En ciertas realizaciones de cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, la molécula de unión aislada se une específicamente al mismo epítipo de SEMA4D que un anticuerpo monoclonal de referencia VX15/2503 o 67. En ciertas realizaciones de cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, la molécula de unión aislada inhibe de manera competitiva la unión específica de un anticuerpo monoclonal de referencia VX15/2503 o 67 a SEMA4D. En ciertas realizaciones de cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, la molécula de unión aislada comprende un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este. En ciertas realizaciones de cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este comprende una cadena pesada variable (VH) que comprende las CDR 1-3 de VH que comprenden las SEQ ID NO 6, 7 y 8, respectivamente, y una cadena ligera variable (VL) que comprende las CDR 1-3 de VL que comprenden las SEQ ID NO 14, 15 y 16, respectivamente. En ciertas realizaciones de cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, la VH y el VL comprenden, respectivamente, la SEQ ID NO: 9 y la SEQ ID NO: 17 o la SEQ ID NO: 10 y la SEQ ID NO: 18.

De acuerdo con los aspectos ilustrados en la presente, se divulga un método para reducir la neovascularización en un sujeto que padece aterosclerosis, que incluye administrar al sujeto una cantidad eficaz de una molécula de unión aislada que se une de manera específica a la semaforina 4D (SEMA4D).

#### DESCRIPCIÓN BREVE DE LOS DIBUJOS/FIGURAS

FIGURAS 1A: Inhibición del desarrollo de placas ateroscleróticas en ratones con deficiencia de ApoE y con hiperlipidemia espontánea (SHL, por sus siglas en inglés) tratados con un anticuerpo anti-Sema4D. La FIG. 1A muestra una medida cuantitativa del área sudanófila en los depósitos de lípidos del desarrollo de placas ateroscleróticas en ratones SHL tratados con un anticuerpo anti-SEMA4D o control de isotipo durante 12 semanas comenzando a las 14 semanas de edad.

FIGURAS 1B y 1C: Reducción de la neovascularización en placas de ratones SHL tratados con un anticuerpo anti-Sema4D. La FIG. 1B muestra la neovascularización visualizada mediante la medición cuantitativa de isolectina B4 que tiñe las células endoteliales en placas de ratones SHL tratados con un anticuerpo anti-Sema4D y ratones SHL tratados con anticuerpo de control. La FIG. 1C muestra las células endoteliales en placas de ratones SHL tratados con un anticuerpo anti-Sema4D y ratones SHL tratados con anticuerpo de control visualizadas con inmunohistoquímica utilizando anticuerpos para CD31.

## DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCÓN

## I. Definiciones

- 5 Cabe señalar que el término «una» entidad se refiere a uno o más de esa entidad; por ejemplo, se entiende que «un anticuerpo anti-SEMA4D» representa uno o más anticuerpos anti-SEMA4D. Como tal, los términos «uno» (o «un»), «uno o más» y «al menos uno» se pueden utilizar indistintamente en la presente.
- 10 Tal como se utiliza en la presente, el término «aterosclerosis» se refiere a la alteración de las arterias principales que subyace a la mayoría de arteriopatía coronaria, aneurisma de aorta y arteriopatía de las extremidades inferiores, y también desempeña una función importante en la enfermedad cerebrovascular. La aterosclerosis es la causa principal de muerte en los Estados Unidos, tanto por encima como por debajo de los 65 años de edad en ambos sexos. E.L. Bierman, «Atherosclerosis and Other Forms of Arteriosclerosis», cap. 208, págs. 1 106 en Harrison's Principles of Internal Medicine. 13.<sup>a</sup> edición, eds. K.J. Isselbacher, *et al.* (McGraw-Hill, Inc. NY 1994). La aterosclerosis puede afectar a cualquier arteria del cuerpo, incluidas arterias del corazón, cerebro, brazo, piernas, pelvis y riñones. La aterosclerosis está caracterizada por la infiltración de colesterol y aparición de macrófagos espumosos en las lesiones de la pared arterial. Después de esto se produce una secuencia compleja de cambios que implica a las plaquetas, macrófagos, células del músculo liso y factores de crecimiento que produce lesiones proliferativas. Estas alteran a los vasos y los hacen rígidos. En individuos con niveles de colesterol plasmático elevados, hay una mayor incidencia de aterosclerosis y sus complicaciones. W.F. Ganong, Review of Medical Physiology, 17.<sup>a</sup> edición, pág. 281 (Appleton & Lange Norwalk, CT 1995).
- 25 Tal como se utiliza en la presente, el término «neovascularización» o «angiogénesis» se refiere a la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de los vasos existentes. La neovascularización está presente, por ejemplo, en el desarrollo de la degeneración macular, tumores, cáncer y aterosclerosis.
- 30 Tal como se utiliza en la presente, la expresión «trastorno inflamatorio» o «enfermedad inflamatoria» se refiere a una enfermedad que está caracterizada por la inflamación y está acompañada normalmente por enrojecimiento, hinchazón y dolor. La inflamación puede dar lugar a un conjunto de otras enfermedades, incluidas, sin carácter limitante, enfermedad cardiovascular, artritis reumatoide, enfermedad gastroenterológica, enfermedades neuroinflamatorias (por ejemplo, esclerosis múltiple) e incluso cáncer (por ejemplo, carcinoma de vesícula biliar).
- 35 Tal como se utiliza en la presente, la expresión «enfermedad cardiovascular» se refiere a enfermedades que afectan al corazón, los vasos sanguíneos (arterias, capilares y venas) o ambos. Los ejemplos de enfermedades cardiovasculares incluyen, sin carácter limitante, la cardiopatía coronaria (también cardiopatía isquémica o arteriopatía coronaria), cardiomiopatía, cardiopatía hipertensiva, insuficiencia cardíaca, cardiopatía pulmonar, disritmias cardíacas, endocarditis, cardiopatía inflamatoria, cardiomegalia inflamatoria, miocarditis, cardiopatía valvular, enfermedad cerebrovascular, arteriopatía periférica, cardiopatía congénita y cardiopatía reumática.
- 40 La expresión «cantidad terapéuticamente eficaz» se refiere a una cantidad de un anticuerpo, polipéptido, polinucleótido, molécula de bajo peso molecular u otro fármaco eficaz para «tratar» una enfermedad o trastorno en un sujeto o mamífero. En el caso de una aterosclerosis, la cantidad terapéuticamente eficaz del fármaco puede retrasar la formación de placas ateroscleróticas; reducir, retardar o detener un incremento en la formación de nuevas placas ateroscleróticas; reducir, suprimir o detener la inflamación; inhibir, por ejemplo, suprimir, retardar, prevenir, detener o revertir la neovascularización en las placas ateroscleróticas o en su proximidad; cambiar la morfología o función de las placas ateroscleróticas; o aliviar, en cierta medida, uno o más síntomas asociados con la aterosclerosis; reducir la morbimortalidad; mejorar la calidad de vida; o cualquier combinación de tales efectos.
- 45
- 50 Términos y expresiones tales como «que trata» o «tratamiento» o «tratar» o «que alivia» o «alivio» o «aliviar» se refieren a 1) medidas terapéuticas que curan, ralentizan, disminuyen los síntomas de, invierten y/o detienen la evolución de un trastorno o afección patológica diagnosticados y 2) medidas profilácticas o preventivas que previenen y/o ralentizan el desarrollo de un trastorno o afección patológica diana. Por lo tanto, aquellos que necesiten tratamiento incluyen aquellos que ya padecen el trastorno; aquellos propensos a padecer el trastorno; y aquellos en los que se puede prevenir el trastorno. Los resultados clínicos beneficiosos o deseados incluyen, sin carácter limitante, alivio de los síntomas, disminución de la extensión de la enfermedad, estabilización (es decir, que no haya empeoramiento) de la enfermedad, retraso o ralentización de la evolución de la enfermedad, mejora o alivio del estado patológico, remisión (ya sea parcial o total), ya sea detectable o indetectable o cualquier combinación de estos. El «tratamiento» también puede significar prolongar la supervivencia en comparación con la supervivencia esperada si no se recibe tratamiento.
- 55
- 60 Aquellos que necesiten tratamiento incluyen aquellos que ya padecen la afección o trastorno, así como también aquellos propensos a padecer la afección o trastorno o aquellos en los que se puede prevenir la afección o trastorno.
- 65 «Sujeto» o «individuo» o «animal» o «paciente» o «mamífero» se refiere a cualquier sujeto, especialmente un sujeto mamífero, para el que se desea diagnóstico, pronóstico o terapia. Los sujetos mamíferos incluyen seres humanos, animales domésticos, animales de granja y animales de zoo, deportes o mascotas tales como perros, gatos, cobayas, conejos, ratas, ratones, caballos, ganado, vacas, osos y así sucesivamente.

Tal como se utilizan en la presente, frases tales como «un sujeto que se beneficiaría de la administración de un anticuerpo anti-SEMA4D» y un «animal que necesita tratamiento» incluyen sujetos, tales como sujetos mamíferos, que se beneficiarían de la administración de un anticuerpo anti-SEMA4D u otra molécula de unión a SEMA4D, por ejemplo, para la detección de un polipéptido de SEMA4D (por ejemplo, para un procedimiento diagnóstico) y/o del tratamiento, es decir, alivio o prevención de una enfermedad, con un anticuerpo anti-SEMA4D u otra molécula de unión a SEMA4D.

Una «molécula de unión» o «molécula de unión al antígeno» se refiere en su sentido más amplio a una molécula que se une específicamente a un determinante antigénico. En una realización, la molécula de unión se une específicamente a SEMA4D, por ejemplo, a un polipéptido SEMA4D transmembrana de aproximadamente 150 kDa o un polipéptido de SEMA4D soluble de aproximadamente 120 kDa (denominado habitualmente sSEMA4D). En otra realización, una molécula de unión es un anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno de este. En otra realización, una molécula de unión comprende al menos una CDR de cadena pesada o ligera de una molécula de anticuerpo. En otra realización, una molécula de unión comprende al menos dos CDR de una o más moléculas de anticuerpo. En otra realización, una molécula de unión comprende al menos tres CDR de una o más moléculas de anticuerpo. En otra realización, una molécula de unión comprende al menos cuatro CDR de una o más moléculas de anticuerpo. En otra realización, una molécula de unión comprende al menos cinco CDR de una o más moléculas de anticuerpo. En otra realización, una molécula de unión comprende al menos seis CDR de una o más moléculas de anticuerpo.

La presente divulgación se refiere a un método para tratar aterosclerosis, que comprende administrar al sujeto una molécula de unión anti-SEMA4D, por ejemplo, un anticuerpo, o fragmento de unión al antígeno, variante o derivado de este. A menos que se refiera específicamente a anticuerpos completos tales como anticuerpos de origen natural, la expresión «anticuerpo anti-SEMA4D» engloba anticuerpos completos, así como también fragmentos de unión al antígeno, variantes, análogos o derivados de tales anticuerpos, por ejemplo, moléculas de inmunoglobulina o anticuerpo de origen natural o moléculas de anticuerpo modificadas o fragmentos que se unen al antígeno de manera similar que las moléculas de anticuerpo.

Tal como se utiliza en la presente, los anticuerpos «humanos» o «totalmente humanos» incluyen anticuerpos que tienen la secuencia de aminoácidos de una inmunoglobulina humana e incluyen anticuerpos aislados de colecciones de inmunoglobulinas humanas o de animales transgénicos para una o más inmunoglobulinas humanas, como se ha descrito anteriormente y, por ejemplo, en la patente de EE. UU. N.º 5 939 598 de Kucherlapati *et al.* Los anticuerpos «humanos» o «totalmente humanos» también incluyen anticuerpos que comprenden al menos el dominio variable de una cadena pesada, o al menos los dominios variables de una cadena pesada y una cadena ligera, donde el (los) dominio(s) variable(s) tiene(n) la secuencia de aminoácidos de dominio(s) variable(s) de inmunoglobulina humana o son anticuerpos humanizados.

Los anticuerpos «humanos» o «totalmente humanos» también incluyen anticuerpos «humanos» o «totalmente humanos», como se ha descrito anteriormente, que comprenden, están constituidos esencialmente por, o están constituidos por, variantes (incluidos derivados) de moléculas de anticuerpo (por ejemplo, las regiones VH y/o regiones VL) descritas en la presente, donde los anticuerpos o fragmentos de estos se unen de manera inmunoespecífica a un polipéptido de SEMA4D o fragmento o variante de este. Se pueden utilizar técnicas estándar conocidas por los expertos en la técnica para introducir mutaciones en la secuencia de nucleótidos que codifica un anticuerpo anti-SEMA4D humano, incluidas, sin carácter limitante, mutagénesis dirigida al sitio y mutagénesis mediada por PCR que dan como resultado sustituciones de aminoácidos. En algunos aspectos, las variantes (incluidos derivados) codifican menos de 50 sustituciones de aminoácidos, menos de 40 sustituciones de aminoácidos, menos de 30 sustituciones de aminoácidos, menos de 25 sustituciones de aminoácidos, menos de 20 sustituciones de aminoácidos, menos de 15 sustituciones de aminoácidos, menos de 10 sustituciones de aminoácidos, menos de 5 sustituciones de aminoácidos, menos de 4 sustituciones de aminoácidos, menos de 3 sustituciones de aminoácidos o menos de 2 sustituciones de aminoácidos respecto a la región VH, CDR1 de VH, CDR2 de VH, CDR3 de VL, región VL, CDR1 de VL, CDR2 de VL o CDR3 de VL de referencia.

En ciertas realizaciones, las sustituciones de aminoácidos son sustituciones conservadoras de aminoácidos, analizadas adicionalmente más adelante. Como alternativa, las mutaciones se pueden introducir de manera aleatoria a lo largo de la totalidad o de parte de la secuencia codificante, tal como por mutagénesis de saturación, y con los mutantes resultantes se puede realizar un cribado en función de la actividad biológica para identificar mutantes que mantienen la actividad (por ejemplo, la capacidad de unirse a un polipéptido de SEMA4D, por ejemplo, SEMA4D humana, murina o tanto humana como murina). Tales variantes (o derivados de estos) de anticuerpos «humanos» o «totalmente humanos» también se pueden denominar anticuerpos humanos o totalmente humanos que están «optimizados» u «optimizados para la unión al antígeno» e incluyen anticuerpos que tienen una mejor afinidad por el antígeno.

Los términos «anticuerpo» e «inmunoglobulina» se utilizan indistintamente en la presente. Un anticuerpo o inmunoglobulina comprende al menos el dominio variable de una cadena pesada, y normalmente comprende al menos los dominios variables de una cadena pesada y una cadena ligera. Las estructuras básicas de inmunoglobulina en

sistemas vertebrados se conocen relativamente bien. Véase, por ejemplo, Harlow *et al.* (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual* (2.<sup>a</sup> ed.; Cold Spring Harbor Laboratory Press).

5 Tal como se utiliza en la presente, el término «inmunoglobulina» comprende varias clases amplias de polipéptido que se pueden distinguir desde un punto de vista bioquímico. Los expertos en la técnica apreciarán que las cadenas pesadas se clasifican como gamma, mu, alfa, delta o épsilon ( $\gamma$ ,  $\mu$ ,  $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ) habiendo algunas subclases entre ellas (por ejemplo,  $\gamma 1$ - $\gamma 4$ ). Es la naturaleza de esta cadena la que determina la «clase» del anticuerpo como IgG, IgM, IgA, IgG o IgE, respectivamente. Las subclases de inmunoglobulina (isotipos), por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, etc. están muy bien caracterizadas y se sabe que confieren especialización funcional. El experto en la técnica podrá diferenciar fácilmente las versiones modificadas de cada una de estas clases e isotipos tras leer la presente divulgación. El siguiente análisis se referirá generalmente a la clase IgG de moléculas de inmunoglobulina. Con respecto a la IgG, una molécula de inmunoglobulina estándar comprende dos polipéptidos de la cadena ligera idénticos de un peso molecular de aproximadamente 23 000 Daltons, y dos polipéptidos de la cadena pesada idénticos de un peso molecular de 53 000-70 000. Las cuatro cadenas están unidas típicamente por enlaces disulfuro en una configuración «Y» donde las cadenas ligeras se asocian con las cadenas pesadas al comienzo de la boca de la «Y» y esta asociación se prolonga a lo largo de la región variable.

20 Las cadenas ligeras se clasifican como kappa o lambda ( $\kappa$ ,  $\lambda$ ). Cada clase de cadena pesada se puede unir con una cadena ligera kappa o lambda. En general, las cadenas ligera y pesada están unidas covalentemente entre sí, y las porciones de la «cola» de las dos cadenas pesadas están unidas entre sí mediante uniones disulfuro covalentes o uniones no covalentes cuando se generan las inmunoglobulinas mediante hibridomas, linfocitos B o células hospedadoras modificadas genéticamente. En la cadena pesada, las secuencias de aminoácidos se extienden desde un extremo N en los extremos bifurcados de la configuración Y hasta el extremo C en la parte inferior de cada cadena.

25 Tanto las cadenas ligera como pesada se dividen en regiones de homología estructural y funcional. Los términos «constante» y «variable» se utilizan desde un punto de vista funcional. En este sentido, se apreciará que los dominios variables de las porciones de las cadenas ligera (VL o VK) y pesada (VH) determinan la especificidad y el reconocimiento antigénico. En consecuencia, los dominios constantes de la cadena ligera (CL) y la cadena pesada (CH1, CH2 o CH3) confieren propiedades biológicas importantes tales como secreción, movilidad a través de la placenta, unión al receptor de Fc, unión al complemento y similares. Por convención, la numeración del dominio de la región constante aumenta según se vuelve más distal respecto al sitio de unión al antígeno o extremo amino del anticuerpo. La porción N-terminal es una región variable y la porción C-terminal es una región constante; los dominios CH3 y CL comprenden propiamente el extremo carboxi de la cadena pesada y ligera, respectivamente.

35 Como se ha indicado anteriormente, la región variable permite que el anticuerpo reconozca de manera selectiva los epítopos de los antígenos y se una a ellos de manera específica. Es decir, el dominio VL y dominio VH, o subconjunto de las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) dentro de estos dominios variables, de un anticuerpo se combinan para formar la región variable que define un sitio de unión al antígeno tridimensional. La estructura cuaternaria del anticuerpo forma el sitio de unión al antígeno presente en el extremo de cada brazo de la Y. Más específicamente, el sitio de unión al antígeno está definido por tres CDR en cada una de las cadenas VH y VL. En algunos casos, por ejemplo, ciertas moléculas de inmunoglobulina derivadas de especies de camélido o modificadas basándose en inmunoglobulinas de camélido, una molécula de inmunoglobulina completa puede estar constituida por cadenas pesadas solo, sin cadenas ligeras. Véase, por ejemplo, Hamers-Casterman *et al.*, *Nature* 363:446-448 (1993).

45 En anticuerpos de origen natural, las seis «regiones determinantes de la complementariedad» o «CDR» presentes en cada dominio de unión al antígeno son secuencias de aminoácidos cortas, no contiguas que se ubican específicamente para formar el dominio de unión al antígeno según asume el anticuerpo su configuración tridimensional en un entorno acuoso. El resto de los aminoácidos en los dominios de unión al antígeno, denominados regiones de «armazón», muestran menos variabilidad intermolecular. Las regiones de armazón adoptan en su mayor parte una conformación de lámina  $\beta$  y las CDR forman bucles que conectan, y en algunos casos forman parte de ella, la estructura de la lámina  $\beta$ . Por lo tanto, las regiones de armazón actúan para formar un esqueleto que permite la ubicación de las CDR en la orientación correcta, mediante interacciones no covalentes intercatenarias. El dominio de unión al antígeno formado por las CDR ubicadas define una superficie complementaria al epítipo en el antígeno inmunorreactivo. Esta superficie complementaria promueve la unión no covalente del anticuerpo a su epítipo afín. Los aminoácidos que comprenden las CDR y las regiones de armazón, respectivamente, pueden ser identificados fácilmente para cualquier dominio variable concreto de la cadena pesada o ligera por un experto en la técnica, y que se han definido con exactitud (véase más adelante).

60 En caso de que haya dos o más definiciones de un término que se utilizan y/o aceptan en la técnica, la definición del término tal como se utiliza en la presente pretende incluir la totalidad de tales significados a menos que se afirme explícitamente lo contrario. Un ejemplo específico es el uso de la expresión «región determinante de la complementariedad» («CDR») para describir los sitios de combinación con el antígeno no contiguos detectados dentro de la región variable de ambos polipéptidos de la cadena pesada y ligera. Esta región particular ha sido descrita por Kabat *et al.* (1983) Depto. de Salud y Servicios Humanos de EE. UU., «Sequences of Proteins of Immunological Interest» y por Chothia y Lesk, *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987), donde las definiciones incluyen el solapamiento o subconjuntos de residuos de aminoácidos cuando se comparan entre sí. No obstante, se pretende que la aplicación

de cualquiera de las definiciones para referirse a una CDR de un anticuerpo o variantes de este esté comprendida por el alcance del término como se define y utiliza en la presente. Los residuos aminoacídicos apropiados que engloban las CDR según están definidas por cada una de las referencias citadas anteriormente se exponen a continuación en la **Tabla 1** como una comparación. Los números de residuo exactos que engloban una CDR particular dependerán de la secuencia y tamaño de la CDR. Los expertos en la técnica pueden determinar de manera ordinaria qué residuos comprenden una CDR particular si se proporciona la secuencia de aminoácidos de la región variable de un anticuerpo.

Tabla 1. Definiciones de CDR<sup>1</sup>

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

<sup>1</sup>La numeración de todas las definiciones de CDR en la Tabla 1 se realiza de acuerdo con las convenciones de numeración expuestas por Kabat *et al.* (véase más adelante).

10 Kabat *et al.* también definieron un sistema de numeración para las secuencias del dominio variable que es aplicable a cualquier anticuerpo. Un experto en la técnica puede asignar sin ambigüedades este sistema de «numeración Kabat» a cualquier secuencia de un dominio variable, sin depender de ningún dato experimental aparte de la propia secuencia. Tal como se utiliza en la presente, la «numeración Kabat» se refiere al sistema de numeración expuesto por Kabat *et al.* (1983) Depto. de Salud y Servicios Humanos de EE. UU., «Sequence of Proteins of Immunological Interest». A menos que se especifique lo contrario, las referencias a la numeración de posiciones de residuos aminoacídicos específicas en un anticuerpo anti-SEMA4D o fragmento de unión al antígeno, variante o derivado de este están de acuerdo con el sistema de numeración de Kabat.

20 Los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno, variantes o derivados de estos incluyen, sin carácter limitante, policlonales, monoclonales, multispecíficos y biespecíficos en los que al menos un brazo es específico para SEMA4D, anticuerpos humanos, humanizados, primatizados o quiméricos, anticuerpos monocatenarios, fragmentos de unión al epítipo, por ejemplo, Fab, Fab' y F(ab')<sub>2</sub>, Fd, Fvs, Fv monocatenarios (scFv), Fv con enlaces disulfuro (sdFv), fragmentos que comprenden un dominio VL o VH, fragmentos producidos por una colección de expresión de Fab, y anticuerpos antiidiopáticos (anti-Id) (incluidos, por ejemplo, anticuerpos anti-Id contra anticuerpos anti-SEMA4D divulgados en la presente). Las moléculas scFv son conocidas en la técnica y se describen, por ejemplo, en la patente de EE. UU. N.º 5 892 019. Las inmunoglobulinas o moléculas de anticuerpo pueden ser de cualquier tipo (por ejemplo, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA e IgY), clase (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2, etc.), o subclase de molécula de inmunoglobulina.

30 Tal como se utiliza en la presente, la expresión «porción de la cadena pesada» incluye secuencias de aminoácidos derivadas de una cadena pesada de inmunoglobulina. En ciertas realizaciones, un polipéptido que comprende una porción de la cadena pesada comprende al menos uno de: un dominio VH, un dominio CH1, un dominio bisagra (por ejemplo, región bisagra superior, central y/o inferior), un dominio CH2, un dominio CH3 o una variante o fragmentos de estos. Por ejemplo, un polipéptido de unión puede comprender una cadena polipeptídica que comprende un dominio CH1; una cadena polipeptídica que comprende un dominio CH1, al menos una porción de un dominio bisagra y un dominio CH2; una cadena polipeptídica que comprende un dominio CH1 y un dominio CH3; una cadena polipeptídica que comprende un dominio CH1, al menos una porción de un dominio bisagra y un dominio CH3, o una cadena polipeptídica que comprende un dominio CH1, al menos una porción de un dominio bisagra, un dominio CH2 y un dominio CH3. En otra realización, un polipéptido comprende una cadena polipeptídica que comprende un dominio CH3. Además, en un polipéptido de unión puede estar ausente al menos una porción de un dominio CH2 (por ejemplo, la totalidad o parte de un dominio CH2). Como se ha expuesto anteriormente, el experto en la técnica entenderá que estos dominios (por ejemplo, las porciones de la cadena pesada) se pueden modificar de modo que varíen en la secuencia de aminoácidos respecto a la molécula de inmunoglobulina de origen natural.

45 En ciertos anticuerpos anti-SEMA4D, o fragmentos de unión al antígeno, variantes o derivados de estos divulgados en la presente, las porciones de la cadena pesada de una cadena polipeptídica de un multímero son idénticas a las de una segunda cadena polipeptídica del multímero. Como alternativa, los monómeros que contienen la porción de la cadena pesada no son idénticos. Por ejemplo, cada monómero puede comprender un sitio de unión diana diferente, que forma, por ejemplo, un anticuerpo biespecífico.

50 Las porciones de la cadena pesada de una molécula de unión para su uso en los métodos divulgados en la presente se pueden derivar de diferentes moléculas de inmunoglobulina. Por ejemplo, una porción de la cadena pesada de un

5 polipéptido puede comprender un dominio  $C_{H1}$  derivado de una molécula de IgG1 y una región bisagra derivada de una molécula de IgG3. En otro ejemplo, una porción de la cadena pesada puede comprender una región bisagra derivada, en parte, de una molécula de IgG1 y, en parte, de una molécula de IgG3. En otro ejemplo, una porción de la cadena pesada puede comprender una bisagra quimérica derivada, en parte, de una molécula de IgG1 y, en parte, de una molécula de IgG4.

Tal como se utiliza en la presente, la expresión «porción de la cadena ligera» incluye secuencias de aminoácidos derivadas de una cadena ligera de inmunoglobulina, por ejemplo, una cadena ligera kappa o lambda. En un aspecto, la porción de la cadena ligera comprende al menos uno de un dominio VL o CL.

10 Los anticuerpos anti-SEMA4D, o fragmentos de unión al antígeno, variantes o derivados de estos divulgados en la presente se pueden describir o indicar en función del (de los) epítipo(s) o porción (porciones) de un antígeno, por ejemplo, un polipéptido diana divulgado en la presente (por ejemplo, SEMA4D) que reconocen o al que se unen de manera específica. La porción de un polipéptido diana que interactúa de manera específica con el dominio de unión al antígeno de un anticuerpo es un «epítipo» o un «determinante antigénico». Un polipéptido diana puede comprender un único epítipo, pero normalmente comprende al menos dos epítipos, y puede incluir cualquier número de epítipos, dependiendo del tamaño, conformación y tipo del antígeno. Además, cabe señalar que un «epítipo» en un polipéptido diana puede estar constituido por elementos no polipeptídicos o puede incluirlos, por ejemplo, un epítipo puede incluir una cadena lateral de carbohidratos.

20 Se cree que el tamaño mínimo de un epítipo peptídico o polipeptídico para un anticuerpo es de aproximadamente cuatro a cinco aminoácidos. Los epítipos peptídicos o polipeptídicos pueden contener al menos siete, al menos nueve, o entre al menos aproximadamente 15 y aproximadamente 30 aminoácidos. Ya que una CDR puede reconocer un péptido o polipéptido antigénico en su forma terciaria, los aminoácidos que comprende un epítipo no necesitan estar contiguos, y en algunos casos, pueden estar en dos o más cadenas peptídicas diferentes. Un epítipo peptídico o polipeptídico reconocido por anticuerpos anti-SEMA4D puede contener una secuencia de al menos 4, al menos 5, al menos 6, al menos 7, al menos 8, al menos 9, al menos 10, al menos 15, al menos 20, al menos 25, o entre aproximadamente 15 y aproximadamente 30 aminoácidos contiguos o no contiguos de SEMA4D.

30 «Se une de manera específica», se refiere generalmente a que un anticuerpo se une a su epítipo mediante su dominio de unión al antígeno, y a que la unión conlleva una cierta complementariedad entre el dominio de unión al antígeno y el epítipo. De acuerdo con esta definición, se dice que un anticuerpo se «une específicamente» a un epítipo cuando se une a ese epítipo mediante su dominio de unión al antígeno más fácilmente de lo que se uniría a un epítipo aleatorio, no relacionado. El término «especificidad» se utiliza en la presente para calificar la afinidad relativa mediante la cual un cierto anticuerpo se une a un cierto epítipo. Por ejemplo, se puede considerar que el anticuerpo «A» tiene una especificidad de unión más elevada por un epítipo concreto que el anticuerpo «B», o se puede decir que el anticuerpo «A» se une a un epítipo «C» con una especificidad más elevada que tiene por su epítipo relacionado «D».

40 «Se une de manera preferencial» se refiere a que el anticuerpo se une de manera específica a un epítipo más fácilmente de lo que se uniría a un epítipo relacionado, similar, homólogo o análogo. Por lo tanto, un anticuerpo que «se une de manera preferencial» a un epítipo concreto será más probable que se una a ese epítipo que a un epítipo relacionado, aun cuando un epítipo de este tipo pueda presentar reactividad cruzada con el epítipo relacionado.

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

50 En otro ejemplo no limitante, se puede considerar que un anticuerpo se une a un primer epítipo de manera preferencial si se une al primer epítipo con una velocidad de disociación ( $k(\text{off})$ ) que es inferior a la ( $k(\text{off})$ ) del anticuerpo para el segundo epítipo. En otro ejemplo no limitante, se puede considerar que un anticuerpo se une a un primer epítipo de manera preferencial si se une al primer epítipo con una afinidad que es al menos un orden de magnitud inferior a la  $k(\text{off})$  del anticuerpo para el segundo epítipo. En otro ejemplo no limitante, se puede considerar que un anticuerpo se une a un primer epítipo de manera preferencial si se une al primer epítipo con una afinidad que es al menos dos órdenes de magnitud inferior a la  $k(\text{off})$  del anticuerpo para el segundo epítipo. Se puede decir que un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno, variante o derivado divulgado en la presente se une a un polipéptido diana divulgado en la presente (por ejemplo, SEMA4D, por ejemplo, SEMA4D humana, murina o tanto humana como murina) o un fragmento o variante de esta con una velocidad de disociación ( $k(\text{off})$ ) igual o inferior a  $5 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$ ,  $10^{-2} \text{ s}^{-1}$ ,  $5 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$  o  $10^{-3} \text{ s}^{-1}$ . En ciertos aspectos, se puede decir que un anticuerpo se une a un polipéptido diana divulgado en la presente (por ejemplo, SEMA4D, por ejemplo, SEMA4D humana, murina o tanto humana como murina o un fragmento o variante de esta con una velocidad de disociación ( $k(\text{off})$ ) igual o inferior a  $5 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ ,  $10^{-4} \text{ s}^{-1}$ ,  $5 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$  o  $10^{-5} \text{ s}^{-1}$ ,  $5 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$ ,  $10^{-6} \text{ s}^{-1}$ ,  $5 \times 10^{-7} \text{ s}^{-1}$  o  $10^{-7} \text{ s}^{-1}$ .

Se puede decir que un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno, variante o derivado divulgado en la presente se une a un polipéptido diana divulgado en la presente (por ejemplo, SEMA4D, por ejemplo, SEMA4D humana, murina o tanto humana como murina) o un fragmento o variante de esta con una velocidad de asociación ( $k(\text{on})$ ) igual o superior a  $10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ,  $5 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ,  $10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  o  $5 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ . En ciertos aspectos, se puede decir que un anticuerpo se une a un polipéptido diana divulgado en la presente (por ejemplo, SEMA4D, por ejemplo, SEMA4D humana, murina o tanto humana como murina) o un fragmento o variante de esta con una velocidad de asociación ( $k(\text{on})$ ) igual o superior a  $10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ,  $5 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ,  $10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ , o  $5 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  o  $10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ .

Se dice que un anticuerpo inhibe de manera competitiva la unión de un anticuerpo de referencia a un epítipo concreto si se une de manera preferencial a ese epítipo hasta el punto que bloquea, en cierta medida, la unión del anticuerpo de referencia al epítipo. La unión competitiva se puede determinar mediante cualquier método conocido en la técnica, por ejemplo, ensayos de ELISA competitivo. Se puede decir que un anticuerpo inhibe de manera competitiva la unión del anticuerpo de referencia a un epítipo concreto en al menos un 90%, al menos un 80%, al menos un 70%, al menos un 60% o al menos un 50%.

Tal como se utiliza en la presente, el término «afinidad» se refiere a una medida de la fortaleza de la unión de un epítipo individual con la CDR de una molécula de inmunoglobulina. Véase, por ejemplo, Harlow *et al.* (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2.<sup>a</sup> ed.) páginas 27-28. Tal como se utiliza en la presente, el término «avidez» se refiere a la estabilidad global del complejo entre una población de inmunoglobulinas y un antígeno, es decir, la fortaleza de combinación funcional de una mezcla de inmunoglobulinas con el antígeno. Véase, por ejemplo, Harlow en las páginas 29-34. La avidez está relacionada tanto con la afinidad de las moléculas de inmunoglobulina individuales en la población con epítopos específicos, y también las valencias de las inmunoglobulinas y el antígeno. Por ejemplo, la interacción entre un anticuerpo monoclonal bivalente y un antígeno con una estructura del epítipo sumamente repetida, tal como un polímero, sería una con avidez elevada.

Los anticuerpos anti-SEMA4D o fragmentos de unión al antígeno, variantes o derivados de estos también se pueden describir o indicar en función de su reactividad cruzada. Tal como se utiliza en la presente, la expresión «reactividad cruzada» se refiere a la capacidad de un anticuerpo, específico para un antígeno, para reacción con un segundo antígeno; una medida del grado de relación entre dos sustancias antigénicas diferentes. Por lo tanto, un anticuerpo presenta reactividad cruzada si se une a un epítipo diferente del que induce su formación. El epítipo con reactividad cruzada contiene por lo general muchas de las mismas características estructurales complementarias del epítipo inductor, y en algunos casos, puede encajar propiamente mejor que el original.

Por ejemplo, ciertos anticuerpos presentan un cierto grado de reactividad cruzada, en el sentido de que se unen a epítopos relacionados pero no idénticos, por ejemplo, epítopos con una identidad de al menos un 95%, al menos un 90%, al menos un 85%, al menos un 80%, al menos un 75%, al menos un 70%, al menos un 65%, al menos un 60%, al menos un 55% y al menos un 50% (calculada utilizando métodos conocidos en la técnica y descritos en la presente) respecto a un epítipo de referencia. Se puede decir que un anticuerpo presenta una reactividad cruzada pequeña o nula si no se une a epítopos con una identidad de menos de un 95%, menos de un 90%, menos de un 85%, menos de un 80%, menos de un 75%, menos de un 70%, menos de un 65%, menos de un 60%, menos de un 55% y menos de un 50% (calculada utilizando métodos conocidos en la técnica y descritos en la presente) respecto a un epítipo de referencia. Se considera que un anticuerpo es «sumamente específico» por un cierto epítipo si no se une a ningún otro análogo, ortólogo u homólogo de ese epítipo.

Las moléculas de unión anti-SEMA4D, por ejemplo, anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno, variantes o derivados de estos, también se pueden describir o indicar en función de su afinidad de unión a un polipéptido, por ejemplo, SEMA4D, por ejemplo, SEMA4D humana, murina o tanto humana como murina. Las afinidades de unión pueden incluir aquellas con una constante de disociación o  $K_d$  inferior a  $5 \times 10^{-2} \text{ M}$ ,  $10^{-2} \text{ M}$ ,  $5 \times 10^{-3} \text{ M}$ ,  $10^{-3} \text{ M}$ ,  $5 \times 10^{-4} \text{ M}$ ,  $10^{-4} \text{ M}$ ,  $5 \times 10^{-5} \text{ M}$ ,  $10^{-5} \text{ M}$ ,  $5 \times 10^{-6} \text{ M}$ ,  $10^{-6} \text{ M}$ ,  $5 \times 10^{-7} \text{ M}$ ,  $10^{-7} \text{ M}$ ,  $5 \times 10^{-8} \text{ M}$ ,  $10^{-8} \text{ M}$ ,  $5 \times 10^{-9} \text{ M}$ ,  $10^{-9} \text{ M}$ ,  $5 \times 10^{-10} \text{ M}$ ,  $10^{-10} \text{ M}$ ,  $5 \times 10^{-11} \text{ M}$ ,  $10^{-11} \text{ M}$ ,  $5 \times 10^{-12} \text{ M}$ ,  $10^{-12} \text{ M}$ ,  $5 \times 10^{-13} \text{ M}$ ,  $10^{-13} \text{ M}$ ,  $5 \times 10^{-14} \text{ M}$ ,  $10^{-14} \text{ M}$ ,  $5 \times 10^{-15} \text{ M}$  o  $10^{-15} \text{ M}$ . En ciertas realizaciones, la molécula de unión anti-SEMA4D, por ejemplo, un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este se une a SEMA4D humana con una  $K_d$  de aproximadamente  $5 \times 10^{-9}$  a aproximadamente  $6 \times 10^{-9}$ . En otra realización, la molécula de unión anti-SEMA4D, por ejemplo, un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este, se une a SEMA4D murina con una  $K_d$  de aproximadamente  $1 \times 10^{-9}$  a aproximadamente  $2 \times 10^{-9}$ .

Tal como se utiliza en la presente, la expresión «anticuerpo quimérico» se considerará que se refiere a cualquier anticuerpo donde el sitio o región inmunorreactivos se obtiene o se deriva de una primera especie y la región constante (que puede estar intacta, parcial o modificada) se obtiene de una segunda especie. En algunas realizaciones, el sitio o la región de unión a la diana tendrá un origen no humano (por ejemplo, ratón o primate) y la región contante es humana.

Tal como se utiliza en la presente, la expresión «anticuerpo modificado» se refiere a un anticuerpo en el que el dominio variable en la cadena pesada o ligera o en ambas se ve alterado por al menos un reemplazo parcial de una o más CDR de un anticuerpo de especificidad conocida y, si es necesario, por el reemplazo de la región de armazón parcial y cambio de la secuencia. Aunque las CDR se pueden derivar de un anticuerpo de la misma clase o incluso subclase que un anticuerpo del que se derivan las regiones de armazón, se contempla que las CDR se derivarán de un

anticuerpo de una clase diferente, por ejemplo, de un anticuerpo de una especie diferente. Un anticuerpo modificado en el que una o más CDR «donantes» de un anticuerpo no humano de especificidad conocida se injerta en una región de armazón de una cadena pesada o ligera humana se denomina en la presente «anticuerpo humanizado». En ciertas realizaciones, no es necesario reemplazar todas las CDR con las CDR completas del dominio variable donante para transferir la capacidad de unión al antígeno de un dominio variable a otro. En su lugar, es posible transferir solo aquellos residuos necesarios para mantener la actividad del sitio de unión diana.

Además, se reconoce que las regiones de armazón dentro del dominio variable en una cadena pesada o ligera, o ambas, de un anticuerpo humanizado puede comprender solamente residuos de origen humano, en cuyo caso estas regiones de armazón del anticuerpo humanizado se denominarán «regiones de armazón totalmente humanas» (por ejemplo, MAb VX15/2503, divulgado en la solicitud de patente de EE. UU. N.º US 2010/0285036 A1 con MAb 2503). Como alternativa, se pueden modificar uno o más residuos de la(s) región (regiones) de armazón del dominio variable donante en la posición correspondiente de la(s) región (regiones) de armazón humana(s) de un dominio variable en una cadena pesada o ligera, o ambas, de un anticuerpo humanizado si es necesario para mantener la unión adecuada o para potenciar la unión al antígeno SEMA4D. Por lo tanto, una región de armazón humana que se ha modificado de esta manera comprendería una mezcla de residuos de armazón humanos y donantes y se denomina en la presente «región de armazón parcialmente humana».

Por ejemplo, la humanización de un anticuerpo anti-SEMA4D se puede realizar esencialmente siguiendo el método de Winter y colaboradores (Jones *et al.*, *Nature* 321:522-525 (1986); Riechmann *et al.*, *Nature* 332:323-327 (1988); Verhoeyen *et al.*, *Science* 239:1534-1536 (1988)), sustituyendo con secuencias CDR o CDR de roedores o roedores mutantes las secuencias correspondientes de un anticuerpo anti-SEMA4D humano. Véanse también las patentes de EE. UU. N.ºs 5 225 539; 5 585 089; 5 693 761; 5 693 762; 5 859 205. El anticuerpo anti-SEMA4D humanizado resultante comprendería al menos una CDR de roedor o de roedor mutante dentro de las regiones de armazón totalmente humanas del dominio variable de la cadena pesada y/o ligera del anticuerpo humanizado. En algunos casos, los residuos de las regiones de armazón de uno o más dominios variables del anticuerpo anti-SEMA4D humanizado son reemplazados por los residuos no humanos (por ejemplo, de roedores) correspondientes (véanse, por ejemplo, las patentes de EE. UU. N.ºs 5 585 089; 5 693 761; 5 693 762; y 6 180 370), en cuyo caso el anticuerpo anti-SEMA4D humanizado resultante comprendería regiones de armazón parcialmente humanas dentro del dominio variable de la cadena pesada y/o ligera.

Además, los anticuerpos humanizados pueden comprender residuos que no se observan en el anticuerpo receptor ni en el anticuerpo donante. Estas modificaciones se realizan para refinar aún más el rendimiento del anticuerpo (por ejemplo, para obtener la afinidad deseada). En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente al menos uno, y normalmente dos, dominios variables, en los que todas o sustancialmente todas las CDR corresponden a las de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las regiones de armazón son las de una secuencia de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado también comprenderá opcionalmente al menos una porción de una región constante de inmunoglobulina (Fc), normalmente la de una inmunoglobulina humana. Para consultar más detalles, véanse Jones *et al.*, *Nature* 331:522-525 (1986); Riechmann *et al.*, *Nature* 332:323-329 (1988); y Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2:593-596 (1992). En consecuencia, tales anticuerpos «humanizados» pueden incluir anticuerpos donde sustancialmente menos de un dominio variable humano intacto ha sido sustituido por la secuencia correspondiente de una especie no humana. En la práctica, los anticuerpos humanizados son normalmente anticuerpos humanos en los que algunos residuos de CDR y posiblemente algunos residuos de armazón son sustituidos por residuos de sitios análogos en anticuerpos de roedor. Véanse, por ejemplo, las patentes de EE. UU. N.ºs 5 225 539; 5 585 089; 5 693 761; 5 693 762; 5 859 205. Véanse también la patente de EE. UU. N.º 6 180 370, y la publicación internacional N.º WO 01/27160, donde se divulgan anticuerpos humanizados y las técnicas para producir anticuerpos humanizados que tengan una afinidad mejorada por un antígeno predeterminado.

## II. Descripción del polipéptido diana

Tal como se utilizan en la presente, los términos «Semaforina-4D», «SEMA4D» y «polipéptido de SEMA4D» se utilizan indistintamente, al igual que «SEMA4D» y «Sema4D». En ciertas realizaciones, SEMA4D se expresa en la superficie de una célula o es secretada por ella. En otra realización, SEMA4D está unida a la membrana. En otras realizaciones, SEMA4D es soluble, por ejemplo, sSEMA4D. En otras realizaciones, SEMA4D puede incluir una SEMA4D completa o un fragmento de esta, o un polipéptido variante de SEMA4D, donde el fragmento del polipéptido de SEMA4D o SEMA4D variante retiene algunas o todas las propiedades funcionales de SEMA4D completa.

La proteína SEMA4D humana completa es una proteína transmembrana homodimérica constituida por dos cadenas polipeptídicas de 150 kDa. SEMA4D pertenece a la familia de receptores de superficie celular de semaforina y también se denomina CD100. Tanto SEMA4D/Sema4D humana como de ratón son escindidas proteolíticamente de su forma transmembrana para generar formas solubles de 120 kDa, lo que indica la existencia de dos isoformas de Sema4D (Kumanogoh *et al.*, *J. Cell Science* 116 (7): 3464 (2003)). Las semaforinas están constituidas por proteínas solubles y unidas a la membrana que se definieron en un principio como factores de guía axonal durante el desarrollo que desempeñan una función importante en el establecimiento de conexiones precisas entre neuronas y su diana apropiada. Considerada estructuralmente una semaforina de clase IV, SEMA4D está constituida una secuencia señal

amino-terminal seguida por un dominio «Sema» característico, que contiene 17 residuos de cisteína conservados, un dominio de tipo Ig, un tramo rico en lisina, una región transmembrana hidrofóbica y una cola citoplasmática

Cada cadena polipeptídica de SEMA4D incluye una secuencia señal de aproximadamente 13 aminoácidos seguida por un dominio de semaforina de aproximadamente 512 aminoácidos, un dominio de tipo inmunoglobulina (tipo Ig) de aproximadamente 65 aminoácidos, un tramo rico en lisina de 104 aminoácidos, una región transmembrana hidrofóbica de aproximadamente 19 aminoácidos y una cola citoplasmática de 110 aminoácidos. Un sitio consenso para la fosforilación de tirosina en la cola citoplasmática respalda la asociación predicha de SEMA4D con una tirosina-cinasa (Schlossman, *et al.*, Eds. (1995) *Leucocyte Typing V* (Oxford University Press, Oxford).

Se sabe que SEMA4D tiene al menos tres receptores funcionales, Plexina-B1, Plexina-B2 y CD72. Uno de los receptores, Plexina-B1, se expresa en tejidos no linfoides y se ha mostrado que es un receptor de alta afinidad (1 nM) para SEMA4D (Tamagnone *et al.*, *Cell* 99: 71-80 (1999)). Se ha demostrado que la estimulación SEMA4D de la señalización de Plexina-B1 induce el colapso del cono de crecimiento de las neuronas, e induce el colapso de la extensión del proceso y la apoptosis de los oligodendrocitos (Giraudon *et al.*, *J. Immunol.* 172: 1246-1255 (2004); Giraudon *et al.*, *NeuroMolecular Med.* 7: 207-216 (2005)). Después de unirse a SEMA4D, la señalización de Plexina-B1 media la inactivación de R-Ras, lo que conduce a una disminución en la unión mediada por integrinas a la matriz extracelular, así como también a la activación de RhoA, lo que lleva a la reorganización del citoesqueleto y la migración celular. Véanse Kruger *et al.*, *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 6: 789-800 (2005); Pasterkamp, *TRENDS in Cell Biology* 15: 61-64 (2005)). Plexina-B2, por otro lado, tiene una afinidad intermedia por SEMA4D y un informe reciente indica que Plexina-B2 se expresa en los queratinocitos y activa los linfocitos T  $\gamma\delta$  positivos para SEMA4D para contribuir a la reparación epitelial (Witherden *et al.*, *Immunity.* 24 de agosto de 2012; 37(2):314-25).

En los tejidos linfoides, CD72 se utiliza como un receptor de SEMA4D de baja afinidad (300 nM) (Kumanogoh *et al.*, *Immunity* 13: 621-631 (2000)). Los linfocitos B y las APC expresan CD72, y los anticuerpos anti-CD72 tienen muchos de los mismos efectos que sSEMA4D, tales como la mejora de las respuestas de linfocitos B inducidas por CD40 y el desprendimiento de CD23 de los linfocitos B. Se cree que CD72 actúa como un regulador negativo de las respuestas de linfocitos B al reclutar la tirosina-fosfatasa SHP-1, que se puede asociar con muchos receptores inhibidores. La interacción de SEMA4D con CD72 da como resultado la disociación de SHP-1 y la pérdida de esta señal de activación negativa. Se ha mostrado que SEMA4D promueve la estimulación de linfocitos T y la agregación y supervivencia de linfocitos B *in vitro*. La adición de células que expresan SEMA4D o sSEMA4D mejora la proliferación de linfocitos B inducida por CD40 y la producción de inmunoglobulinas *in vitro*, y acelera las respuestas de anticuerpos *in vivo* (Ishida *et al.*, *Inter. Immunol* 15: 1027-1034 (2003); Kumanogoh y H. Kikutani, *Trends in Immunol.* 22: 670-676 (2001)). sSEMA4D mejora la maduración inducida por CD40 de las DC (siglas en inglés de células dendríticas), incluido el aumento regulado de las moléculas coestimuladoras y la mayor secreción de IL-12. Además, sSEMA4D puede inhibir la migración de células inmunitarias, lo que se puede revertir mediante la adición de anticuerpos bloqueantes anti-SEMA4D (Elhabazi *et al.*, *J. Immunol.* 166: 4341-4347 (2001); Delaire *et al.*, *J. Immunol.* 166: 4348-4354 (2001)).

Sema4D tiene un nivel elevado de expresión en los órganos linfoides, incluidos el bazo, el timo y los ganglios linfáticos, y en los órganos no linfoides, tales como el cerebro, el corazón y los riñones. En los órganos linfoides, Sema4D se expresa abundantemente en los linfocitos T en reposo, pero solo se expresa débilmente en los linfocitos B en reposo y en las células presentadoras de antígeno (APC, por sus siglas en inglés), tales como las células dendríticas (DC). La activación celular aumenta la expresión superficial de SEMA4D, así como también la generación de SEMA4D soluble (sSEMA4D).

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

Los ratones con una inactivación génica de SEMA4D (SEMA4D<sup>-/-</sup>) han proporcionado evidencia adicional de que SEMA4D desempeña una función importante en las respuestas inmunitarias humoral y celular. No se conocen anomalías importantes de los tejidos no linfoides en ratones SEMA4D<sup>-/-</sup>. Las células dendríticas (DC) de los ratones SEMA4D<sup>-/-</sup> tienen poca capacidad aloestimuladora y muestran defectos en la expresión de moléculas coestimuladoras, que se pueden resolver mediante la adición de sSEMA4D. Los ratones deficientes en SEMA4D (SEMA4D<sup>-/-</sup>) no pueden desarrollar encefalomielitis autoinmunitaria experimental inducida por el péptido de glucoproteína de mielina de oligodendrocitos, porque en ausencia de SEMA4D hay una generación deficiente de los linfocitos T específicos de la glucoproteína de mielina de oligodendrocito (Kumanogoh *et al.*, *J Immunol* 169: 1175-1181 (2002)). También se detecta una cantidad significativa de SEMA4D soluble en el suero de ratones MRL/lpr propensos a la autoinmunidad (modelo de enfermedades autoinmunitarias sistémicas tales como SLE), pero no en ratones normales. Además, los niveles de sSEMA4D se correlacionan con los niveles de autoanticuerpos y aumentan con la edad (Wang *et al.*, *Blood* 97: 3498-3504 (2001)). También se ha mostrado que el SEMA4D soluble se acumula en el líquido cefalorraquídeo y el suero de pacientes con enfermedad desmielinizante, y sSEMA4D induce la apoptosis

de precursores neuronales pluripotentes humanos (células Dev), y ambos inhiben la extensión del proceso e inducen la apoptosis de los oligodendrocitos de rata *in vitro* (Giraudon *et al.*, *J Immunol* 172 (2): 1246-1255 (2004)). La apoptosis fue bloqueada por un mAb anti-SEMA4D.

### 5 III. Anticuerpos anti-SEMA4D

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

10 Esta divulgación se refiere por lo general a un método para tratar la aterosclerosis en un sujeto que padece un trastorno inflamatorio, por ejemplo, un paciente humano, que comprende la administración de un anticuerpo que se une específicamente a SEMA4D, o un fragmento de unión al antígeno, variante o derivado de este. En ciertas realizaciones, el anticuerpo bloquea la interacción de SEMA4D con uno o más de sus receptores, por ejemplo, Plexina-B1. Los anticuerpos anti-SEMA4D que tienen estas propiedades se pueden utilizar en los métodos que se proporcionan en la presente. Los anticuerpos que se pueden utilizar incluyen, sin carácter limitante, MAb VX15/2503, 67 y 76 y fragmentos de unión al antígeno, variantes o derivados de estos que se describen completamente en el documento US 2010/0285036 A1. Los anticuerpos adicionales que se pueden utilizar en los métodos que se proporcionan en la presente incluyen los anticuerpos BD16 y BB18 descritos en el documento US 2006/0233793 A1 así como también los fragmentos de unión al antígeno, variantes o derivados de estos; o cualquiera de MAb 301, MAb 1893, MAb 657, MAb 1807, MAb 1656, MAb 1808, Mab 59, MAb 2191, MAb 2274, MAb 2275, MAb 2276, MAb 2277, MAb 2278, MAb 2279, MAb 2280, MAb 2281, MAb 2282, MAb 2283, MAb 2284 y MAb 2285, así como también cualesquiera fragmentos, variantes o derivados de estos como se describe en el documento US 2008/0219971 A1. En ciertas realizaciones, un anticuerpo anti-SEMA4D para su uso en los métodos que se proporcionan en la presente se une a SEMA4D humana, murina o tanto humana como murina. También son útiles los anticuerpos que se unen al mismo epítipo que cualquiera de los anticuerpos mencionados anteriormente y/o anticuerpos que inhiben de manera competitiva cualquiera de los anticuerpos mencionados anteriormente.

30 En ciertas realizaciones, un anticuerpo anti-SEMA4D o fragmento de unión al antígeno, variante o derivado de este útil en los métodos que se proporcionan en la presente tiene una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente un 80%, aproximadamente un 85%, aproximadamente un 88%, aproximadamente un 89% , aproximadamente un 90%, aproximadamente un 91%, aproximadamente un 92%, aproximadamente un 93%, aproximadamente un 94% o aproximadamente un 95% de identidad secuencial respecto a la secuencia de aminoácidos de una molécula de anticuerpo anti-SEMA4D de referencia, por ejemplo, las descritas anteriormente. En una realización adicional, la molécula de unión comparte al menos aproximadamente un 96%, aproximadamente un 97%, aproximadamente un 98%, aproximadamente un 99% o un 100% de identidad secuencial con un anticuerpo de referencia.

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

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

55 En otra realización, un anticuerpo anti-SEMA4D o un fragmento de unión al antígeno, variante o derivado de este útil en los métodos que se proporcionan en la presente comprende, está constituido esencialmente o está constituido por un dominio variable de cadena pesada de inmunoglobulina (dominio VH), donde al menos una de las CDR del dominio VH tiene una secuencia de aminoácidos idéntica, excepto por 1, 2, 3, 4 o 5 sustituciones conservadoras de aminoácidos, a la SEQ ID NO: 6, la SEQ ID NO: 7, o la SEQ ID NO: 8.

60 En otra realización, un anticuerpo anti-SEMA4D o fragmento de unión al antígeno, variante o derivado de este útil en los métodos que se proporcionan en la presente comprende, está constituido esencialmente o está constituido por un dominio VH que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente un 80%, aproximadamente un 85%, aproximadamente un 90%, aproximadamente un 91%, aproximadamente un 92%, aproximadamente un 93%, aproximadamente un 94%, aproximadamente un 95%, aproximadamente un 96%, aproximadamente un 97%, aproximadamente un 98%, aproximadamente un 99% o un 100% idéntica a la SEQ ID NO: 9 o la SEQ ID NO: 10,

65

donde un anticuerpo anti-SEMA4D que comprende el dominio VH codificado se une de manera específica o preferente a SEMA4D.

5 En otra realización, un anticuerpo anti-SEMA4D o fragmento de unión al antígeno, variante o derivado de este útil en los métodos que se proporcionan en la presente comprende, está constituido esencialmente o está constituido por un dominio variable de cadena ligera de inmunoglobulina (dominio VL), donde al menos una de las CDR del dominio VL tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente un 80%, aproximadamente un 85%, aproximadamente un 90%, aproximadamente un 95%, aproximadamente un 96%, aproximadamente un 97%, aproximadamente un 98%, aproximadamente un 99% o idéntica a CDR1, CDR2 o CDR3 de la SEQ ID NO: 17 o 18.

10 En otra realización, un anticuerpo anti-SEMA4D o fragmento de unión al antígeno, variante o derivado de este útil en los métodos que se proporcionan en la presente comprende, está constituido esencialmente o está constituido por un dominio variable de cadena ligera de inmunoglobulina (dominio VL), donde al menos una de las CDR del dominio VL tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente un 80%, aproximadamente un 85%, aproximadamente un 90%, aproximadamente un 95%, aproximadamente un 96%, aproximadamente un 97%, aproximadamente un 98%, aproximadamente un 99% o idéntica a la SEQ ID NO: 14, la SEQ ID NO: 15, o la SEQ ID NO: 16.

20 En otra realización, un anticuerpo anti-SEMA4D o un fragmento de unión al antígeno, variante o derivado de este útil en los métodos que se proporcionan en la presente comprende, está constituido esencialmente o está constituido por un dominio variable de cadena ligera de inmunoglobulina (dominio VL), donde al menos una de las CDR del dominio VL tiene una secuencia de aminoácidos idéntica, excepto por 1, 2, 3, 4 o 5 sustituciones conservadoras de aminoácidos, a la SEQ ID NO: 14, la SEQ ID NO: 15, o la SEQ ID NO: 16.

25 En una realización adicional, un anticuerpo anti-SEMA4D o fragmento de unión al antígeno, variante o derivado de este útil en los métodos que se proporcionan en la presente comprende, está constituido esencialmente o está constituido por un dominio VL que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente un 80 %, aproximadamente un 85%, aproximadamente un 90%, aproximadamente un 91%, aproximadamente un 92%, aproximadamente un 93%, aproximadamente un 94%, aproximadamente un 95%, aproximadamente un 96%, aproximadamente un 97%, aproximadamente un 98%, aproximadamente un 99% o un 100% idéntica a la SEQ ID NO: 17 o la SEQ ID NO: 18, donde un anticuerpo anti-SEMA4D que comprende el dominio VL codificado se une de manera específica o preferente a SEMA4D.

35 También se incluyen para su uso en los métodos que se proporcionan en la presente polipéptidos que codifican anticuerpos anti-SEMA4D, o fragmentos de unión al antígeno, variantes o derivados de estos tal como se describe en la presente, polinucleótidos que codifican tales polipéptidos, vectores que comprenden tales polinucleótidos y células hospedadoras que comprenden tales vectores o polinucleótidos, todo para producir anticuerpos anti-SEMA4D, o fragmentos de unión al antígeno, variantes o derivados de estos para su uso en los métodos descritos en la presente.

40 Las variantes con actividad biológica adecuadas de los anticuerpos anti-SEMA4D se pueden utilizar en los métodos de la presente divulgación. Tales variantes mantendrán las propiedades de unión deseadas del anticuerpo anti-SEMA4D original. En la técnica se puede disponer de manera general de métodos para preparar variantes de anticuerpo.

45 Los métodos para alteraciones por mutagénesis y alteraciones de la secuencia de nucleótidos son muy conocidos en la técnica. Véanse, por ejemplo, Walker y Gaastra, eds. (1983) *Techniques in Molecular Biology* (MacMillan Publishing Company, Nueva York); Kunkel, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:488-492 (1985); Kunkel *et al.*, *Methods Enzymol.* 154:367-382 (1987); Sambrook *et al.* (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor, N.Y.); patente de EE. UU. N.º 4 873 192; y las referencias citadas en ellos. Se puede encontrar orientación sobre las sustituciones de aminoácidos apropiadas que no afectan a la actividad biológica del polipéptido de interés en el modelo de Dayhoff *et al.* (1978) en *Atlas of Protein Sequence and Structure* (Natl. Biomed. Res. Found., Washington, D.C.), págs. 345-352. El modelo de Dayhoff *et al.* utiliza la matriz de similitud de aminoácidos de mutación puntual aceptada (PAM, por sus siglas en inglés) (matriz PAM 250) para determinar sustituciones conservadoras de aminoácidos adecuadas. En algunos aspectos, las sustituciones de aminoácidos pueden ser sustituciones conservadoras, tales como el intercambio de un aminoácido con otro que tenga propiedades similares. Los ejemplos de sustituciones conservadoras de aminoácidos según lo que muestra la matriz PAM 250 del modelo de Dayhoff *et al.* incluyen, sin carácter limitante, Gly↔Ala, Val↔Ile↔Leu, Asp↔Glu, Lys↔Arg, Asn↔Gln y Phe↔Trp↔Tyr.

60 Al construir variantes de la molécula de unión anti-SEMA4D, por ejemplo, un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este, polipéptidos de interés, se realizan modificaciones de tal manera que las variantes continúen poseyendo las propiedades deseadas, por ejemplo, que sean capaces de unirse de manera específica a una SEMA4D, por ejemplo, SEMA4D humana, murina o tanto humana como murina, por ejemplo, expresada en la superficie de una célula o secretada por esta y que tengan actividad de bloqueo SEMA4D, como se describe en la presente. Las mutaciones realizadas en el ADN que codifica el polipéptido variante no deberían colocar la secuencia fuera del marco de lectura y, en ciertos aspectos, no crearán regiones complementarias que podrían producir una estructura secundaria de ARNm. Véase la publicación de solicitud de patente EP N.º 75 444.

Los métodos para medir la especificidad de unión de la molécula de unión anti-SEMA4D, por ejemplo, un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno, variante o derivado de este, incluyen, sin carácter limitante, ensayos de unión competitiva estándar, ensayos para controlar la secreción de inmunoglobulinas por linfocitos T o linfocitos B, ensayos de proliferación de linfocitos T, ensayos de apoptosis, ensayos ELISA y similares. Véanse, por ejemplo, tales ensayos divulgados en el documento WO 93/14125; Shi *et al.*, *Immunity* 13:633-642 (2000); Kumanogoh *et al.*, *J Immunol* 169:1175-1181 (2002); Watanabe *et al.*, *J Immunol* 167:4321-4328 (2001); Wang *et al.*, *Blood* 97:3498-3504 (2001); y Giraudon *et al.*, *J Immunol* 172(2):1246-1255 (2004).

Cuando se analiza en la presente si algún polipéptido particular, incluidas las regiones constantes, CDR, dominios VH o dominios VL divulgados en la presente, es al menos aproximadamente un 65%, aproximadamente un 70%, aproximadamente un 75%, aproximadamente un 80%, aproximadamente un 85%, aproximadamente un 90%, aproximadamente un 91%, aproximadamente un 92%, aproximadamente un 93%, aproximadamente un 94%, aproximadamente un 95%, aproximadamente un 96%, aproximadamente un 97%, aproximadamente un 98%, aproximadamente un 99%, o incluso aproximadamente un 100% idéntico a otro polipéptido, el % de identidad se puede determinar utilizando métodos y software/programas informáticos conocidos en la técnica tales como, sin carácter limitante, el programa BESTFIT (Paquete de análisis de secuencia de Wisconsin, Versión 8 para Unix, Genetics Computer Group, University Research Park, 575 Science Drive, Madison, Wis. 53711). BESTFIT utiliza el algoritmo de homología local de Smith y Waterman (1981) *Adv. Appl. Math.* 2: 482-489, para encontrar el mejor segmento de homología entre dos secuencias. Cuando se utiliza BESTFIT o cualquier otro programa de alineación de secuencias para determinar si una secuencia particular es, por ejemplo, un 95% idéntica a una secuencia de referencia, los parámetros se establecen, por supuesto, de modo que el porcentaje de identidad se calcule sobre la longitud total de la secuencia polipeptídica de referencia y que se permitan huecos en la homología de hasta un 5% del número total de aminoácidos en la secuencia de referencia.

El porcentaje de identidad secuencial se puede determinar utilizando el algoritmo de búsqueda de homología Smith-Waterman usando una búsqueda de hueco afín con una penalización de apertura de hueco de 12 y una penalización de extensión de hueco de 2, matriz BLOSUM de 62. El algoritmo de búsqueda de homología de Smith-Waterman se presenta en Smith y Waterman (1981) *Adv. Appl. Math.* 2:482-489. Una variante puede, por ejemplo, diferir de un anticuerpo anti-SEMA4D de referencia (por ejemplo, MA b VX15/2503, 67 o 76) en tan solo de 1 a 15 residuos aminoácidos, tan solo de 1 a 10 residuos aminoácidos, tales como 6-10, tan solo 5, tan solo 4, 3, 2 o incluso 1 residuo aminoácido.

El porcentaje de "identidad secuencial" también se puede determinar comparando dos secuencias alineadas de manera óptima a lo largo de un intervalo de comparación. Para alinear de manera óptima las secuencias para la comparación, la porción de una secuencia polinucleotídica o polipeptídica en el intervalo de comparación puede comprender adiciones o deleciones denominadas huecos mientras la secuencia de referencia se mantiene constante. Una alineación óptima es aquella que, incluso con huecos, produce el mayor número posible de posiciones «idénticas» entre las secuencias de referencia y de comparación. El porcentaje de «identidad secuencial» entre dos secuencias se puede determinar utilizando la versión del programa «BLAST 2 Sequences» que se ha podido consultar en el Centro Nacional de Información Biotecnológica desde el 1 de septiembre de 2004, programa que incorpora los programas BLASTN (para comparación de secuencias nucleotídicas) y BLASTP (para la comparación de secuencias polipeptídicas), cuyos programas se basan en el algoritmo de Karlin y Altschul (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90 (12): 5873-5877, 1993). Cuando se utiliza «BLAST 2 Sequences», se pueden utilizar los parámetros que han sido parámetros predeterminados desde el 1 de septiembre de 2004, para el tamaño de palabra (3), penalización por apertura de hueco (11), penalización por extensión de hueco (1), caída de hueco (50), valor esperado (10) y cualquier otro parámetro requerido, incluida, sin carácter limitante, la opción de matriz.

La región constante de un anticuerpo anti-SEMA4D puede mutarse para alterar la función efectora de varias maneras. Por ejemplo, véase la patente de EE. UU. N.º 6 737 056B1 y la publicación de solicitud de patente N.º 2004/0132101A1, que divulgan mutaciones de Fc que optimizan la unión del anticuerpo a receptores de Fc.

En ciertos anticuerpos anti-SEMA4D o fragmentos de unión al antígeno de estos útiles en los métodos que se proporcionan en la presente, la porción Fc puede mutarse para disminuir la función efectora utilizando técnicas conocidas en la materia. Por ejemplo, la deleción o inactivación (a través de mutaciones puntuales u otros medios) de un dominio de la región constante puede reducir la unión al receptor de Fc del anticuerpo modificado circulante y mejorar así la localización del tumor. En otros casos, las modificaciones de la región constante compatibles con la presente invención moderan la unión del complemento y, por lo tanto, reducen la semivida sérica. Se pueden utilizar otras modificaciones más de la región constante para modificar las uniones disulfuro o restos oligosacáridos que permiten la mejora de la localización debido a una mayor especificidad del antígeno o flexibilidad del anticuerpo. El perfil fisiológico, biodisponibilidad y otros efectos bioquímicos resultantes de las modificaciones, como la localización del tumor, biodistribución y semivida sérica, se pueden medir y cuantificar fácilmente utilizando técnicas inmunológicas muy conocidas sin experimentación excesiva. Los anticuerpos anti-SEMA4D para su uso en los métodos que se proporcionan en la presente incluyen derivados que se modifican, por ejemplo, mediante la unión covalente de cualquier tipo de molécula al anticuerpo, de modo que la unión covalente no impida que el anticuerpo se una de manera específica a su epítipo afín. Por ejemplo, sin carácter limitante, los derivados de anticuerpos incluyen

anticuerpos que han sido modificados, por ejemplo, por glicosilación, acetilación, pegilación, fosforilación, amidación, derivación con grupos protectores/bloqueantes conocidos, escisión proteolítica, unión a un ligando celular u otra proteína, etc. Cualquiera de las numerosas modificaciones químicas se puede llevar a cabo mediante técnicas conocidas, que incluyen, sin carácter limitante, la escisión química específica, acetilación, formilación, etc. Además, el derivado puede contener uno o más aminoácidos no clásicos.

Una «sustitución conservadora de aminoácidos» es una en la que el residuo aminoacídico se reemplaza con un residuo aminoacídico que tiene una cadena lateral con una carga similar. En la técnica se han definido las familias de residuos aminoacídicos que tienen cadenas laterales con cargas similares. Estas familias incluyen aminoácidos con cadenas laterales básicas (por ejemplo, lisina, arginina, histidina), cadenas laterales ácidas (por ejemplo, ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales polares sin carga (por ejemplo, glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína), cadenas laterales no polares (por ejemplo, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano), cadenas laterales ramificadas en la posición beta (por ejemplo, treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (por ejemplo, tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina). Como alternativa, las mutaciones se pueden introducir aleatoriamente a lo largo de toda o parte de la secuencia codificante, tal como por mutagénesis de saturación, y se puede realizar un cribado con los mutantes resultantes en función de su actividad biológica para identificar mutantes que mantengan la actividad (por ejemplo, la capacidad de unirse a un polipéptido anti-SEMA4D, para bloquear la interacción de SEMA4D con su receptor, o para reducir, inhibir, suprimir y/o retrasar la formación de placas en un sujeto, por ejemplo, un paciente con un trastorno inflamatorio o aterosclerosis).

Por ejemplo, es posible introducir mutaciones solo en regiones de armazón o solo en regiones CDR de una molécula de anticuerpo. Las mutaciones introducidas pueden ser mutaciones de aminoácido silenciosas o neutras, es decir, no tienen o tienen poco efecto sobre la capacidad de un anticuerpo para unirse al antígeno. Estos tipos de mutaciones pueden ser útiles para optimizar el uso de codones o mejorar la producción de anticuerpos de un hibridoma. Como alternativa, las mutaciones de aminoácido no neutras pueden alterar la capacidad de un anticuerpo para unirse al antígeno. Un experto en la técnica sería capaz de diseñar y probar moléculas mutantes con propiedades deseadas, tales como ausencia de alteración en la actividad de unión al antígeno o alteración en la actividad de unión (por ejemplo, mejoras en la actividad de unión al antígeno o cambio en la especificidad del anticuerpo). Después de la mutagénesis, la proteína codificada puede expresarse de manera rutinaria y la actividad funcional y/o biológica de la proteína codificada (por ejemplo, la capacidad de unirse de manera inmuno-específica al menos a un epítipo de un polipéptido SEMA4D) se puede determinar utilizando las técnicas descritas en la presente o mediante técnicas de modificación rutinarias conocidas en la técnica.

En ciertas realizaciones, los anticuerpos anti-SEMA4D para su uso en los métodos que se proporcionan en la presente comprenden al menos una región de determinación de complementariedad (CDR) optimizada. «CDR optimizada» se refiere a que la CDR se ha modificado y optimizado para mejorar la afinidad de unión y/o actividad anti-SEMA4D que se confiere a un anticuerpo anti-SEMA4D que comprende la CDR optimizada. «Actividad anti-SEMA4D» o «actividad de bloqueo de SEMA4D» puede incluir la actividad que modula una o más de las siguientes actividades asociadas con SEMA4D: activación, agregación y supervivencia de linfocitos B; proliferación inducida por CD40 y producción de anticuerpos; respuesta de anticuerpos a antígenos dependientes de linfocitos T; linfocitos T u otra proliferación de células inmunitarias; maduración de células dendríticas; desmielinización y degeneración axonal; apoptosis de precursores neurales pluripotentes y/u oligodendrocitos; inducción de la migración de células endoteliales; inhibición de la migración espontánea de monocitos; unión a la Plexina-B1 u otro receptor de la superficie celular, o cualquier otra actividad asociada con SEMA4D soluble o SEMA4D que se expresa en la superficie de las células SEMA4D+. La actividad anti-SEMA4D también se puede atribuir a una disminución en la incidencia o gravedad de las enfermedades asociadas con la expresión de SEMA4D, incluidos, sin carácter limitante, ciertos tipos de cánceres, incluidos linfomas, enfermedades autoinmunitarias, enfermedades inflamatorias incluidas enfermedades inflamatorias del sistema nervioso central (SNC) y sistema nervioso periférico (SNP), rechazo de trasplante y angiogénesis invasiva. Se describen ejemplos de anticuerpos optimizados basados en los MAbs anti-SEMA4D murinos BD16 y BB18 en la publicación de EE. UU. N.º 2008/0219971 A1, solicitud de patente internacional WO 93/14125 y Herold *et al.*, *Int. Immunol.* 7(1): 1-8 (1995). Las modificaciones pueden conllevar el reemplazo de residuos aminoacídicos dentro de la CDR de modo que un anticuerpo anti-SEMA4D mantenga la especificidad por el antígeno SEMA4D y tenga una afinidad de unión mejorada y/o una actividad anti-SEMA4D mejorada.

#### IV. Métodos de tratamiento utilizando anticuerpos terapéuticos anti-SEMA4D

Los métodos de la invención se refieren al uso de moléculas de unión anti-SEMA4D, por ejemplo, anticuerpos, incluidos fragmentos de unión al antígeno, variantes y derivados de estos, para tratar la aterosclerosis en un sujeto que padece aterosclerosis. En ciertas realizaciones, las células endoteliales expresan un receptor de SEMA4D, en ciertas realizaciones el receptor es Plexina-B1. Aunque la siguiente discusión se refiere a la administración de un anticuerpo anti-SEMA4D, los métodos descritos en la presente también son aplicables a los fragmentos de unión al antígeno, variantes y derivados de estos anticuerpos anti-SEMA4D que mantienen las propiedades deseadas de los anticuerpos anti-SEMA4D, por ejemplo, capaces de unirse de manera específica a SEMA4D, por ejemplo, SEMA4D humana, de ratón o humana y de ratón, tener actividad neutralizante de SEMA4D, y/o bloquear la interacción de SEMA-4D con su receptor, por ejemplo, Plexina-B1. Los métodos descritos en la presente también son aplicables a otros productos biológicos o fármacos que son moléculas de bajo peso molecular que mantienen las propiedades

deseadas de los anticuerpos, por ejemplo, capaces de unirse de manera específica a SEMA4D, por ejemplo, SEMA4D humana, de ratón o humana y de ratón, tener actividad neutralizante de SEMA4D, y/o bloquear la interacción de SEMA4D con sus receptores.

5 En una realización, el tratamiento incluye la aplicación o administración de una molécula de unión anti-SEMA4D, por ejemplo, un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este como se describe en la presente a un paciente, donde el paciente tiene o está en riesgo de desarrollar una arteriopatía coronaria. En otra realización, también se pretende que el tratamiento incluya la aplicación o administración de una composición farmacéutica que comprende la molécula de unión anti-SEMA4D, por ejemplo, un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este a un paciente, donde el  
10 paciente tiene o está en riesgo de desarrollar una arteriopatía coronaria.

Las moléculas de unión anti-SEMA4D, por ejemplo, anticuerpos o fragmentos de unión de estos como se describe en la presente son útiles para el tratamiento de enfermedades inflamatorias, incluida la aterosclerosis. En algunas realizaciones, el tratamiento de la aterosclerosis puede reducir, inhibir, suprimir y/o retrasar la formación de placas ateroscleróticas y/o reducir, inhibir, suprimir y/o retrasar el crecimiento de las placas ateroscleróticas. Las placas ateroscleróticas son acumulaciones de grasa, colesterol, calcio y otras sustancias que se encuentran en la sangre que endurecen y estrechan las arterias con el tiempo, lo que limita, de ese modo, el flujo de sangre rica en oxígeno a los  
15 órganos y otras partes del cuerpo.

20 En otras realizaciones, el tratamiento de la aterosclerosis puede reducir o disminuir la neovascularización que ocurre en las placas ateroscleróticas o a su alrededor. La neovascularización ocurre en las placas ateroscleróticas de la aorta humana y las arterias coronarias (Carmeliet P, *Nature Med* 9: 653-660, 2003; y Zhang Y *et al.*, *Am J Pathol* 143: 164-172, 1993). Estos vasos nuevos se derivan originalmente de los vasos vasculares adventicios y sirven para nutrir el crecimiento aterosclerótico del engrosamiento de la íntima (Kumamoto M *et al.*, *Hum Pathol* 26: 450-456, 1995). Por lo tanto, la neovascularización es una causa importante de crecimiento y desestabilización de la placa aterosclerótica (Barger AC *et al.*, *N Engl J Med* 310: 175-177, 1984). Varios estudios exploran el mecanismo por el cual la neovascularización facilita la formación del ateroma (Moreno PR *et al.*, *Circulation* 113: 2245-2252, 2006; y Cheng XW *et al.*, *Hypertension* 57:981-989, 2011). Dado que la densidad de los vasos vasculares se correlaciona de manera importante con el número de células mononucleares inflamatorias que se infiltran en la placa, se considera que la  
25 formación de nuevos vasos en la placa proporciona sitios de entrada cruciales para la migración de leucocitos a la placa aterosclerótica (O'Brien ER *et al.*, *Am J Pathol* 145: 883-894, 1994; y Moulton KS *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 4736-4741, 2003). La hemorragia de los nuevos vasos de la placa aumenta aún más el tamaño de la placa al favorecer el depósito de lípidos sanguíneos en el núcleo lipídico del ateroma (Kolodgie FD *et al.*, *N Engl J Med* 349: 2316-25, 2003). Se ha mostrado que los inhibidores de la angiogénesis, incluida la angiostatina o TNP-4570, suprimen el crecimiento de la placa al disminuir la formación de nuevos vasos en ratones con deficiencia de apolipoproteína E (ApoE<sup>-/-</sup>) propensos a la aterosclerosis, lo que indica la importancia funcional de la neovascularización en la evolución de la aterosclerosis (Moulton KS *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 4736-4741, 2003; y Moulton KS *et al.*, *Circulation* 99: 1726-32, 1999). Además, los nuevos vasos formados en la placa aterosclerótica pueden exacerbar la aterosclerosis al aumentar la cantidad de metaloproteínasa secretada en la placa desde la sangre e inducir en última instancia la ruptura de la placa y la formación de trombos (Jonsson-Rylander AC *et al.*, *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25: 180-185, 2005.).  
30  
35  
40

En otras realizaciones, las moléculas de unión anti-SEMA4D, por ejemplo, anticuerpos o fragmentos de unión de estos como se describen en la presente pueden ser útiles para el tratamiento de otras enfermedades inflamatorias. Los ejemplos de tales enfermedades pueden incluir, sin carácter limitante, enfermedades cardiovasculares, artritis reumatoide, enfermedades gastroenterológicas, enfermedades neuroinflamatorias (por ejemplo, esclerosis múltiple) e incluso ciertos tipos de cáncer (por ejemplo, carcinoma de vesícula biliar).  
45

En una realización, la divulgación se refiere al uso de moléculas de unión anti-SEMA4D, por ejemplo, anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno, variantes o derivados de estos, como un medicamento, en particular para el uso en el tratamiento o profilaxis de la aterosclerosis para inhibir, reducir, prevenir, minimizar y/o retrasar la formación de placas ateroscleróticas y/o inhibir, reducir, prevenir, minimizar y/o retrasar la neovascularización en las placas ateroscleróticas.  
50

De acuerdo con los métodos de la presente divulgación, al menos una molécula de unión anti-SEMA4D, por ejemplo, un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno, variante o derivado de este, como se define en otra parte de la presente, se puede utilizar para promover una respuesta terapéutica positiva con respecto a la aterosclerosis. Una «respuesta terapéutica positiva» con respecto a la aterosclerosis se pretende que incluya una mejora en la enfermedad en asociación con la formación de las placas, neovascularización de las placas, crecimiento de las placas y/o una mejora en los síntomas asociados con la enfermedad. Es decir, se puede observar retraso de la formación de las placas ateroscleróticas, reducción de la neovascularización de las placas, reducción de la inflamación, disminución del crecimiento de las placas, combinaciones de estas, y similares. Tales respuestas terapéuticas positivas no se limitan a la vía de administración y pueden comprender la administración al donante, al tejido donante (tal como, por ejemplo, perfusión de órgano), al hospedador, o cualquier combinación de estos, y similares. En particular, los métodos que se proporcionan en la presente se refieren a la inhibición, prevención, reducción, alivio o disminución del desarrollo de aterosclerosis en un paciente. Por lo tanto, por ejemplo, se puede caracterizar una mejora en la enfermedad como  
55  
60  
65

una ausencia de síntomas observables clínicamente, una reducción, inhibición, supresión y/o retraso en la formación de las placas o crecimiento de las placas, una reducción, inhibición, supresión y/o retraso en la neovascularización, una reducción en la inflamación o un cambio en la morfología o función de las placas.

5 Las moléculas de unión anti-SEMA4D, por ejemplo, anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno, variantes o derivados de estos se pueden utilizar combinadas con al menos uno o más tratamientos diferentes para la aterosclerosis; donde la terapia adicional se administra antes, durante o a la vez que la terapia con la molécula de unión anti-SEMA4D, por ejemplo, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno, variante o derivado de este. Por lo tanto, cuando las terapias combinadas comprenden la administración de una molécula de unión anti-SEMA4D, por ejemplo, un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno, variante o derivado de este, combinada con la administración de otro agente terapéutico, los métodos engloban la coadministración, utilizando formulaciones separadas o una única formulación farmacéutica, con una administración simultánea o consecutiva en cualquier orden.

15 Para aplicar los métodos y sistemas de la divulgación en ciertas realizaciones, se pueden obtener muestras o imágenes de un paciente antes, después o tanto antes como después de la administración de una terapia que comprende: (1) una cantidad eficaz de una molécula de unión aislada que se une de manera específica a Semaforina-4D (SEMA4D); o (2) una cantidad eficaz de una molécula de unión aislada que se une de manera específica a Semaforina-4D (SEMA4D) a un sujeto que padece aterosclerosis o una enfermedad inflamatoria. En algunos casos, se pueden obtener muestras o imágenes sucesivas a partir del paciente después de que la terapia haya comenzado, después de que la terapia haya cesado o antes y después de la terapia. Las muestras o imágenes pueden, por ejemplo, ser requeridas por un profesional sanitario (por ejemplo, un médico) o un proveedor de prestaciones sanitarias, ser obtenidas y/o procesadas por el mismo profesional sanitario o uno diferente (por ejemplo, una enfermera, un hospital) o un laboratorio clínico, y después del procesamiento, los resultados se pueden enviar a otro profesional sanitario, proveedor de prestaciones sanitarias o al paciente. De manera similar, la medida/determinación de una o más calificaciones, comparaciones entre calificaciones, evaluación de las calificaciones y decisiones de tratamiento pueden ser realizadas por uno o más profesionales sanitarios, proveedores de prestaciones sanitarias y/o laboratorios clínicos.

30 Tal como se utiliza en la presente, la expresión «profesional sanitario» se refiere a individuos o instituciones que interactúan y prestan servicios directamente a sujetos vivos, por ejemplo, pacientes humanos. Los ejemplos no limitantes de profesionales sanitarios incluyen médicos, enfermeras, técnicos, terapeutas, farmacéuticos, orientadores psicológicos, profesionales de medicina alternativa, centros médicos, consultorios médicos, hospitales, servicios de urgencias, clínicas, centros de primeros auxilios, clínicas/establecimientos de medicina alternativa y cualquier otra entidad que proporcione tratamiento general y/o especializado, evaluación, mantenimiento, terapia, medicación y/o consejo relacionado con la totalidad, o cualquier parte, del estado de salud de un paciente, que incluye, sin carácter limitante, tratamiento, evaluación, mantenimiento, terapia, medicación y/o consejo médico general, médico especializado, quirúrgico y/o de cualquier otro tipo.

40 En algunos aspectos, un profesional sanitario puede administrar, o indicar a otro profesional sanitario que administre, una terapia que comprenda: (1) una cantidad eficaz de una molécula de unión aislada que se une de manera específica a Semaforina-4D (SEMA4D); o (2) una cantidad eficaz de una molécula de unión aislada que se une de manera específica a Semaforina-4D (SEMA4D), donde el sujeto, padece, o se sospecha que padece, aterosclerosis o una enfermedad inflamatoria. Un profesional sanitario puede implementar las siguientes acciones o indicar a otro profesional sanitario o paciente que las realice: obtener una muestra o imagen, procesar una muestra o imagen, enviar una muestra o imagen, recibir una muestra o imagen, transferir una muestra o imagen, analizar o medir una muestra o imagen, cuantificar una muestra o imagen, proporcionar los resultados obtenidos después de analizar/medir/cuantificar una muestra o imagen, recibir los resultados obtenidos después de analizar/medir/cuantificar una muestra o imagen, comparar/calificar los resultados obtenidos después de analizar/medir/cuantificar una o más muestras o imágenes, proporcionar la comparación/calificación de una o más muestras, obtener la comparación/calificación de una o más muestras o imágenes, administrar una terapia, por ejemplo, (1) una cantidad eficaz de una molécula de unión aislada que se une de manera específica a Semaforina-4D (SEMA4D); o (2) una cantidad eficaz de una molécula de unión aislada que se une de manera específica a Semaforina-4D (SEMA4D) a un sujeto, donde el sujeto padece, o se sospecha que padece, aterosclerosis o una enfermedad inflamatoria, comenzar la administración de una terapia, cesar la administración de una terapia, continuar la administración de una terapia, interrumpir de manera temporal la administración de una terapia, incrementar la cantidad de un agente terapéutico administrado, disminuir la cantidad de un agente terapéutico administrado, continuar con la administración de una cantidad de un agente terapéutico, incrementar la frecuencia de administración de un agente terapéutico, reducir la frecuencia de administración de un agente terapéutico, mantener la misma frecuencia de dosificación de un agente terapéutico, reemplazar una terapia o agente terapéutico por al menos otra terapia o agente terapéutico, combinar una terapia o agente terapéutico con al menos otra terapia o agente terapéutico adicional.

60 En algunos aspectos, un proveedor de prestaciones sanitarias puede autorizar o denegar, por ejemplo, la recogida de una muestra o imagen, el procesamiento de una muestra o imagen, el envío de una muestra o imagen, la recepción de una muestra o imagen, la transferencia de una muestra o imagen, el análisis o medida de una muestra o imagen, la cuantificación de una muestra o imagen, el aporte de resultados obtenidos después de analizar/medir/cuantificar una muestra o imagen, transferencia de los resultados obtenidos después de analizar/medir/cuantificar una muestra o imagen, comparación/calificación de los resultados obtenidos después de analizar/medir/cuantificar una o más

muestras o imágenes, transferencia de la comparación/calificación de una o más muestras o imágenes, administración de una terapia o agente terapéutico, inicio de la administración de una terapia o agente terapéutico, cese de la administración de una terapia o agente terapéutico, prolongación de la administración de una terapia o agente terapéutico, interrupción temporal de la administración de una terapia o agente terapéutico, aumento de la cantidad del agente terapéutico administrado, disminución de la cantidad del agente terapéutico administrado, prolongación de la administración de una cantidad de un agente terapéutico, aumento de la frecuencia de administración de un agente terapéutico, disminución de la frecuencia de administración de un agente terapéutico, mantenimiento de la misma frecuencia de dosificación de un agente terapéutico, reemplazo de una terapia o agente terapéutico por al menos otra terapia o agente terapéutico, o combinación de una terapia o agente terapéutico con al menos otra terapia o agente terapéutico adicional.

Además, un proveedor de prestaciones sanitarias puede, por ejemplo, autorizar o denegar la prescripción de una terapia, autorizar o denegar el pago de la terapia, autorizar o denegar el reembolso del coste de la terapia, determinar o denegar la elegibilidad para una terapia, etc.

En algunos aspectos, un laboratorio clínico puede, por ejemplo, recoger u obtener una muestra, procesar una muestra, enviar una muestra, recibir una muestra, transferir una muestra, analizar o medir una muestra, cuantificar una muestra, proporcionar los resultados obtenidos después de analizar/medir/cuantificar una muestra, recibir los resultados obtenidos después de analizar/medir/cuantificar una muestra, comparar/calificar los resultados obtenidos después de analizar/medir/cuantificar una o más muestras, proporcionar la comparación/calificación de una o más muestras, obtener la comparación/calificación de una o más muestras, u otras actividades relacionadas.

En algunos aspectos, un profesional sanitario, laboratorio clínico u otra entidad puede, por ejemplo, recoger u obtener una imagen, procesar una imagen, enviar una imagen, recibir una imagen, transferir una imagen, analizar o medir una imagen, cuantificar una imagen, proporcionar los resultados obtenidos después de analizar/medir/cuantificar una imagen, recibir los resultados obtenidos después de analizar/medir/cuantificar una imagen, comparar/calificar los resultados obtenidos después de analizar/medir/cuantificar una o más imágenes, proporcionar la comparación/calificación de una o más imágenes, obtener la comparación/calificación de una o más imágenes, u otras actividades relacionadas. Las imágenes que se pueden utilizar en tales aspectos incluyen, sin carácter limitante, imágenes obtenidas mediante angiografía coronaria, ecografía intravascular (IVUS, por sus siglas en inglés), ecografía carótida, tomografía computerizada coronaria (CT, por sus siglas en inglés), imágenes de resonancia magnética (MRI, por sus siglas en inglés), tomografía de emisión de positrones (PET, por sus siglas en inglés), tomografía de coherencia óptica (OCT, por sus siglas en inglés), espectroscopía del infrarrojo cercano (NIRS, por sus siglas en inglés) y fluorescencia NIR. En ciertas realizaciones, se pueden utilizar las técnicas de obtención de imágenes que se han descrito en la bibliografía (Tardif *et al. Circ Cardiovasc Imaging* 4:319-333 (2011)).

#### VII. Métodos de diagnóstico y tratamiento

En ciertas realizaciones, esta divulgación proporciona métodos de tratamiento de un sujeto, por ejemplo, un paciente que padece aterosclerosis, donde el sujeto tiene niveles elevados de linfocitos B, linfocitos T o tanto linfocitos B como linfocitos T, que comprenden administrar una combinación de una cantidad eficaz de una molécula de unión aislada que se une de manera específica a Semaforina-4D (SEMA4D) si los niveles de linfocitos B, linfocitos T o tanto linfocitos B como linfocitos T del paciente están por encima de un nivel umbral predeterminado de linfocitos B, linfocitos T o tanto linfocitos B como linfocitos T, o están elevados respecto al nivel de linfocitos B, linfocitos T o tanto linfocitos B como linfocitos T, en una o más muestras de control que pueden incluir, sin carácter limitante, muestras de otros pacientes que padecen aterosclerosis o de pacientes sanos sin aterosclerosis. Un facultativo sanitario o laboratorio clínico puede medir los niveles de linfocitos B, linfocitos T o linfocitos B y linfocitos T, donde el facultativo sanitario o el laboratorio clínico obtiene una muestra, por ejemplo, una muestra de sangre, del paciente. En un aspecto, el nivel del paciente de linfocitos B, linfocitos T o tanto linfocitos B como linfocitos T se puede medir en un ensayo inmunofenotípico citométrico.

En ciertas realizaciones, esta divulgación también proporciona un método para tratar a un sujeto, por ejemplo, un paciente que padece aterosclerosis, que comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz de una molécula de unión aislada que se une de manera específica a Semaforina-4D (SEMA4D) si los niveles de proteína C-reactiva (CRP, por sus siglas en inglés) y/o lipoproteína de baja densidad (LDL, por sus siglas en inglés) en una muestra extraída del sujeto están por encima de niveles umbral predeterminados, o están elevados respecto a los niveles de CRP y/o LDL en una o más muestras de control. Un profesional sanitario o laboratorio clínico puede medir la expresión de los niveles de CRP y/o LDL en el sujeto. En ciertos aspectos, los niveles de CRP y/o LDL se pueden medir *in situ*, por ejemplo, mediante técnicas de obtención de imágenes. En ciertos aspectos, la expresión de los niveles de CRP y/o LDL se pueden medir en una muestra obtenida del sujeto. En un aspecto, los niveles de CRP y/o LDL se pueden medir en un inmunoensayo que emplea anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno de estos que reconocen CRP y/o LDL. En otro aspecto, los niveles de CRP y/o LDL se pueden medir mediante un ensayo de expresión génica cuantitativo, por ejemplo, ensayo RT-PCR.

Esta divulgación también proporciona métodos, ensayos y kits para facilitar la determinación por parte de un facultativo sanitario, un proveedor de prestaciones sanitarias o un laboratorio clínico, de si un sujeto, por ejemplo, un paciente

que padece aterosclerosis o una enfermedad inflamatoria, se beneficiará del tratamiento con: (1) una cantidad eficaz de una molécula de unión aislada que se une de manera específica a Semaforina-4D (SEMA4D); o (2) una cantidad eficaz de una molécula de unión aislada que se une de manera específica a Semaforina-4D (SEMA4D), donde el sujeto, padece, o se sospecha que padece, aterosclerosis o una enfermedad inflamatoria. Los métodos, ensayos y kits que se proporcionan en la presente también facilitarán una determinación por parte de un profesional sanitario, un proveedor de prestaciones sanitarias o un laboratorio clínico, de si un sujeto, por ejemplo, un paciente que padece aterosclerosis o una enfermedad inflamatoria, se beneficiará del tratamiento con (1) una cantidad eficaz de una molécula de unión aislada que se une de manera específica a Semaforina-4D (SEMA4D) y una cantidad eficaz de al menos una terapia de modulación inmunitaria diferente; o (2) una cantidad eficaz de una molécula de unión aislada que se une de manera específica a Semaforina-4D (SEMA4D).

La presente divulgación proporciona un método de tratamiento de un sujeto, por ejemplo, un paciente que padece aterosclerosis, que comprende administrar una cantidad eficaz de una molécula de unión aislada que se une de manera específica a Semaforina-4D (SEMA4D); si el nivel de linfocitos B, linfocitos T, o linfocitos T y linfocitos B en una muestra extraída del paciente está por encima de un nivel umbral predeterminado, o está por encima del nivel de linfocitos B, linfocitos T, o linfocitos T y linfocitos B en una o más muestras de control. En algunos aspectos, la muestra se obtiene del paciente y se envía para medir el nivel de linfocitos B, linfocitos T, o linfocitos T y linfocitos B en la muestra, por ejemplo, a un laboratorio clínico.

La presente divulgación también proporciona un método de tratamiento de un sujeto del que se ha determinado que tiene placas ateroscleróticas, por ejemplo, un paciente que padece aterosclerosis, que comprende administrar una cantidad eficaz de una molécula de unión aislada que se une de manera específica a Semaforina-4D (SEMA4D). En ciertas realizaciones, se determina que el sujeto tiene placas ateroscleróticas y se trata si el número, tamaño o características de las placas ateroscleróticas en el paciente está por encima de un número, tamaño o carácter umbral predeterminado, o si el número, tamaño o carácter de las placas ateroscleróticas en el sujeto es indicativo de aterosclerosis cuando se compara con una o más muestras de control. En algunos aspectos, la muestra se obtiene del paciente y se envía para medir el nivel de CRP y/o LDL en la muestra, por ejemplo, a un laboratorio clínico. En otros aspectos, el paciente se somete a una técnica de obtención de imágenes para determinar el número, tamaño o carácter de las placas ateroscleróticas. Las imágenes que se pueden utilizar en tales métodos incluyen, sin carácter limitante, imágenes obtenidas mediante angiografía coronaria, ecografía intravascular (IVUS), ecografía carótida, tomografía computarizada coronaria (CT), imágenes de resonancia magnética (MRI), tomografía de emisión de positrones (PET), tomografía de coherencia óptica (OCT), espectroscopía del infrarrojo cercano (NIRS) y fluorescencia NIR. En ciertas realizaciones, se pueden utilizar las técnicas de obtención de imágenes que se han descrito en la bibliografía (Tardif *et al. Circ Cardiovasc Imaging* 2011;4:319-333). En ciertas realizaciones, se administra el tratamiento si las placas ateroscleróticas son «placas ateroscleróticas vulnerables» que tienen características que incluyen, sin carácter limitante, núcleos lipídicos grandes, contenido de SMC bajo, contenido de macrófagos elevado y una cubierta fibrosa delgada. La presencia de «placas ateroscleróticas vulnerables» en un sujeto se puede determinar mediante un sistema de calificación (Virmani *et al. Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20(5): 1262-75 (2000)) u otras técnicas (van Lammeren *et al., Current Cardiology Reviews* 7:22-27 (2011)). En ciertas realizaciones, los sujetos de los que se ha determinado que tienen tales «placas ateroscleróticas vulnerables» se tratan de acuerdo con los métodos que se proporcionan en la presente.

También se proporciona un método de tratamiento de un sujeto, por ejemplo, un paciente que padece aterosclerosis, que comprende (a) enviar una muestra extraída del sujeto para medir el nivel de linfocitos B, linfocitos T, o linfocitos T y linfocitos B, o para medir la CRP y/o LDL en la muestra; y (b) administrar una cantidad eficaz de una molécula de unión aislada que se une de manera específica a Semaforina-4D (SEMA4D) al sujeto si el nivel del sujeto de linfocitos B, linfocitos T, o linfocitos T y linfocitos B, o el nivel del sujeto de CRP y/o LDL, está por encima de un nivel umbral predeterminado, o está por encima del nivel de linfocitos B, linfocitos T, o linfocitos T y linfocitos B, o el nivel de CRP y/o LDL, en una o más muestras de control.

La divulgación también proporciona un método de tratamiento de un sujeto, por ejemplo, un paciente que padece aterosclerosis, que comprende (a) medir el nivel de linfocitos B, linfocitos T, o linfocitos T y linfocitos B en una muestra obtenida de un sujeto, por ejemplo, un paciente que padece aterosclerosis, donde el nivel del sujeto de linfocitos B, linfocitos T, o linfocitos T y linfocitos B en la muestra se mide, por ejemplo, en un ensayo inmunofenotípico citométrico; (b) determinar si el nivel de linfocitos B, linfocitos T, o linfocitos T y linfocitos B en la muestra está por encima de un nivel umbral predeterminado, o está por encima del nivel de linfocitos B, linfocitos T, o linfocitos T y linfocitos B en una o más muestras de control; y (c) aconsejar, indicar o autorizar a un profesional sanitario a administrar una cantidad eficaz de una molécula de unión aislada que se une de manera específica a Semaforina-4D (SEMA4D) al sujeto si el nivel del sujeto de linfocitos B, linfocitos T, o linfocitos T y linfocitos B está por encima de un nivel umbral predeterminado, o está por encima del nivel de linfocitos B, linfocitos T, o linfocitos T y linfocitos B en una o más muestras de control.

En algunos aspectos, el nivel del paciente de linfocitos B, linfocitos T, o linfocitos T y linfocitos B se puede medir en un ensayo inmunofenotípico citométrico. En ciertos aspectos, el facultativo sanitario que trata al paciente puede realizar el ensayo en una muestra obtenida del sujeto, por ejemplo, utilizando un ensayo como se describe en la presente, formulado como un kit diagnóstico de «análisis inmediato». En algunos aspectos, se puede obtener una

muestra del sujeto y se puede enviar, por ejemplo, a un laboratorio clínico, para medir el nivel de linfocitos B, linfocitos T, o linfocitos T y linfocitos B en la muestra de acuerdo con las instrucciones del facultativo sanitario, incluida, sin carácter limitante, la utilización de un ensayo inmunofenotípico citométrico como se describe en la presente. En ciertos aspectos, el laboratorio clínico que realiza el ensayo puede aconsejar al profesional sanitario o un proveedor de prestaciones sanitarias sobre si el sujeto se puede beneficiar del tratamiento con una cantidad eficaz de una molécula de unión aislada que se une de manera específica a Semaforina-4D (SEMA4D), si el nivel del sujeto de linfocitos B, linfocitos T, o linfocitos T y linfocitos B está por encima de un nivel umbral predeterminado, o está por encima del nivel de linfocitos B, linfocitos T, o linfocitos T y linfocitos B en una o más muestras de control.

En ciertos aspectos, los resultados de un inmunoensayo, otro ensayo diagnóstico y/o técnica de obtención de imágenes se pueden enviar al proveedor de prestaciones sanitarias para determinar si la aseguradora del paciente cubrirá el tratamiento con una molécula de unión aislada que se une de manera específica a Semaforina-4D (SEMA4D).

#### VIII. Composiciones farmacéuticas y métodos de administración

Los expertos en la técnica están muy familiarizados con los métodos de preparación y administración de molécula de unión anti-SEMA4D, por ejemplo, anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno, variantes o derivados de estos, a un sujeto que lo necesita o pueden determinarlos fácilmente. La vía de administración de la molécula de unión anti-SEMA4D, por ejemplo, anticuerpo, o fragmento de unión al antígeno, variante o derivado de este, puede ser, por ejemplo, oral, parenteral, por inhalación o tópica. El término parenteral, como se utiliza en la presente, incluye, por ejemplo, la administración intravenosa, intraarterial, intraperitoneal, intramuscular, subcutánea, rectal o vaginal. Aunque todas estas formas de administración están claramente contempladas por el alcance de la invención para su uso, un ejemplo de una forma para la administración sería una solución para inyección, en particular, para la inyección intravenosa o intraarterial o sistema de infusión intravenosa. Una composición farmacéutica adecuada para la inyección puede comprender un tampón (por ejemplo, tampón de acetato, fosfato o citrato), un surfactante (por ejemplo, polisorbato), opcionalmente un agente estabilizante (por ejemplo, albúmina humana), etc. Sin embargo, en otros métodos compatibles con el contenido de la presente, las moléculas de unión anti-SEMA4D, por ejemplo, anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno, variantes o derivados de estos, se pueden suministrar directamente en el sitio de la población celular adversa para incrementar de esta manera la exposición del tejido enfermo al agente terapéutico.

Como se analiza en la presente, las moléculas de unión anti-SEMA4D, por ejemplo, anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno, variantes o derivados de estos, se pueden administrar en una cantidad farmacéuticamente eficaz para el tratamiento *in vivo* de trastornos inflamatorios. En este sentido, se apreciará que las moléculas de unión divulgadas se pueden formular de manera que se facilite la administración y se favorezca la estabilidad del agente activo. En ciertas realizaciones, las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la presente comprenden un portador estéril, atóxico, farmacéuticamente aceptable tal como solución salina fisiológica, tampones atóxicos, conservantes y similares. A efectos de la presente solicitud, se considerará que una cantidad farmacéuticamente eficaz de una molécula de unión anti-SEMA4D, por ejemplo, un anticuerpo, o fragmento de unión al antígeno, variante o derivado de este, se refiere a una cantidad suficiente para conseguir una unión eficaz a una diana y para conseguir un beneficio, por ejemplo, para reducir, inhibir, suprimir y/o retrasar la formación o crecimiento de placas en un paciente con aterosclerosis.

Las composiciones farmacéuticas comprenden portadores farmacéuticamente aceptables incluidos, por ejemplo, intercambiadores iónicos, alúmina, estearato de aluminio, lecitina, proteínas séricas tales como albúmina sérica humana, sustancias tamponantes tales como fosfatos, glicina, ácido sórbico, sorbato de potasio, mezclas de glicéridos parciales de ácidos grasos vegetales saturados, agua, sales o electrolitos tales como sulfato de protamina, hidrogenofosfato de sodio, hidrogenofosfato de potasio, cloruro de sodio, sales de zinc, sílice coloidal, trisilicato de magnesio, polivinilpirrolidona, sustancias de base celulósica, polietilenglicol, carboximetilcelulosa de sodio, poliácridatos, ceras, polímeros en bloque de polietileno-polioxiopropileno, polietilenglicol y grasa de lana.

Los preparados para la administración parenteral incluyen soluciones, suspensiones y emulsiones acuosas o no acuosas estériles. Son ejemplos de disolventes no acuosos el propilenglicol, polietilenglicol, aceites vegetales tales como aceite de oliva, y ésteres orgánicos inyectables tales como oleato de etilo. Los portadores acuosos incluyen, por ejemplo, agua, soluciones, emulsiones o suspensiones alcohólicas/acuosas, que incluyen la solución salina y medios tamponados. Los portadores farmacéuticamente aceptables incluyen, sin carácter limitante, tampón fosfato 0,01-0,1 M, por ejemplo, 0,05 M o solución salina al 0,8%. Otros vehículos parenterales comunes incluyen soluciones de fosfato de sodio, dextrosa de Ringer, dextrosa y cloruro de sodio, Ringer lactato o aceites fijos. Los vehículos intravenosos incluyen reaprovisionadores de nutrientes y fluidos, reaprovisionadores de electrolitos, tales como los basados en Ringer dextrosa y similares. También pueden estar presentes conservantes y otros aditivos tales como, por ejemplo, antimicrobianos, antioxidantes, agentes quelantes y gases inertes y similares.

Más particularmente, las composiciones farmacéuticas adecuadas para el uso inyectable incluyen las soluciones acuosas estériles (cuando haya solubilidad en agua) o dispersiones y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles. En tales casos, la composición debe ser estéril y debe ser fluida hasta el punto en que sea fácil administrarla con jeringuilla. Debería ser estable en las condiciones de preparación y almacenamiento y en algunos aspectos se puede proteger frente a la acción contaminante de

- microorganismos, tales como bacterias y hongos. El portador puede ser un disolvente o medio de dispersión que contenga, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido y similares) y mezclas adecuadas de estos. Se puede mantener la fluidez adecuada, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de una dispersión y mediante el uso de surfactantes. Las formulaciones adecuadas para su uso en los métodos terapéuticos divulgados en la presente se describen en Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Publishing Co.) 16.<sup>a</sup> ed. (1980).
- Se puede lograr evitar la acción de microorganismos mediante diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido ascórbico, trimerosal y similares. En ciertos aspectos, las composiciones farmacéuticas pueden incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes, tales como manitol, sorbitol, o cloruro de sodio en la composición. Se puede conseguir la absorción prolongada de las composiciones inyectables incluyendo en la composición un agente que retrase la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.
- En cualquier caso, las soluciones inyectables estériles se pueden preparar incorporando un compuesto activo (por ejemplo, un anticuerpo anti-SEMA4D o fragmento de unión al antígeno, variante o derivado de este, por si solo o combinado con otros agentes activos) en la cantidad requerida en un disolvente apropiado con uno o una combinación de ingredientes enumerados en la presente, según se necesite, y después esterilización por filtración. Por lo general, las dispersiones se preparan incorporando el compuesto activo al vehículo estéril, que contiene un medio de dispersión básico y los otros ingredientes requeridos de entre los enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, en algunos aspectos, los métodos de preparación incluyen secado al vacío y liofilización, que genera un polvo de un principio activo más cualquier ingrediente deseado adicional de una solución esterilizada por filtración previamente de este. Los preparados para las inyecciones se procesan, con ellos se rellenan envases tales como ampollas, bolsas, botellas, jeringuillas o viales, y se sellan en condiciones asépticas de acuerdo con métodos conocidos en la técnica. Además, los preparados se pueden empaquetar y vender en forma de un kit. Tales artículos de producción pueden tener etiquetas o prospectos que indican que las composiciones asociadas son útiles para tratar a un sujeto que padece o que está predispuesto a una enfermedad o trastorno.
- Las formulaciones parenterales pueden ser una dosis en bolo única, una infusión o dosis en bolo de carga y después una dosis de mantenimiento. Las composiciones se pueden administrar a intervalos específicos fijos o variables, por ejemplo, una vez al día o «según se necesite».
- Ciertas composiciones farmacéuticas se pueden administrar por vía oral en una forma farmacéutica aceptable incluidos, por ejemplo, cápsulas, comprimidos, suspensiones o soluciones acuosas. Ciertas composiciones farmacéuticas también se pueden administrar mediante aerosol nasal o inhalación. Tales composiciones se pueden preparar como soluciones en solución salina, empleando alcohol bencílico u otros conservantes adecuados, promotores de la absorción para potenciar la biodisponibilidad y/o otros agentes solubilizantes o dispersantes convencionales.
- La cantidad de una molécula de unión anti-SEMA4D, por ejemplo, anticuerpo o fragmento, variante o derivado de este, que se va a combinar con los materiales portadores para producir una forma farmacéutica única variará dependiendo del hospedador tratado y el modo particular de administración. La composición se puede administrar como una dosis única, dosis múltiples o en una infusión a lo largo de un periodo de tiempo establecido. Los regímenes posológicos también se pueden ajustar para proporcionar la respuesta deseada óptima (por ejemplo, una respuesta terapéutica o profiláctica).
- Conforme al alcance de la presente divulgación, los anticuerpos anti-SEMA4D o fragmentos de unión al antígeno, variantes o derivados de estos, se pueden administrar a un ser humano u otro animal de acuerdo con los métodos de tratamiento mencionados anteriormente en una cantidad suficiente para producir un efecto terapéutico. Los anticuerpos anti-SEMA4D o fragmentos de unión al antígeno, variantes o derivados de estos se pueden administrar a dicho ser humano u otro animal en una forma farmacéutica convencional preparada combinando el anticuerpo con un portador o diluyente farmacéuticamente aceptable convencional de acuerdo con técnicas conocidas. El experto en la técnica reconocerá que la forma y carácter del portador o diluyente farmacéuticamente aceptable están dictados por la cantidad de principio activo con la que se combinará, la vía de administración y otras variables muy conocidas. Los expertos en la técnica apreciarán además que se puede utilizar una combinación que comprende una o más especies de moléculas de unión anti-SEMA4D, por ejemplo, anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno, variantes o derivados de estos.
- «Dosis o cantidad terapéuticamente eficaz» o «cantidad eficaz» se refiere a una cantidad de molécula de unión anti-SEMA4D, por ejemplo, anticuerpo o fragmento de unión al antígeno, variante o derivado de este, que cuando se administra produce una respuesta terapéutica positiva con respecto al tratamiento de un paciente con una enfermedad que se va a tratar, por ejemplo, se difiere la formación de placas ateroscleróticas; reduce, retrasa o detiene un incremento en la formación de nuevas placas ateroscleróticas; inhibe, por ejemplo, suprime, retrasa, previene, detiene o revierte la neovascularización en las placas ateroscleróticas; cambia la morfología o función de las placas

ateroscleróticas; o alivia en cierta medida uno o más de los síntomas asociados con la aterosclerosis; reduce la morbimortalidad; mejora la calidad de vida; o una combinación de tales efectos.

5 Las dosis terapéuticamente eficaces de las composiciones, por ejemplo, para reducir, inhibir, suprimir y/o retrasar las placas ateroscleróticas, varía dependiendo de muchos factores diferentes, que incluyen el medio de administración, sitio diana, estado fisiológico del paciente, si el paciente es un ser humano o un animal, otra medicación administrada y si el tratamiento es profiláctico o terapéutico. En ciertas realizaciones, el paciente es un ser humano, pero también se pueden tratar los mamíferos no humanos, incluidos mamíferos transgénicos. Las dosificaciones de tratamiento se pueden titular utilizando métodos habituales conocidos por los expertos en la técnica para optimizar la seguridad y eficacia.

10 Un experto en la técnica puede determinar fácilmente la cantidad de al menos una molécula de unión anti-SEMA4D, por ejemplo, anticuerpo o fragmento de unión, variante o derivado de este, que se va a administrar sin una experimentación excesiva tras leer la presente divulgación. Los factores que influyen el modo de administración y la cantidad respectiva de al menos una molécula de unión anti-SEMA4D, por ejemplo, anticuerpo, fragmento de unión al antígeno, variante o derivado de este, incluyen, sin carácter limitante, la gravedad de la enfermedad, los antecedentes de la enfermedad y la edad, altura, peso, salud y estado físico del individuo que se está sometiendo a la terapia. De manera similar, la cantidad de molécula de unión anti-SEMA4D, por ejemplo, anticuerpo o fragmento, variante o derivado de este, que se va a administrar dependerá del modo de administración y de si el sujeto recibirá una única dosis o múltiples dosis de este agente.

15 La divulgación también proporciona el uso de una molécula de unión anti-SEMA4D, por ejemplo, anticuerpo o fragmento de unión al antígeno, variante o derivado de este, en la producción de un medicamento para tratar a un sujeto con un trastorno inflamatorio, donde el medicamento se utiliza en un sujeto que ha sido pretratado con al menos una terapia diferente. «Pretratado» o «pretratamiento» se refiere a que el sujeto ha recibido una o más terapias diferentes (por ejemplo, ha sido tratado con al menos otra terapia inflamatoria) antes de recibir el medicamento que comprende la molécula de unión anti-SEMA4D, por ejemplo, anticuerpo o fragmento de unión al antígeno, variante o derivado de este. «Pretratado» o «pretratamiento» incluye sujetos que han sido tratados con al menos una terapia diferente en un periodo de 2 años, en un periodo de 18 meses, en un periodo de 1 año, en un periodo de 6 meses, en un periodo de 2 meses, en un periodo de 6 semanas, en un periodo de 1 mes, en un periodo de 4 semanas, en un periodo de 3 semanas, en un periodo de 2 semanas, en un periodo de 1 semana, en un periodo de 6 días, en un periodo de 5 días, en un periodo de 4 días, en un periodo de 3 días, en un periodo de 2 días o incluso en un periodo de 1 día antes de iniciar el tratamiento con el medicamento que comprende la molécula de unión anti-SEMA4D, por ejemplo, el anticuerpo monoclonal VX15/2503 divulgado en la presente o fragmento de unión al antígeno, variante o derivado de este. No es necesario que el sujeto haya respondido al pretratamiento con la terapia o terapias anteriores. Por lo tanto, el sujeto que recibe el medicamento que comprende la molécula de unión anti-SEMA4D, por ejemplo, un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno, variante o derivado de este, podría haber respondido, o podría no haber respondido, al pretratamiento con la terapia anterior, o a una o más de las terapias anteriores cuando el pretratamiento comprendió múltiples terapias.

20 La puesta en práctica de la presente invención empleará, a menos que se indique lo contrario, técnicas convencionales de biología celular, cultivo celular, biología molecular, biología transgénica, microbiología, ADN recombinante e inmunología, que pertenecen a las competencias de la técnica. Tales técnicas se explican completamente en la bibliografía. Véanse, por ejemplo, Sambrook *et al.*, ed. (1989) *Molecular Cloning A Laboratory Manual* (2.<sup>a</sup> ed.; Cold Spring Harbor Laboratory Press); Sambrook *et al.*, ed. (1992) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, (Cold Springs Harbor Laboratory, NY); D. N. Glover ed., (1985) *DNA Cloning*, Volúmenes I y II; Gait, ed. (1984) *Oligonucleotide Synthesis*; Mullis *et al.* patente de EE. UU. N.º 4 683 195; Hames y Higgins, eds. (1984) *Nucleic Acid Hybridization*; Hames y Higgins, eds. (1984) *Transcription And Translation*; Freshney (1987) *Culture Of Animal Cells* (Alan R. Liss, Inc.); *Immobilized Cells And Enzymes* (IRL Press) (1986); Perbal (1984) *A Practical Guide To Molecular Cloning*; the treatise, *Methods In Enzymology* (Academic Press, Inc., N.Y.); Miller y Calos eds. (1987) *Gene Transfer Vectors For Mammalian Cells*, (Cold Spring Harbor Laboratory); Wu *et al.*, eds., *Methods In Enzymology*, Vol. 154 y 155; Mayer y Walker, eds. (1987) *Immunochemical Methods In Cell And Molecular Biology* (Academic Press, Londres); Weir y Blackwell, eds., (1986) *Handbook Of Experimental Immunology*, Volúmenes I-IV; *Manipulating the Mouse Embryo*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., (1986); y en Ausubel *et al.* (1989) *Current Protocols in Molecular Biology* (John Wiley and Sons, Baltimore, Md.).

25 Los principios generales de la modificación de anticuerpos se exponen en Borrebaeck, ed. (1995) *Antibody Engineering* (2.<sup>a</sup> ed.; Oxford Univ. Press). Los principios generales de la modificación de proteínas se exponen en Rickwood *et al.*, eds. (1995) *Protein Engineering, A Practical Approach* (IRL Press en Oxford Univ. Press, Oxford, Inglaterra). Los principios generales de unión de anticuerpos y anticuerpo-hapteno se exponen en: Nisonoff (1984) *Molecular Immunology* (2.<sup>a</sup> ed.; Sinauer Associates, Sunderland, Mass.); y Steward (1984) *Antibodies, Their Structure and Function* (Chapman y Hall, Nueva York, N.Y.). Además, se utilizan de manera general métodos estándar en inmunología conocidos en la técnica y que no se describen de manera específica, como en *Current Protocols in Immunology*, John Wiley & Sons, Nueva York; Stites *et al.*, eds. (1994) *Basic and Clinical Immunology* (8.<sup>a</sup> ed; Appleton & Lange, Norwalk, Conn.) y Mishell y Shiigi (eds) (1980) *Selected Methods in Cellular Immunology* (W.H. Freeman and Co., NY).

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

Los siguientes ejemplos se ofrecen a modo ilustrativo y no limitante.

### Ejemplos

**Ejemplo 1: Estudio de la capacidad de una molécula de unión anti-SEMA4D, por ejemplo, un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno, variante o derivado de este, por ejemplo, VX15/2503, para inhibir la formación de placas ateroscleróticas y reducir la neovascularización en ratones deficientes en ApoE con hiperlipidemia espontánea (SHL)**

**Diseño experimental.** El siguiente experimento examinó si el tratamiento con un anticuerpo bloqueante anti-SEMA4D de ratones deficientes en ApoE con hiperlipidemia espontánea (SHL, por sus siglas en inglés) propensos a la aterosclerosis pudo reducir el crecimiento de las placas y la neovascularización.

*Ratones.* Se obtuvieron ratones machos deficientes en apolipoproteína E (ApoE) con hiperlipidemia espontánea (SHL) con un acervo genético de C57BL/6, C57BL/6.KOR/Stm Slc-Apoe<sup>shl</sup> de Japan SLC, Inc. (Shizuoka, Japón). Los ratones SHL se alimentaron con una dieta normal y se alojaron en el centro animal en la Facultad de Farmacia, Universidad de Meijo. Todos los protocolos experimentales fueron aprobados por el Comité Revisor de Prácticas Éticas en Animales Institucional.

*Tratamiento con anticuerpos de los ratones.* Los ratones SHL machos de 14 semanas de edad se asignaron de manera aleatoria a dos grupos y a cada grupo se le administró anticuerpo monoclonal de ratón de control (n=10) (Control Ab 2B8.1E7, Vaccinex, Inc., Rochester, NY) o anticuerpo monoclonal neutralizante anti-SEMA4D de ratón (n=9) (VX15/67-2, Vaccinex, Inc.) en una cantidad de 0,6 mg por ratón mediante inyección intraperitoneal una vez a la semana. Después de 12 semanas de tratamiento, los ratones fueron sacrificados.

*Procesamiento del tejido.* La aorta del ratón recibió una perfusión durante 3 min mediante una aguja de calibre 21 insertada en el vértice ventricular izquierdo utilizando solución salina tamponada con fosfato (PBS) y después durante otros 3 min paraformaldehído tamponado al 4% (pH 7,4). Se escindieron el arco aórtico junto con sus principales puntos de ramificación (tronco braquiocéfálico, arteria carótida común izquierda y arteria subclavia izquierda) así como también la aorta torácica y abdominal y se fijaron en paraformaldehído tamponado al 4% (pH 7,4). La aorta se tiñó a continuación con Sudán IV (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) para revelar los depósitos lipídicos sudanófilos y se cuantificó el porcentaje de área de la placa lipídica respecto al área aórtica total utilizando el software Image J (Wayne Rasband, NIH, Bethesda, MD) según la bibliografía (Dougherty A *et al.*, Methods in Molecular Biology, vol. 209: Transgenic Mouse Methods and Protocols. Humana Press Inc., Totowa, NJ, págs. 293-309, 2002).

*Inmunohistoquímica y morfometría.* El arco aórtico escindido de ratones anestesiados se fijó en paraformaldehído tamponado al 4% (pH 7,4). Todos los vasos fueron embebidos longitudinalmente en parafina y se cortaron en secciones en serie de 1 µm. Las secciones se inmunomarcaron con anticuerpo anti-CD31 de ratón (BD, Franklin Lakes, NJ) para teñir las células endoteliales. Posteriormente, se incubaron con polímero dextrano conjugado con anticuerpos secundarios y peroxidasa (DakoCytomation, Kyoto, Japón). Para detectar la neovascularización, las secciones se pretrataron con 10 µg/mL de proteinasa K (Life technologies Japan, Tokio, Japón) durante 15 min a temperatura ambiente y se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente con 7,5 mg/mL de isolectina B4 de *Bandeiraea simplicifolia* conjugada con fluoresceína (Sigma-Aldrich). La isolectina B4 (IB4) se une a residuos α-galactosilo terminales expresados por las células endoteliales. El grado de neovascularización se determinó como un porcentaje calculado dividiendo el área positiva para isolectina B4 o CD31 por el área de la placa respectiva utilizando el sistema de morfometría Image-J (Wayne Rasband).

*Análisis estadístico.* Los datos se expresaron como media ± D.E. Los ratones SHL tratados con anticuerpo anti-Sema4D se compararon con los ratones SHL tratados con anticuerpo de control utilizando la prueba de la *t* de Student. Los datos fueron estadísticamente significativos con \*p <0,05, \*\*p <0,01.

**El tratamiento con anticuerpo anti-Sema4D inhibió el desarrollo de las placas ateroscleróticas.** Para analizar el efecto del tratamiento con el anticuerpo anti-Sema4D en ratones SHL deficientes en ApoE en el desarrollo de la

aterosclerosis, las aortas disecadas tanto de ratones SHL tratados con anticuerpo de control como con anticuerpo anti-Sema4D se sometieron a una tinción sudanófila de depósitos lipídicos. La FIG. 1A muestra una inhibición significativa del desarrollo de la placa aterosclerótica en las regiones aórticas de ratones SHL tratados con anticuerpo anti-Sema4D cuando se compararon con el grupo tratado con anticuerpo de control. Como se muestra en la FIG. 1A, una medida cuantitativa de las áreas de las placas ateroscleróticas muestra que el porcentaje medio de áreas sudanófilas respecto a la región aórtica completa en ratones SHL tratados con anticuerpo anti-Sema4D fue significativamente menor que en el grupo tratado con anticuerpo de control (ratones tratados con anticuerpo anti-Sema4D:  $4,89 \pm 1,11\%$  frente a ratones tratados con anticuerpo de control:  $17,64 \pm 3,41\%$ ;  $p = 0,002$ ). Estos hallazgos demuestran que utilizar un anticuerpo anti-SEMA4D para bloquear la actividad de Sema4D durante la fase de evolución de la aterosclerosis disminuye el crecimiento de las placas.

**Menos neovascularización en las placas ateroscleróticas de ratones SHL tratados con un anticuerpo anti-Sema4D.** Para estudiar la formación de vasos nuevos en las placas ateroscleróticas, se empleó tinción de isolectina B4 para detectar la neovascularización tanto en placas de SHL tratados con anticuerpo de control como de placas de SHL tratados con anticuerpo anti-Sema4D. Los resultados revelaron que el porcentaje de tinción positiva para isolectina B4 en las placas tratadas con anticuerpo anti-Sema4D fue significativamente menor que en las placas de SHL tratados con anticuerpo de control (ratones SHL tratados con anticuerpo anti-Sema4D:  $0,35 \pm 0,04\%$  frente a ratones SHL tratados con anticuerpo de control:  $1,70 \pm 0,24\%$ ;  $P < 0,001$ , FIG. 1B).

La inmunohistoquímica utilizando anticuerpos contra CD31, un marcador de las células endoteliales, también mostró que las áreas positivas para CD31 se redujeron significativamente en las placas de SHL tratados con anticuerpo anti-Sema4D en comparación con las placas de SHL tratados con anticuerpo de control (ratones SHL tratados con anticuerpo anti-Sema4D:  $12,62 \pm 1,34\%$  frente a ratones SHL tratados con anticuerpo de control:  $19,30 \pm 1,22\%$ ;  $P = 0,012$ , FIG. 1C), lo que resalta una neovascularización deficiente en placas de ratones SHL tratados con anticuerpo anti-Sema4D.

Estos hallazgos demuestran que bloquear la actividad de Sema4D durante la fase de evolución de la aterosclerosis sirve para disminuir la neovascularización. Además, demuestran que el anticuerpo anti-SEMA4D bloquea la migración de células progenitoras endoteliales al interior de la placa aterosclerótica lo que, a su vez, conlleva un descenso tanto de la neovascularización de la placa como del crecimiento de la placa.

## LISTA DE SECUENCIAS

35 <110> Zauderer, Maurice  
 <120> USO DE MOLÉCULAS DE UNIÓN A SEMAFORINA-4D PARA EL TRATAMIENTO DE LA  
 ATEROSCLEROSIS  
 <130> 1843.0750000/EJH/BNC  
 <140> Para ser asignado  
 40 <141> Con la presente  
 <150> US 61/889,421  
 <151> 2013-10-10  
 <160> 48  
 <170> PatentIn versión 3.3  
 45 <210> 1  
 <211> 862  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 1

ES 2 821 814 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Phe Leu Gly Lys Asn Glu Asp Gly Lys Gly Arg Cys Pro Phe Asp Pro



ES 2 821 814 T3

Asp Asp Ser Val Thr Pro Ile Asp Asn Arg Pro Arg Leu Ile Lys Lys  
 405 410 415  
 Asp Val Asn Tyr Thr Gln Ile Val Val Asp Arg Thr Gln Ala Leu Asp  
 420 425 430  
 Gly Thr Val Tyr Asp Val Met Phe Val Ser Thr Asp Arg Gly Ala Leu  
 435 440 445  
 His Lys Ala Ile Ser Leu Glu His Ala Val His Ile Ile Glu Glu Thr  
 450 455 460  
 Gln Leu Phe Gln Asp Phe Glu Pro Val Gln Thr Leu Leu Leu Ser Ser  
 465 470 475 480  
 Lys Lys Gly Asn Arg Phe Val Tyr Ala Gly Ser Asn Ser Gly Val Val  
 485 490 495  
 Gln Ala Pro Leu Ala Phe Cys Gly Lys His Gly Thr Cys Glu Asp Cys  
 500 505 510  
 Val Leu Ala Arg Asp Pro Tyr Cys Ala Trp Ser Pro Pro Thr Ala Thr  
 515 520 525  
 Cys Val Ala Leu His Gln Thr Glu Ser Pro Ser Arg Gly Leu Ile Gln  
 530 535 540  
 Glu Met Ser Gly Asp Ala Ser Val Cys Pro Asp Lys Ser Lys Gly Ser  
 545 550 555 560  
 Tyr Arg Gln His Phe Phe Lys His Gly Gly Thr Ala Glu Leu Lys Cys  
 565 570 575  
 Ser Gln Lys Ser Asn Leu Ala Arg Val Phe Trp Lys Phe Gln Asn Gly  
 580 585 590  
 Val Leu Lys Ala Glu Ser Pro Lys Tyr Gly Leu Met Gly Arg Lys Asn  
 595 600 605  
 Leu Leu Ile Phe Asn Leu Ser Glu Gly Asp Ser Gly Val Tyr Gln Cys  
 610 615 620  
 Leu Ser Glu Glu Arg Val Lys Asn Lys Thr Val Phe Gln Val Val Ala  
 625 630 635 640  
 Lys His Val Leu Glu Val Lys Val Val Pro Lys Pro Val Val Ala Pro  
 645 650 655

ES 2 821 814 T3

Thr Leu Ser Val Val Gln Thr Glu Gly Ser Arg Ile Ala Thr Lys Val  
 660 665 670  
 Leu Val Ala Ser Thr Gln Gly Ser Ser Pro Pro Thr Pro Ala Val Gln  
 675 680 685  
 Ala Thr Ser Ser Gly Ala Ile Thr Leu Pro Pro Lys Pro Ala Pro Thr  
 690 695 700  
 Gly Thr Ser Cys Glu Pro Lys Ile Val Ile Asn Thr Val Pro Gln Leu  
 705 710 715 720  
 His Ser Glu Lys Thr Met Tyr Leu Lys Ser Ser Asp Asn Arg Leu Leu  
 725 730 735  
 Met Ser Leu Phe Leu Phe Phe Phe Val Leu Phe Leu Cys Leu Phe Phe  
 740 745 750  
 Tyr Asn Cys Tyr Lys Gly Tyr Leu Pro Arg Gln Cys Leu Lys Phe Arg  
 755 760 765  
 Ser Ala Leu Leu Ile Gly Lys Lys Lys Pro Lys Ser Asp Phe Cys Asp  
 770 775 780  
 Arg Glu Gln Ser Leu Lys Glu Thr Leu Val Glu Pro Gly Ser Phe Ser  
 785 790 795 800  
 Gln Gln Asn Gly Glu His Pro Lys Pro Ala Leu Asp Thr Gly Tyr Glu  
 805 810 815  
 Thr Glu Gln Asp Thr Ile Thr Ser Lys Val Pro Thr Asp Arg Glu Asp  
 820 825 830  
 Ser Gln Arg Ile Asp Asp Leu Ser Ala Arg Asp Lys Pro Phe Asp Val  
 835 840 845  
 Lys Cys Glu Leu Lys Phe Ala Asp Ser Asp Ala Asp Gly Asp  
 850 855 860  
 <210> 2  
 <211> 861  
 <212> PRT  
 <213> sp. murina  
 <400> 2  
 Met Arg Met Cys Ala Pro Val Arg Gly Leu Phe Leu Ala Leu Val Val  
 1 5 10 15

5

ES 2 821 814 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Pro Ser Phe Val Phe Ala Asp Val Ile Gln Lys Ser Pro Asp Gly Pro  
 210 215 220

Glu Gly Glu Asp Asp Lys Val Tyr Phe Phe Phe Thr Glu Val Ser Val  
 225 230 235 240

Glu Tyr Glu Phe Val Phe Lys Leu Met Ile Pro Arg Val Ala Arg Val  
 245 250 255

Cys Lys Gly Asp Gln Gly Gly Leu Arg Thr Leu Gln Lys Lys Trp Thr  
 260 265 270

ES 2 821 814 T3

Ser Phe Leu Lys Ala Arg Leu Ile Cys Ser Lys Pro Asp Ser Gly Leu  
 275 280 285

Val Phe Asn Ile Leu Gln Asp Val Phe Val Leu Arg Ala Pro Gly Leu  
 290 295 300

Lys Glu Pro Val Phe Tyr Ala Val Phe Thr Pro Gln Leu Asn Asn Val  
 305 310 315 320

Gly Leu Ser Ala Val Cys Ala Tyr Thr Leu Ala Thr Val Glu Ala Val  
 325 330 335

Phe Ser Arg Gly Lys Tyr Met Gln Ser Ala Thr Val Glu Gln Ser His  
 340 345 350

Thr Lys Trp Val Arg Tyr Asn Gly Pro Val Pro Thr Pro Arg Pro Gly  
 355 360 365

Ala Cys Ile Asp Ser Glu Ala Arg Ala Ala Asn Tyr Thr Ser Ser Leu  
 370 375 380

Asn Leu Pro Asp Lys Thr Leu Gln Phe Val Lys Asp His Pro Leu Met  
 385 390 395 400

Asp Asp Ser Val Thr Pro Ile Asp Asn Arg Pro Lys Leu Ile Lys Lys  
 405 410 415

Asp Val Asn Tyr Thr Gln Ile Val Val Asp Arg Thr Gln Ala Leu Asp  
 420 425 430

Gly Thr Phe Tyr Asp Val Met Phe Ile Ser Thr Asp Arg Gly Ala Leu  
 435 440 445

His Lys Ala Val Ile Leu Thr Lys Glu Val His Val Ile Glu Glu Thr  
 450 455 460

Gln Leu Phe Arg Asp Ser Glu Pro Val Leu Thr Leu Leu Ser Ser  
 465 470 475 480

Lys Lys Gly Arg Lys Phe Val Tyr Ala Gly Ser Asn Ser Gly Val Val  
 485 490 495

Gln Ala Pro Leu Ala Phe Cys Glu Lys His Gly Ser Cys Glu Asp Cys  
 500 505 510

Val Leu Ala Arg Asp Pro Tyr Cys Ala Trp Ser Pro Ala Ile Lys Ala



ES 2 821 814 T3

Ala Leu Leu Leu Gly Lys Lys Thr Pro Lys Ser Asp Phe Ser Asp Leu  
770 775 780

Glu Gln Ser Val Lys Glu Thr Leu Val Glu Pro Gly Ser Phe Ser Gln  
785 790 795 800

Gln Asn Gly Asp His Pro Lys Pro Ala Leu Asp Thr Gly Tyr Glu Thr  
805 810 815

Glu Gln Asp Thr Ile Thr Ser Lys Val Pro Thr Asp Arg Glu Asp Ser  
820 825 830

Gln Arg Ile Asp Glu Leu Ser Ala Arg Asp Lys Pro Phe Asp Val Lys  
835 840 845

Cys Glu Leu Lys Phe Ala Asp Ser Asp Ala Asp Gly Asp  
850 855 860

5 <210> 3  
 <211> 30  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Polinucleótido de CDR1 de VH anti-CD100  
 <400> 3  
 ggctacagct tcagcgacta ctacatgcac 30  
 10 <210> 4  
 <211> 51  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 15 <223> Polinucleótido de CDR2 de VH anti-CD100  
 <400> 4  
 cagattaatc ctaccactgg cggcgctagc tacaaccaga agttcaaggg c 51  
 <210> 5  
 <211> 27  
 20 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Polinucleótido de CDR3 de VH anti-CD100  
 <400> 5  
 25 tattactacg gcagacactt cgatgtc 27  
 <210> 6  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 30 <220>  
 <223> Polipéptido de CDR1 de VH anti-CD100  
 <400> 6  
 Gly Tyr Ser Phe Ser Asp Tyr Tyr Met His  
 1 5 10  
 <210> 7  
 35 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Polipéptido de CDR2 de VH anti-CD100  
 <400> 7  
 40 Gln Ile Asn Pro Thr Thr Gly Gly Ala Ser Tyr Asn Gln Lys Phe Lys  
 1 5 10 15  
 Gly  
 <210> 8

ES 2 821 814 T3

<211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 <220>  
 5 <223> Polipéptido de CDR3 de VH anti-CD100  
 <400> 8  
 Tyr Tyr Tyr Gly Arg His Phe Asp Val  
 1 5  
 <210> 9  
 10 <211> 118  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Polipéptido de VH de 2503 anti-CD100  
 <400> 9  
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser  
 1 5 10 15  
  
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Ser Asp Tyr  
 20 25 30  
  
 Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met  
 35 40 45  
 15 Gly Gln Ile Asn Pro Thr Thr Gly Gly Ala Ser Tyr Asn Gln Lys Phe  
 50 55 60  
  
 Lys Gly Lys Ala Thr Ile Thr Val Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80  
  
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
  
 Ala Arg Tyr Tyr Tyr Gly Arg His Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr  
 100 105 110  
  
 Thr Val Thr Val Ser Ser  
 115  
 20 <210> 10  
 <211> 118  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Polipéptido de VH de 67 anti-CD100  
 <400> 10

ES 2 821 814 T3

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala  
 1 5 10 15  
 Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Ser Asp Tyr  
 20 25 30  
 Tyr Met His Trp Val Lys Gln Ser Pro Glu Asn Ser Leu Glu Trp Ile  
 35 40 45  
 Gly Gln Ile Asn Pro Thr Thr Gly Gly Ala Ser Tyr Asn Gln Lys Phe  
 50 55 60  
 Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80  
 Met Gln Leu Lys Ser Leu Thr Ser Glu Glu Ser Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Thr Arg Tyr Tyr Tyr Gly Arg His Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr  
 100 105 110

Thr Val Thr Val Ser Ser  
 115

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

ES 2 821 814 T3

<400> 15  
 Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser  
 1 5  
 <210> 16  
 <211> 9  
 5 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Polipéptido de CDR3 de VL anti-CD100  
 <400> 16  
 Gln Gln Ser Asn Glu Asp Pro Tyr Thr  
 1 5  
 <210> 17  
 <211> 111  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 15 <220>  
 <223> Polipéptido de VL de 2503 anti-CD100  
 <400> 17  
 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly  
 1 5 10 15  
  
 Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Asp  
 20 25 30  
  
 Gly Asp Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro  
 35 40 45  
  
 Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Asp  
 50 55 60  
  
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser  
 65 70 75 80  
  
 Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn  
 85 90 95  
  
 Glu Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
 100 105 110  
 20 <210> 18  
 <211> 111  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Polipéptido de VL de 67 anti-CD100  
 25 <400> 18

ES 2 821 814 T3

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

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

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

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

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

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

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

5

<210> 19  
 <211> 354  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Polinucleótido de VH de 2503 anti-CD100  
 <400> 19  
 cagggtgcagc tgggtgcagag cggcgctgag gtgaagaagc ctggcagcag cgtgaaggtc 60  
 tcctgcaagg ctagcggcta cagcttcagc gactactaca tgcactgggt gagacaggcc 120  
 cctggccaag gcctggagtg gatgggccag attaatccta cactggcgg cgctagctac 180  
 aaccagaagt tcaagggcaa ggccaccatt accgtggaca aaagcaccag cacagcctac 240  
 atggagctga gcagcctgag aagcgaggac accgccgtgt attactgtgc cagatattac 300  
 tacggcagac acttcgatgt ctggggccaa ggcaccacgg tcaccgtctc ttca 354

10

15

<210> 20  
 <211> 354  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Polinucleótido de VH de 67 anti-CD100  
 <400> 20  
 cagggtccagc tgcagcagtc tggacctgag ctggtgaagc ctggggcttc agtgaagata 60  
 tcctgcaagg cttctgggta ctcatcagc gactactaca tgcactgggt gaagcaaagt 120  
 cctgaaaata gtcttgagtg gattggacag attaatccta cactggggg tgctagctac 180  
 aaccagaagt tcaagggcaa ggccacatta actgtagata aatcctccag cacagcctac 240  
 atgcagctca agagcctgac atctgaagag tctgcagtct attactgtac aagatattac 300  
 tacggtagac acttcgatgt ctggggccaa gggaccacgg tcaccgtttc ctca 354

20

25

<210> 21  
 <211> 333  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Polinucleótido de VL de 2503 anti-CD100  
 <400> 21

ES 2 821 814 T3

	gacatcgtga tgacccagag cccagacagc ctggctgtga gcctgggcga gagggccacc	60
	atcaactgca aggccagcca aagcgtggat tatgatggcg atagctatat gaactggtac	120
	cagcagaaac caggccagcc tcctaagctg ctgatttacg ctgcatccaa tctggaagc	180
	ggcgtgcctg acagattcag cggcagcggc agcggcacag atttactct gaccatcagc	240
	agcctgcagg ctgaagatgt ggcagtgtat tactgtcagc aaagcaatga ggatccctac	300
	accttcggcc aagggaccaa gctcgagatc aaa	333
	<210> 22	
	<211> 333	
5	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Polinucleótido de VL de 67 anti-CD100	
	<400> 22	
	gacattgtga tgacccagtc tccagcttct ttggctgtgt ctctagggca gagggccacc	60
	atctcctgca aggccagcca aagtgttgat tatgatggtg atagttatat gaactggtac	120
	caacagaaac caggacagcc acccaaaactc ctcatctatg ctgcatccaa tctagaatct	180
	gggatcccag ccaggtttag tggcagtggg tctgggacag acttcaccct caacatccat	240
	cctgtggagg aggaggatgc tgcaacctat tactgtcagc aaagtaatga ggatccgtac	300
	acgttcggag gggggaccaa gctcgagatc aaa	333
10	<210> 23	
	<211> 2586	
	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 23	
	atgaggatgt gcacccccat tagggggctg ctcatggccc ttgcagtgat gtttgggaca	60
15	gcgatggcat ttgcacccat accccggatc acctgggagc acagagaggt gcacctggtg	120

ES 2 821 814 T3

cagtttcatg agccagacat ctacaactac tcagccttgc tgctgagcga ggacaaggac 180  
 accttgatg taggtgcccg ggaggcggtc ttogctgtga acgcactcaa catctccgag 240  
 aagcagcatg aggtgtattg gaaggtctca gaagacaaaa aagcaaatg tgcagaaaag 300  
 gggaaatcaa aacagacaga gtgcctcaac tacatccggg tgctgcagcc actcagcgc 360  
 acttcccttt acgtgtgtgg gaccaacgca ttccagccgg cctgtgacca cctgaactta 420  
 acatccttta agtttctggg gaaaaatgaa gatggcaaaag gaagatgtcc ctttgacca 480  
 gcacacagct acacatccgt catggttgat ggagaacttt attcggggac gtcgtataat 540  
 tttttgggaa gtgaaccat catctcccga aattcttccc acagtctct gaggacagaa 600  
 tatgcaatcc cttggctgaa cgagcctagt ttogtgttg ctgacgtgat ccgaaaaagc 660  
 ccagacagcc ccgacggcga ggatgacagg gtctacttct tcttcacgga ggtgtctgtg 720  
 gagtatgagt ttgtgttcag ggtgctgata ccacggatag caagagtgtg caagggggac 780  
 cagggcggcc tgaggacctt gcagaagaaa tggacctcct tcctgaaagc ccgactcatc 840  
 tgctcccggc cagacagcgg cttggtcttc aatgtgctgc gggatgtctt cgtgctcagg 900  
 tccccgggcc tgaaggtgcc tgtgttctat gcaactctca cccacagct gaacaacgtg 960  
 gggctgtcgg cagtgtgccc ctacaacctg tccacagccg aggaggtctt ctcccacggg 1020  
 aagtacatgc agagcaccac agtggagcag tcccacacca agtgggtgcg ctataatggc 1080  
 ccggtaccca agcccgggc tggagcgtgc atcgacagcg aggcacgggc cgccaactac 1140  
 accagctcct tgaatttgcc agacaagacg ctgcagttcg ttaaagacca ccctttgatg 1200  
 gatgactcgg taaccccaat agacaacagg ccaggttaa tcaagaaaga tgtgaactac 1260  
 acccagatcg tggtgaccg gaccagggc ctggatggga ctgtctatga tgtcatgttt 1320  
 gtcagcacag accggggagc tctgcacaaa gccatcagcc tcgagcacgc tgttcacatc 1380  
 atcgaggaga cccagctctt ccaggacttt gagccagtcc agaccctgct gctgtcttca 1440  
 aagaagggca acaggtttgt ctatgctggc tctaactcgg gcgtgggtcca ggccccgctg 1500  
 gccttctgtg ggaagcacgg cacctgcgag gactgtgtgc tggcgggga cccctactgc 1560  
 gcctggagcc cggccacagc gacctgcgtg gctctgcacc agaccgagag ccccagcagg 1620  
 ggtttgattc aggagatgag cggcagtgct tctgtgtgcc cggataaaag taaaggaagt 1680  
 taccggcagc attttttcaa gcacgggtggc acagcggaac tgaaatgctc caaaaatcc 1740  
 aacctggccc ggttcttttga gaagtccag aatggcgtgt tgaaggccga gagccccaa 1800  
 tacggtctta tgggcagaaa aaacttgctc atcttcaact tgtcagaagg agacagtggg 1860  
 gtgtaccagt gcctgtcaga ggagaggggt aagaacaaaa cggctcttcca agtggctgcc 1920  
 aagcacgtcc tgaagtgaa ggtggttcca aagcccgtag tggccccac cttgtcagtt 1980

ES 2 821 814 T3

gttcagacag aaggtagtag gattgccacc aaagtgttg tggcatccac ccaaggtct 2040  
 tctcccccaa cccagccgt gcaggccacc tcctccgggg ccatcaccct tcctcccaag 2100  
 cctgcgcca ccggcacatc ctgcgaacca aagatcgtca tcaacacggt cccccagctc 2160  
 cactcggaga aaaccatgta tcttaagtcc agcgacaacc gcctcctcat gtcctcttc 2220  
 ctcttcttct ttgttctctt cctctgcctc tttttctaca actgctataa gggatacctg 2280  
 cccagacagt gcttgaaatt ccgctcggcc ctactaattg ggaagaagaa gcccaagtca 2340  
 gatttctgtg accgtgagca gagcctgaag gagacgtag tagagccagg gagcttctcc 2400  
 cagcagaatg gggagcaccc caagccagcc ctggacaccg gctatgagac cgagcaagac 2460  
 accatcacca gcaaagtccc cacggatagg gaggactcac agaggatcga cgaccttctc 2520  
 gccagggaca agccctttga cgtcaagtgt gagctgaagt tcgctgactc agacgcagat 2580  
 ggagac 2586  
 <210> 24  
 <211> 13  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Epítopo peptídico de la proteína proteolípídica PLP(139-151)  
 <400> 24  
 His Ser Leu Gly Lys Trp Leu Gly His Pro Asp Lys Phe  
 1 5 10  
 <210> 25  
 <211> 118  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Polipéptido de VH de 76 anti-CD100  
 <400> 25  
 Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala Lys Pro Gly Ala  
 1 5 10 15  
 Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr  
 20 25 30  
 Trp Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile  
 35 40 45  
 Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Thr Gly Tyr Ser Asp Tyr Asn Gln Lys Phe  
 50 55 60  
 Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80  
 Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Ala Arg Asp Pro Tyr Gly Trp Thr Met Asp Ser Trp Gly Gln Gly Thr  
 100 105 110  
 Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115  
 <210> 26  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

ES 2 821 814 T3

<220>  
 <223> Polipéptido de CDR1 de VH de 76 anti-CD100  
 <400> 26  
 Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr Trp Met His  
 1 5 10  
 5 <210> 27  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Polipéptido de CDR2 de VH de 76 anti-CD100  
 <400> 27  
 Tyr Ile Asn Pro Ser Thr Gly Tyr Ser Asp Tyr Asn Gln Lys Phe Lys  
 1 5 10 15  
 Asp  
 <210> 28  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Polipéptido de CDR3 de VH de 76 anti-CD100  
 <400> 28  
 Asp Pro Tyr Gly Trp Thr Met Asp Ser  
 1 5  
 20 <210> 29  
 <211> 107  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 25 <220>  
 <223> Polipéptido de VL de 76 anti-CD100  
 <400> 29  
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly  
 1 5 10 15  
 Asp Thr Ile Thr Ile Thr Cys His Ala Ser Gln Asn Ile Asn Val Trp  
 20 25 30  
 Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Asn Ile Pro Lys Leu Leu Ile  
 35 40 45  
 Tyr Lys Ala Ser Asn Leu His Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60  
 Ser Gly Ser Gly Thr Gly Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
 65 70 75 80  
 Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Gln Ser Tyr Pro Tyr  
 85 90 95  
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
 100 105  
 30 <210> 30  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Polipéptido de CDR1 de VL de 76 anti-CD100  
 <400> 30  
 His Ala Ser Gln Asn Ile Asn Val Trp Leu Ser  
 1 5 10  
 35 <210> 31

ES 2 821 814 T3

<211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 <220>  
 5 <223> Polipéptido de CDR2 de VL de 76 anti-CD100  
 <400> 31  
**Lys Ala Ser Asn Leu His Thr**  
**1 5**  
 <210> 32  
 <211> 9  
 10 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Polipéptido de CDR3 de VL de 76 anti-CD100  
 <400> 32  
**Gln Gln Gly Gln Ser Tyr Pro Tyr Thr**  
 15 **1 5**  
 <210> 33  
 <211> 354  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 20 <220>  
 <223> Polinucleótido de VH de 76 anti-CD100  
 <400> 33  
 cagggtccagc tgcagcagtc tggggctgaa ctggcaaaac ctggggcctc agtgaagatg 60  
 tcctgcaagg cttctggcta cacctttact aggtactgga tgcactgggt aaaacagagg 120  
 cctggacagg gtctggaatg gattggatac attaatccta gactgggta ttctgattac 180  
 aatcagaagt tcaaggacaa ggccacattg actgcagaca aatcctccag cacagcctac 240  
 atgcaactga gcagcctgac atctgaggac tctgcagtct attactgtgc aagagacccc 300  
 tacggctgga ctatggactc ctggggccaa gggactctgg tcaccgtctc ctca 354  
 25 <210> 34  
 <211> 30  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Polinucleótido de CDR1 de VH de 76 anti-CD100  
 30 <400> 34  
 ggctacacct ttactaggta ctggatgcac 30  
 <210> 35  
 <211> 51  
 <212> ADN  
 35 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Polinucleótido de CDR2 de VH de 76 anti-CD100  
 <400> 35  
 tacattaatc ctagcactgg ttattctgat tacaatcaga agtcaagga c 51  
 40 <210> 36  
 <211> 27  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 45 <223> Polinucleótido de CDR3 de VH de 76 anti-CD100  
 <400> 36  
 gaccctacg gctggactat ggactcc 27  
 <210> 37  
 <211> 321  
 50 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Polinucleótido de VL de 76 anti-CD100  
 <400> 37

ES 2 821 814 T3

gacatccaga tgaccagtc tccatccagt ctgtctgcat cccttgaga cacaattacc 60  
 atcacttgcc atgccagtca gaacattaat gtttggttaa gctggtacca gcagaaacca 120  
 ggaaatattc ctaaactatt gatctataag gcttccaact tgcacacagg cgtcccatca 180  
 aggttttagtg gcagtggatc tggaacaggt ttcacattaa ccatcagcag cctgcagcct 240  
 gaagacattg ccacttacta ctgtcaacag ggtcaaagtt atccgtacac gttcggaggg 300  
 gggaccaagc tcgagatcaa a 321  
 <210> 38  
 <211> 33  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Polinucleótido de CDR1 de VL de 76 anti-CD100  
 <400> 38  
 catgccagtc agaacattaa tgttggtta agc 33  
 <210> 39  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Polinucleótido de CDR2 de VL de 76 anti-CD100  
 <400> 39  
 aaggctcca actgacac a 21  
 <210> 40  
 <211> 27  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Polinucleótido de CDR3 de VL de 76 anti-CD100  
 <400> 40  
 caacagggtc aaagttatcc gtacacg 27  
 <210> 41  
 <211> 51  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Epitopo 1  
 <400> 41  
 ctgaagggtc ctgtgttcta tgcactctc accccacagc tgaacaacgt g 51  
 <210> 42  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Epitopo 1  
 <400> 42  
 Leu Lys Val Pro Val Phe Tyr Ala Leu Phe Thr Pro Gln Leu Asn Asn  
 1 5 10 15  
 Val  
 <210> 43  
 <211> 45  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Epitopo 2  
 <400> 43  
 aaatggacct ccttctgaa agcccgactc atctgctccc ggcca 45  
 <210> 44  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

ES 2 821 814 T3

<220>  
 <223> Epitopo 2  
 <400> 44  
 Lys Trp Thr Ser Phe Leu Lys Ala Arg Leu Ile Ala Ser Arg Pro  
 1 5 10 15  
 5 <210> 45  
 <211> 42  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 10 <223> Epitopo 3  
 <400> 45  
 gagtttggt tcagggtgct gatcccacgg atagcaagag tg 42  
 <210> 46  
 <211> 14  
 15 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Epitopo 3  
 <400> 46  
 Glu Phe Val Phe Arg Val Leu Ile Pro Arg Ile Ala Arg Val  
 1 5 10  
 20 <210> 47  
 <211> 113  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 25 <220>  
 <223> Dominio VL de 2282  
 <400> 47  
 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Pro Gly  
 1 5 10 15  
 Glu Pro Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Phe Asn Ser  
 20 25 30  
 Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln  
 35 40 45  
 Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val  
 50 55 60  
 Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr  
 65 70 75 80  
 Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Asn  
 85 90 95  
 Asp His Thr Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile  
 100 105 110  
 Lys  
 30 <210> 48  
 <211> 122  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Dominio VH de 2282  
 35 <400> 48  
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser  
 1 5 10 15  
 Ser Val Lys Val Ser Cys Thr Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr  
 20 25 30  
 Tyr Met Asp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met  
 35 40 45  
 Gly Arg Val Asn Pro Tyr His Gly Tyr Ala Thr Tyr Asn Gln Lys Phe  
 50 55 60  
 Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80  
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Ala Arg Glu Glu Asn Ser Tyr Asp Gly Tyr Tyr Gly Met Asp Tyr Trp  
 100 105 110  
 Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115 120

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Una cantidad eficaz de un anticuerpo aislado o fragmento de unión al antígeno de este que se une específicamente a la Semaforina-4D (SEMA4D) para su uso en un tratamiento para inhibir, suprimir, reducir o retrasar el crecimiento de placas ateroscleróticas en un sujeto que padece aterosclerosis, donde el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este comprende una cadena pesada variable (VH) que comprende las CDR 1-3 de VH que comprenden las SEQ ID NOs 6, 7 y 8, respectivamente, y una cadena ligera variable (VL) que comprende las CDR 1-3 de VL que comprenden las SEQ ID NO 14, 15 y 16, respectivamente.
- 10 2. El anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este para el uso de la reivindicación 1, donde el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este puede inhibir, retrasar o reducir la neovascularización alrededor de las placas ateroscleróticas en un sujeto.
- 15 3. El anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, donde el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este inhibe la interacción de SEMA4D con su receptor.
- 20 4. El anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este para el uso de la reivindicación 3, donde el receptor es Plexina-B1, Plexina-B2 o CD72.
- 25 5. El anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este inhibe la transducción de señales de Plexina-B1 mediada por SEMA4D.
- 30 6. El anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde el sujeto padece una enfermedad cardiovascular.
- 35 7. El anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este para el uso de la reivindicación 6, donde la enfermedad cardiovascular se selecciona del grupo constituido por cardiopatía coronaria, cardiopatía isquémica, arteriopatía coronaria, cardiomiopatía, cardiopatía hipertensiva, insuficiencia cardíaca, cardiopatía pulmonar, disritmias cardíacas, endocarditis cardiopatía inflamatoria, cardiomegalia inflamatoria, miocarditis, cardiopatía valvular, enfermedad cerebrovascular, arteriopatía periférica, cardiopatía congénita, cardiopatía reumática y una combinación de estas.
8. El anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este para el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el VH y VL comprenden, respectivamente, la SEQ ID NO: 9 y la SEQ ID NO: 17.
9. El anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este para el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, donde el VH y VL comprenden, respectivamente, la SEQ ID NO: 10 y la SEQ ID NO: 18.

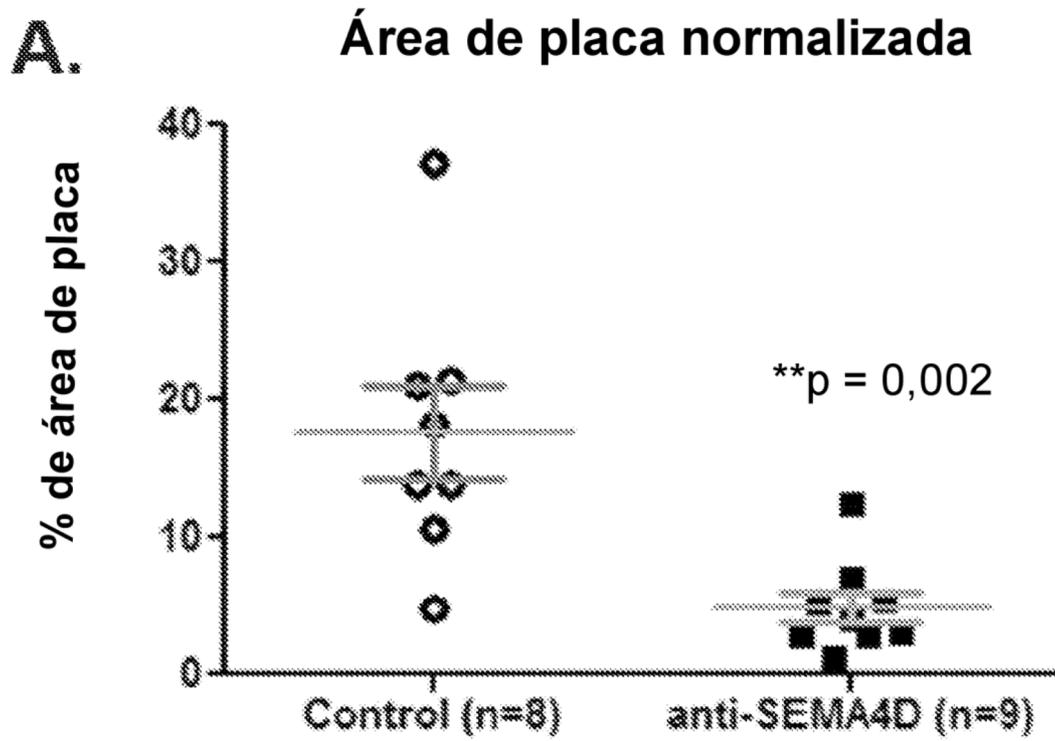


Figura 1A

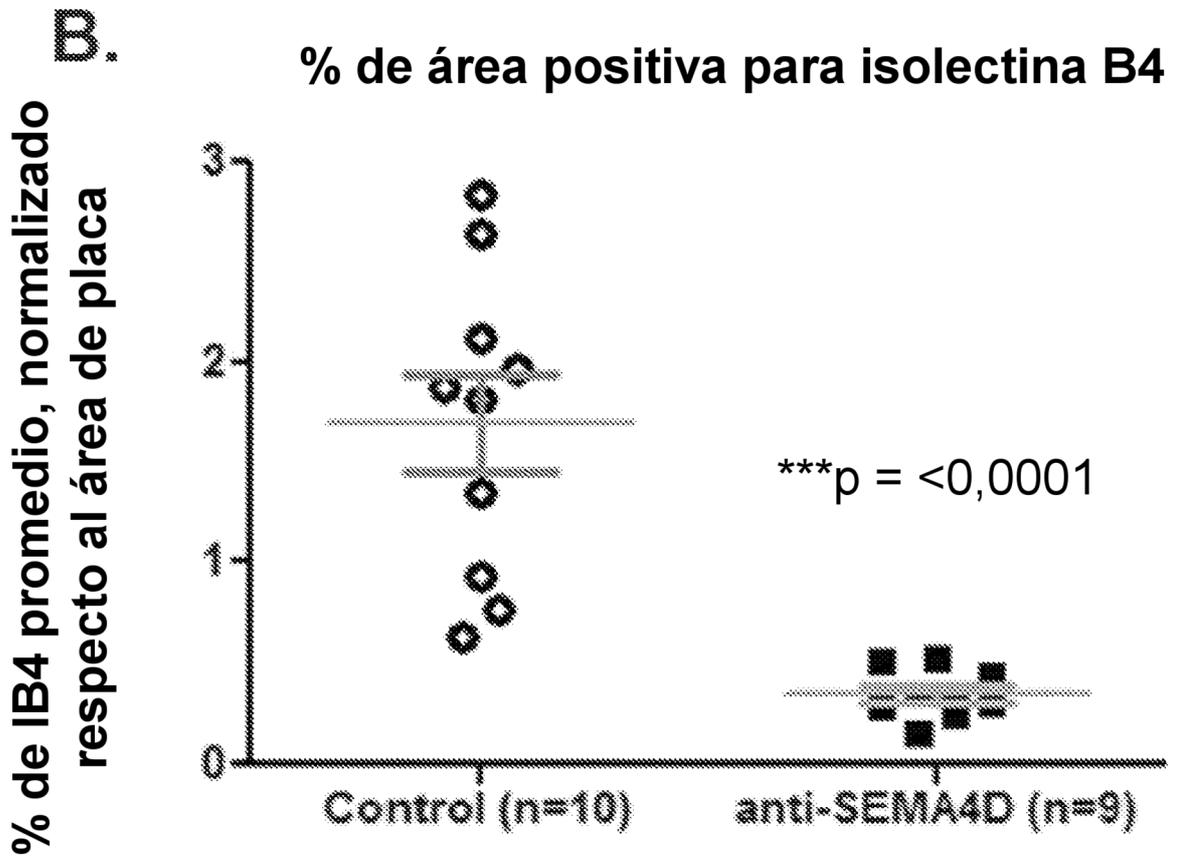


Figura 1B

% de CD31 promedio, normalizado respecto al área de placa

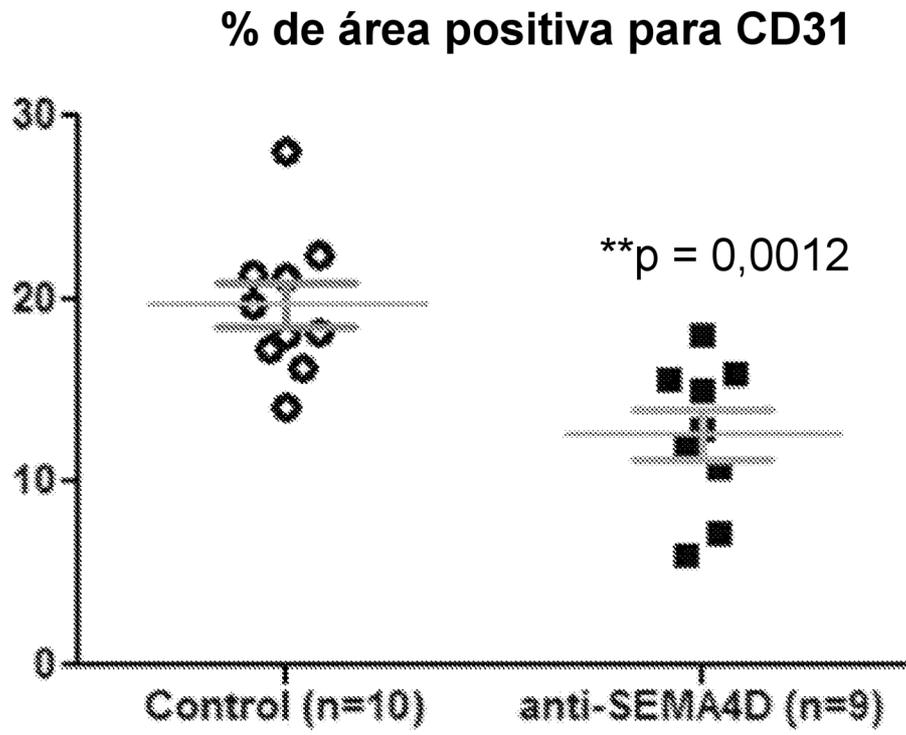


Figura 1C