



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107207587 A

(43)申请公布日 2017.09.26

(21)申请号 201580072390.6

(22)申请日 2015.11.05

(30)优先权数据

62/075,793 2014.11.05 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2017.07.04

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2015/059185 2015.11.05

(87)PCT国际申请的公布数据

W02016/073685 EN 2016.05.12

(71)申请人 安尼艾克松股份有限公司

地址 美国加利福尼亚州

(72)发明人 A·罗森塔尔 M·立维腾

(74)专利代理机构 北京嘉和天工知识产权代理  
事务所(普通合伙) 11269

代理人 甘玲 缪策

(51)Int.Cl.

*G07K 16/18*(2006.01)

*A61K 39/395*(2006.01)

*A61K 49/16*(2006.01)

*G12N 15/13*(2006.01)

*G01N 33/53*(2006.01)

*G01N 33/564*(2006.01)

*A61P 29/00*(2006.01)

*A61P 25/28*(2006.01)

权利要求书7页 说明书67页 附图13页

(54)发明名称

人源化抗-补体因子C1q抗体及其应用

(57)摘要

本公开是针对人源化抗C1q抗体以及其使用方法。

1. 一种与C1q蛋白特异性地结合的人源化抗体,其中所述抗体包括重链可变区和人重链恒定区,其中所述重链可变区包括Fab区,并且所述重链恒定区包括Fc区,其中所述Fab区与所述C1q蛋白特异性地结合,并且其中所述Fc区不能结合所述C1q蛋白。

2. 如权利要求1所述的抗体,其中所述Fc区不能诱导补体活性。

3. 如权利要求1或权利要求2所述的抗体,其中所述Fc区不能诱导抗体依赖细胞毒性(ADCC)。

4. 如权利要求1-3中任一项所述的抗体,其中所述人重链恒定区是人IgG4重链恒定区。

5. 如权利要求4所述的抗体,其中所述人IgG4重链恒定区包括SEQ ID NO:37的氨基酸序列,或者具有与SEQ ID NO:37的所述氨基酸序列至少约90%同源性的氨基酸序列。

6. 如权利要求4所述的抗体,其中所述人IgG4重链恒定区包括Fc区,并且所述Fc区包括一个或更多个修饰。

7. 如权利要求6所述的抗体,其中所述Fc区包括一个或更多个氨基酸置换。

8. 如权利要求7所述的抗体,其中所述Fc区包括在根据Kabat编号规则248位点处的氨基酸置换。

9. 如权利要求8所述的抗体,其中所述Fc区包括在根据Kabat编号规则248位点处的亮氨酸到谷氨酸(glutamate)的氨基酸置换。

10. 如权利要求8或权利要求9所述的抗体,其中所述在根据Kabat编号规则248位点处的氨基酸置换抑制所述Fc区与Fc受体相互作用。

11. 如权利要求7-10中任一项所述的抗体,其中所述Fc区包括在根据Kabat编号规则241位点处的氨基酸置换。

12. 如权利要求11所述的抗体,其中所述Fc区包括在根据Kabat编号规则241位点处的丝氨酸到脯氨酸的氨基酸置换。

13. 如权利要求11或权利要求12所述的抗体,其中所述在根据Kabat编号规则241位点处的氨基酸置换阻止在所述抗体中的臂转换。

14. 如权利要求1-13中任一项所述的抗体,其中所述抗体包括重链可变域和轻链可变域,其中所述重链可变域包括选自SEQ ID NOs:1-4的氨基酸序列,或者具有与选自SEQ ID NOs:1-4的所述氨基酸序列至少约95%同源性的氨基酸序列。

15. 如权利要求1-14中任一项所述的抗体,其中所述轻链可变域包括选自SEQ ID NOs:5-8的氨基酸序列,或者具有与选自SEQ ID NOs:5-8的所述氨基酸序列至少约90%同源性的氨基酸序列。

16. 一种人源化抗C1q抗体,或其抗原结合片段,所述抗体包括重链可变域和轻链可变域,其中所述重链可变域包括选自SEQ ID NOs:1-4的氨基酸序列,或者具有与选自SEQ ID NOs:1-4的所述氨基酸序列至少约90%同源性的氨基酸序列。

17. 一种人源化抗C1q抗体,或其抗原结合片段,所述抗体包括重链可变域和轻链可变域,其中所述轻链可变域包括选自SEQ ID NOs:5-8的氨基酸序列,或者具有与选自SEQ ID NOs:5-8的所述氨基酸序列至少约90%同源性的氨基酸序列。

18. 一种人源化抗C1q抗体,或其抗原结合片段,所述抗体包括:

a) 重链可变域,所述重链可变域包括选自SEQ ID NOs:1-4的氨基酸序列,或者具有与选自SEQ ID NOs:1-4的所述氨基酸序列至少约90%同源性的氨基酸序列;和/或

b) 轻链可变域,所述轻链可变域包括选自SEQ ID NOs:5-8的氨基酸序列,或者具有与选自SEQ ID NOs:5-8的所述氨基酸序列至少约90%同源性的氨基酸序列。

19. 一种人源化抗C1q抗体,或其抗原结合片段,所述抗体包括:

a) 重链可变域,所述重链可变域包括SEQ ID NO:1的氨基酸序列,或者具有与SEQ ID NO:1的所述氨基酸序列至少约90%同源性的氨基酸序列;和

b) 轻链可变域,所述轻链可变域包括选自SEQ ID NOs:5-8的氨基酸序列,或者具有与选自SEQ ID NOs:5-8的所述氨基酸序列至少约90%同源性的氨基酸序列。

20. 一种人源化抗C1q抗体,或其抗原结合片段,所述抗体包括:

a) 重链可变域,所述重链可变域包括SEQ ID NO:2的氨基酸序列,或者具有与SEQ ID NO:2的所述氨基酸序列至少约90%同源性的氨基酸序列;和

b) 轻链可变域,所述轻链可变域包括选自SEQ ID NOs:5-8的氨基酸序列,或者具有与选自SEQ ID NOs:5-8的所述氨基酸序列至少约90%同源性的氨基酸序列。

21. 一种人源化抗C1q抗体,或其抗原结合片段,所述抗体包括:

a) 重链可变域,所述重链可变域包括SEQ ID NO:3的氨基酸序列,或者具有与SEQ ID NO:3的所述氨基酸序列至少约90%同源性的氨基酸序列;和

b) 轻链可变域,所述轻链可变域包括选自SEQ ID NOs:5-8的氨基酸序列,或者具有与选自SEQ ID NOs:5-8的所述氨基酸序列至少约90%同源性的氨基酸序列。

22. 一种人源化抗C1q抗体,或其抗原结合片段,所述抗体包括:

a) 重链可变域,所述重链可变域包括SEQ ID NO:4的氨基酸序列,或者具有与SEQ ID NO:4的所述氨基酸序列至少约90%同源性的氨基酸序列;和

b) 轻链可变域,所述轻链可变域包括选自SEQ ID NOs:5-8的氨基酸序列,或者具有与选自SEQ ID NOs:5-8的所述氨基酸序列至少约90%同源性的氨基酸序列。

23. 一种人源化抗C1q抗体,或其抗原结合片段,所述抗体包括:

a) 重链可变域,所述重链可变域包括选自SEQ ID NOs:1-4的氨基酸序列,或者具有与选自SEQ ID NOs:1-4的所述氨基酸序列至少约90%同源性的氨基酸序列;和

b) 轻链可变域,所述轻链可变域包括SEQ ID NO:5的氨基酸序列,或者具有与SEQ ID NO:5的所述氨基酸序列至少约90%同源性的氨基酸序列。

24. 一种人源化抗C1q抗体,或其抗原结合片段,所述抗体包括:

a) 重链可变域,所述重链可变域包括选自SEQ ID NOs:1-4的氨基酸序列,或者具有与选自SEQ ID NOs:1-4的所述氨基酸序列至少约90%同源性的氨基酸序列;和

b) 轻链可变域,所述轻链可变域包括SEQ ID NO:6的氨基酸序列,或者具有与SEQ ID NO:6的所述氨基酸序列至少约90%同源性的氨基酸序列。

25. 一种人源化抗C1q抗体,或其抗原结合片段,所述抗体包括:

a) 重链可变域,所述重链可变域包括选自SEQ ID NOs:1-4的氨基酸序列,或者具有与选自SEQ ID NOs:1-4的所述氨基酸序列至少约90%同源性的氨基酸序列;和

b) 轻链可变域,所述轻链可变域包括SEQ ID NO:7的氨基酸序列,或者具有与SEQ ID NO:7的所述氨基酸序列至少约90%同源性的氨基酸序列。

26. 一种人源化抗C1q抗体,或其抗原结合片段,所述抗体包括:

a) 重链可变域,所述重链可变域包括选自SEQ ID NOs:1-4的氨基酸序列,或者具有与

选自SEQ ID NOs:1-4的所述氨基酸序列至少约90%同源性的氨基酸序列;和

b) 轻链可变域,所述轻链可变域包括SEQ ID NO:8的氨基酸序列,或者具有与SEQ ID NO:8的所述氨基酸序列至少约90%同源性的氨基酸序列。

27. 如权利要求1-26中任一项所述的抗体或抗原结合片段,其中所述抗体与人C1q和小鼠C1q二者特异性地结合。

28. 如权利要求1-26中任一项所述的抗体或抗原结合片段,其中所述抗体与大鼠C1q特异性地结合。

29. 如权利要求1-26中任一项所述的抗体或抗原结合片段,其中所述抗体与人C1q,小鼠C1q蛋白和大鼠C1q特异性地结合。

30. 如权利要求1-26中任一项所述的抗体或抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段基本上结合与抗体M1或其抗C1q结合片段相同的C1q表位,所述抗体M1是由具有ATCC登录号PTA-120399的杂交瘤细胞系产生的。

31. 如权利要求1-26中任一项所述的抗体或抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段抑制单克隆抗体M1与人C1q或小鼠C1q的结合,所述单克隆抗体M1是由ATCC登录号PTA-120399的杂交瘤细胞系产生的。

32. 如权利要求1-31中任一项所述的抗体或抗原结合片段,其中所述抗体属于IgG类。

33. 如权利要求32所述的抗体或抗原结合片段,其中所述抗体具有IgG<sub>1</sub>、IgG<sub>2</sub>、IgG<sub>3</sub>或IgG<sub>4</sub>同种型。

34. 如权利要求32所述的抗体或抗原结合片段,其中所述抗体具有IgG<sub>4</sub>同种型。

35. 如权利要求34所述的抗体或抗原结合片段,其中所述抗体包括人IgG<sub>4</sub>恒定区。

36. 如权利要求35所述的抗体或抗原结合片段,其中所述人IgG<sub>4</sub>重链恒定区包括SEQ ID NO:37的氨基酸序列,或者具有与SEQ ID NO:37的所述氨基酸序列至少约90%同源性的氨基酸序列。

37. 如权利要求35所述的抗体或抗原结合片段,其中所述人IgG<sub>4</sub>恒定区包括Fc区。

38. 如权利要求37所述的抗体或抗原结合片段,其中所述Fc区不能结合所述C1q蛋白。

39. 如权利要求37或权利要求38所述的抗体或抗原结合片段,其中所述Fc区不能诱导补体活性。

40. 如权利要求37-39中任一项所述的抗体或抗原结合片段,其中所述Fc区不能诱导抗体依赖细胞毒性(ADCC)。

41. 如权利要求37-40中任一项所述的抗体或抗原结合片段,其中所述Fc区包括一个或更多个修饰。

42. 如权利要求41所述的抗体或抗原结合片段,其中所述Fc区包括一个或更多个氨基酸置换。

43. 如权利要求42所述的抗体或抗原结合片段,其中所述Fc区包括在根据Kabat编号规则248位点处的氨基酸置换。

44. 如权利要求43所述的抗体或抗原结合片段,其中所述Fc区包括在根据Kabat编号规则248的位点处的亮氨酸到谷氨酸的氨基酸置换。

45. 如权利要求43或权利要求44所述的抗体或抗原结合片段,其中所述在根据Kabat编号规则248位点处的氨基酸置换抑制所述Fc区与Fc受体的相互作用。

46. 如权利要求42-45中任一项所述的抗体或抗原结合片段,其中所述Fc区包括在根据Kabat编号规则241位点处的氨基酸置换。

47. 如权利要求46所述的抗体或抗原结合片段,其中所述Fc区包括在根据Kabat编号规则241位点处的丝氨酸到脯氨酸的氨基酸置换。

48. 如权利要求46或权利要求47所述的抗体或抗原结合片段,其中所述在根据Kabat编号规则241位点处的氨基酸置换阻止在所述抗体中的臂转换。

49. 如权利要求1-34中任一项所述的抗体或抗原结合片段,其中所述抗体是双特异性抗体。

50. 如权利要求1-34中任一项所述的抗体或抗原结合片段,其中所述抗体已经被工程化以提高脑穿透性。

51. 如权利要求1-34中任一项所述的抗体或抗原结合片段,其中所述抗体是识别第一抗原和第二抗原的双特异性抗体。

52. 如权利要求51所述的抗体,其中所述第一抗原是C1q蛋白,所述第二抗原是便利运输通过血脑屏障的抗原。

53. 如权利要求51或52所述的抗体,其中所述第二抗原选自转铁蛋白受体(TR)、胰岛素受体(HIR)、胰岛素样生长因子受体(IGFR)、低密度脂蛋白受体相关蛋白1和2(LPR-1和LPR-2)、白喉毒素受体、CRM197、美洲驼单域抗体、TMEM 30(A)、蛋白质转导域、TAT、Syn-B、穿膜肽、聚精氨酸肽、angiopep肽和ANG1005。

54. 如权利要求1-53中任一项所述的抗体或抗原结合片段,其中所述抗原结合片段是Fab、F(ab')<sub>2</sub>或Fab'片段。

55. 如权利要求54所述的抗体或抗原结合片段,其中所述抗体片段较之于所述抗体片段的相应的全长抗体具有更好的脑穿透性。

56. 如权利要求54或权利要求55所述的抗体或抗原结合片段,其中所述抗体片段较之于所述抗体片段的相应的全长抗体具有更短的半衰期。

57. 如权利要求1-56中任一项所述的抗体或抗原结合片段,其中所述抗体对于人C1q具有从小于约10pM到小于约5pM范围的解离常数(K<sub>D</sub>)。

58. 如权利要求1-57中任一项所述的抗体或抗原结合片段,其中所述抗体对于小鼠C1q具有从小于约125nM到小于约5pM范围的解离常数(K<sub>D</sub>)。

59. 如权利要求1-58中任一项所述的抗体或抗原结合片段,其中所述抗体与C1q特异性地结合,并中和C1q的生物活性。

60. 如权利要求59所述的抗体,其中所述生物活性是(1) C1q与自身抗体结合,(2) C1q与C1r结合,(3) C1q与C1s结合,(4) C1q与磷脂酰丝氨酸结合,(5) C1q与穿透素-3结合,(6) C1q与C-反应蛋白(CRP)结合,(7) C1q与球形C1q受体(gC1qR)结合,(8) C1q与补体受体1(CR1)结合,(9) C1q与β-淀粉样蛋白结合,或(10) C1q与钙网蛋白结合。

61. 如权利要求59或权利要求60所述的抗体,其中所述生物活性是(1) 传统补体活化通路的激活,(2) 抗体和补体依赖细胞毒性的激活,(3) CH50溶血,(4) 突触丢失,(5) B-细胞抗体产生,(6) 树突细胞成熟,(7) T-细胞增殖,(8) 细胞因子产生,(9) 小胶质细胞激活,(10) 阿瑟氏反应,(11) 突触或神经末梢的吞噬作用,或(12) 补体受体3(CR3/C3)表达细胞的激活。

62. 如权利要求61所述的抗体,其中CH50溶血包括人、小鼠和/或大鼠CH50溶血。

63. 如权利要求61或权利要求62所述的抗体,其中所述抗体能中和从至少约50%到至少约90%的CH50溶血。

64. 如权利要求61-63中任一项所述的抗体,其中所述抗体能以小于150ng、小于100ng、小于50ng或小于20ng的剂量中和至少50%的CH50溶血。

65. 如权利要求61-64中任一项所述的抗体,其中所述抗体以从20:1至1.0:1的范围或小于1.0:1的结合化学计量结合C1q。

66. 一种分离的多核苷酸,所述分离的多核苷酸包括编码如权利要求1-65中任一项所述的抗体的核酸序列。

67. 一种分离的宿主细胞,所述分离的宿主细胞包括如权利要求66所述的核酸序列。

68. 一种药物组合物,所述药物组合物包括如权利要求1-65中任一项所述的抗体和药学上可接受的载体。

69. 一种在需要这种治疗的个体中治疗或预防与补体活化相关的疾病的方法,所述方法包括施用治疗有效量的如权利要求1-65中任一项所述的抗体的步骤。

70. 如权利要求69所述的方法,其中所述与补体活化相关的疾病是神经退行性疾病。

71. 如权利要求70所述的方法,其中所述神经退行性疾病与突触的丢失或丢失神经连接有关。

72. 如权利要求70或权利要求71所述的方法,其中所述神经退行性疾病与依赖于补体受体3 (CR3) /C3或补体受体CR1的突触丢失有关。

73. 如权利要求70-72中任一项所述的方法,其中所述神经退行性疾病与依赖于病理活性的突触修剪有关。

74. 如权利要求70-73中任一项所述的方法,其中所述神经退行性疾病与小胶质细胞对突触的吞噬作用有关。

75. 如权利要求70-74中任一项所述的方法,其中所述神经退行性疾病选自阿尔茨海默病、肌萎缩性侧索硬化症、多发性硬化、青光眼、肌强直性营养不良、格林-巴利综合征 (GBS)、重症肌无力、大疱性类天疱疮、脊髓性肌萎缩、唐氏综合症、帕金森病和亨廷顿病。

76. 如权利要求69所述的方法,其中所述与补体活化相关的疾病是炎性疾病、自身免疫疾病或代谢失调。

77. 如权利要求76所述的方法,其中所述炎性疾病、自身免疫疾病或代谢失调选自糖尿病、肥胖症、类风湿性关节炎 (RA)、急性呼吸窘迫综合症 (ARDS)、局部缺血和再灌注之后的远端组织损伤、体外循环手术过程中的补体活化、皮炎、天疱疮、狼疮性肾炎及导致的肾小球性肾炎和脉管炎、体外循环、心脏停搏液诱导的冠状动脉内皮功能障碍、II型膜增生性肾小球肾炎、IgA肾病、急性肾衰竭、冷球蛋白血症、抗磷脂综合症、慢性开角青光眼、急性闭角青光眼、黄斑变性疾病、老年性黄斑变性 (AMD)、(AMD-湿性)、地图状萎缩脉络膜血管新生 (CNV)、葡萄膜炎、糖尿病视网膜病变、缺血性视网膜病变、眼内炎、眼内血管新生疾病、糖尿病黄斑水肿、病理性近视、小脑视网膜血管瘤、眼组织胞浆菌病、视神经脊髓炎 (NMO)、视网膜中央静脉阻塞 (CRVO)、角膜血管新生、视网膜血管新生、利伯氏遗传性视神经病变、视神经炎、白塞氏视网膜病变、缺血性视神经病变、视网膜血管炎、ANCA血管炎、普尔夏视网膜病变、斯耶格伦干眼症、干性AMD、结节病、颞动脉炎、结节性多发性动脉炎、多发硬化症、移植排斥、超急性排斥反应、血液透析、慢性阻塞性肺病 (COPD)、哮喘和吸入性肺炎。

78. 如权利要求69所述的方法,其中与补体活化相关的疾病是自身免疫疾病,所述自身免疫疾病选自重症肌无力、1型糖尿病、桥本氏甲状腺炎、阿狄森氏病、乳糜泻、克罗恩氏病、恶性贫血、慢性天疱疮、白癜风、自身免疫性溶血性贫血、副肿瘤综合征、脉管炎疾病、低补体血症荨麻疹性血管炎(HUV)、风湿性多肌痛症、颞动脉炎和韦格纳肉芽肿。

79. 一种试剂盒,所述试剂盒包括如权利要求1-65中任一项所述的抗体和包装说明书,所述包装说明书包括使用该抗体在需要这种治疗的个体中治疗或预防与补体活化相关的疾病的说明。

80. 如权利要求79所述的试剂盒,其中所述与补体活化相关的疾病是神经退行性病症。

81. 如权利要求80所述的试剂盒,其中所述神经退行性病症与突触的丢失或丢失神经连接有关。

82. 如权利要求80或81所述的试剂盒,其中所述神经退行性病症与依赖于补体受体3(CR3)/C3或补体受体CR1的突触丢失有关。

83. 如权利要求80-82中任一项所述的试剂盒,其中所述神经退行性病症与依赖于病理活性的突触修剪有关。

84. 如权利要求80-83中任一项所述的试剂盒,其中所述神经退行性病症与小胶质细胞对突触的吞噬作用有关。

85. 如权利要求80-84中任一项所述的试剂盒,其中所述神经退行性病症选自阿尔茨海默病、肌萎缩性侧索硬化症、多发性硬化、青光眼、肌强直性营养不良、唐氏综合症、帕金森病和亨廷顿病。

86. 如权利要求79所述的试剂盒,其中与补体活化相关的疾病是炎性疾病、自身免疫疾病或代谢失调。

87. 如权利要求86所述的试剂盒,其中所述炎性疾病、自身免疫疾病或代谢失调选自糖尿病、肥胖症、类风湿性关节炎(RA)、急性呼吸窘迫综合征(ARDS)、缺血和再灌注之后的远端组织损伤、体外循环手术过程中的补体活化、皮炎、天疱疮、狼疮性肾炎及导致的肾小球性肾炎和脉管炎、体外循环、心脏停搏液诱导的冠状动脉内皮功能障碍、II型膜增生性肾小球肾炎、IgA肾病、急性肾衰竭、冷球蛋白血症、抗磷脂综合症、慢性开角青光眼、急性闭角青光眼、黄斑变性疾病、老年性黄斑变性(AMD)、(AMD-湿性)、地图状萎缩脉络膜血管新生(CNV)、葡萄膜炎、糖尿病视网膜膜病变、缺血性视网膜膜病变、眼内炎、眼内血管新生疾病、糖尿病黄斑水肿、病理性近视、小脑视网膜血管瘤、眼组织胞浆菌病、视神经脊髓炎(NMO)、视网膜中央静脉阻塞(CRVO)、角膜血管新生、视网膜血管新生、利伯氏世袭视神经病变、视神经炎、白塞氏视网膜膜病变、缺血性视神经病变、视网膜血管炎、ANCA血管炎、普尔夏视网膜膜病变、斯耶格伦干眼症、干性AMD、结节病、颞动脉炎、结节性多发性动脉炎、多发硬化症、移植排斥、超急性排斥反应、血液透析、慢性阻塞性肺病(COPD)、哮喘和吸入性肺炎。

88. 如权利要求79所述的试剂盒,其中与补体活化相关的疾病是自身免疫疾病,所述自身免疫疾病选自重症肌无力、1型糖尿病、桥本氏甲状腺炎、阿狄森氏病、乳糜泻、克罗恩氏病、恶性贫血、慢性天疱疮、白癜风、自身免疫性溶血性贫血、副肿瘤综合征、脉管炎疾病、低补体血症荨麻疹性血管炎(HUV)、风湿性多肌痛症、颞动脉炎和韦格纳肉芽肿。

89. 一种诊断试剂盒,其包括如权利要求1-65中任一项所述的抗体。

90. 一种检测个体中的突触的方法,所述方法包括:

- a) 给所述个体施用如权利要求1-65中任一项所述的抗体;和
- b) 检测与突触结合的抗体,由此检测所述个体中的突触。

91. 如权利要求90的方法,其中所述与突触结合的抗体是通过使用成像技术检测的,所述成像技术选自正电子发射断层摄影术(PET)、X-射线计算机断层摄影术、单光子发射计算机断层摄影术(SPECT)、计算机断层摄影术(CT)和轴向计算机断层摄影术(CAT)。

92. 如权利要求90或权利要求91所述的方法,其中对与突触结合的抗体的检测提供了对所述个体中突触数量的定量测量。

93. 如权利要求90-92中任一项所述的方法,其中所述个体患有神经退行性疾病或自身免疫疾病。

94. 如权利要求90-93中任一项所述的方法,其中所述个体中的突触数量在一段时间内被重复测量,并且所述个体中突触丢失随时间被检测。

95. 如权利要求94所述的方法,突触随时间的丢失是对神经退行性疾病或自身免疫疾病的治疗效力的测量。

96. 一种检测生物样品中突触的方法,所述方法包括:

- a) 使所述生物样品与如权利要求1-65中任一项所述的抗体接触;以及
- b) 检测与突触结合的抗体,由此检测所述生物样品中的突触。

97. 如权利要求96所述的方法,还包括步骤a)之前的步骤,即从个体获得生物样品。

98. 如权利要求96或权利要求97所述的方法,其中所述生物样品包括组织活检样本、组织或细胞。

99. 如权利要求96-98中任一项所述的方法,其中所述抗体通过免疫荧光显微技术、免疫细胞化学、免疫组织化学、ELISA、FACS分析、免疫沉淀检测反应或微型正电子发射断层扫描方法被检测。



## 人源化抗-补体因子C1q抗体及其应用

[0001] 相关申请

[0002] 本申请要求2014年11月5日提交的美国临时申请62/075,793的权利,通过引用将其全部内容并入本文。

[0003] 背景

[0004] 1. 领域

[0005] 本公开涉及抗C1q抗体以及其使用的方法。

[0006] 2. 相关技术描述

[0007] 过多的补体活化与许多疾病状况有关,包括多种炎性和自身免疫疾病。近来,补体系统已被证明对神经退行性疾病的病理学有贡献。具体而言,补体因子,例如C1q,已经被证明在神经元突触中表达,并且标志所述突触的清除。参见,例如,美国专利公开文本Nos. 2012/0195880和2012/328601。虽然选择性突触丢失是正常脑发育中必要的方面(“突触修剪”),但过多的突触丢失,特别是在成熟的或老化的脑中,导致神经退化和认知减退。在正常的老化过程中和神经退行性疾病的进展中,升高的突触补体表达被发现对突触的丢失有贡献。相反,降低神经元补体表达被发现具有神经保护作用。基于这些发现,中和补体因子例如C1q的活性被认为是有前景的防止突触丢失并减缓神经退行性疾病的进展以及正常老化过程中的认知减退的治疗策略。

[0008] 涉及突触丢失并被认为是可以进行以中和补体因子例如C1q为目的的治疗的神经退行性疾病包括阿尔茨海默病、肌萎缩性侧索硬化症、多发性硬化、青光眼、肌强直性营养不良、唐氏综合症、帕金森病、亨廷顿病等等。

[0009] 到目前为止仅有有限数量的补体中和抗体是已知的(参见,例如,Klos A. et al., Mol Immunol. 2009, 46 (14), 2753-2766; Carroll S. & Georgiou G., Immunobiology 2013, 218 (8), 1041-1048; Tuzun et al., J. Neuroimmunol. 2007, 182, 167-176; Nelson et al., J. Clin. Invest. 2006, 116: 2892-2900; Heinz et al., J. Immunol. 1984, 133, 400-404; Jiang et al., J. Immunol. 1991, 146, 2324-2330; Trinder et al., Scand. J. Immunol. 1999, 50, 635-641; Hwang et al., Mol. Immunol. 2008, 45, 2570-2580)。到目前为止,只有C5中和抗体Eculizumab(一种终末补体活化途径的抑制剂)获得了注册审批;Eculizumab被销售以用于治疗阵发性睡眠性血红蛋白尿症(PNH; Hillmen et al., N Engl J Med. 2006, 355 (12): 1233-43)。

[0010] 因此,需要开发与补体因子例如C1q特异性地结合并中和其生物活性的其它抗体。

[0011] 本文引用的所有参考文献,包括专利申请和公开文本,都通过引用将其全文合并入本文。

[0012] 简述

[0013] 本文提供了人源化抗C1q抗体和使用人源化抗C1q抗体的方法。

[0014] 在某些方面,本公开提供了与C1q蛋白特异性结合的人源化抗体,其中所述抗体包括重链可变区和人重链恒定区,其中所述重链可变区包括Fab区,并且所述重链恒定区包括Fc区,其中所述Fab区与C1q蛋白特异性结合,并且其中所述Fc区不能结合C1q蛋白。

[0015] 在一些可与任意前述实施方案相组合的实施方案中,所述Fc区不能诱导补体活性。在一些可与任意前述实施方案相组合的实施方案中,所述Fc区不能诱导抗体依赖细胞毒性(ADCC)。在一些可与任意前述实施方案相组合的实施方案中,所述人重链恒定区是人IgG4重链恒定区。在一些可与任意前述实施方案相组合的实施方案中,所述人IgG4重链恒定区包括SEQ ID NO:37的氨基酸序列,或者具有与SEQ ID NO:37的所述氨基酸序列至少约90%同源性的氨基酸序列。在一些可与任意前述实施方案相组合的实施方案中,所述人IgG4重链恒定区包括Fc区,并且其中所述Fc区包括一个或更多个修饰。在一些可与任意前述实施方案相组合的实施方案中,所述Fc区包括一个或更多个氨基酸置换。在一些可与任意前述实施方案相组合的实施方案中,所述Fc区包括在根据Kabat编号规则248位点处的氨基酸置换。在一些可与任意前述实施方案相组合的实施方案中,所述Fc区包括在根据Kabat编号规则248位点处的亮氨酸到谷氨酸的置换。在一些可与任意前述实施方案相组合的实施方案中,所述Fc区包括在根据Kabat编号规则248位点处的氨基酸置换抑制所述Fc区与Fc受体间的相互作用。在一些可与任意前述实施方案相组合的实施方案中,所述Fc区包括在根据Kabat编号规则241位点处的氨基酸置换。在一些可与任意前述实施方案相组合的实施方案中,所述Fc区包括在根据Kabat编号规则241位点处的丝氨酸到脯氨酸的置换。在一些可与任意前述实施方案相组合的实施方案中,所述Fc区包括在根据Kabat编号规则241位点处的氨基酸置换阻止在所述抗体中的臂转换。在一些可与任意前述实施方案相组合的实施方案中,所述抗体包括,所述Fc区包括SEQ ID NO:37的氨基酸序列,或者具有与SEQ ID NO:37的所述氨基酸序列至少约70%、至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%或至少约90%同源性的氨基酸序列。在一些可与任意前述实施方案相组合的实施方案中,所述抗体包括重链可变域和轻链可变域,其中所述重链可变域包括选自SEQ ID NOs:1-4的氨基酸序列,或者具有与选自SEQ ID NOs:1-4的所述氨基酸序列至少约90%同源性的氨基酸序列。在一些可与任意前述实施方案相组合的实施方案中,所述轻链可变域包括选自SEQ ID NOs:5-8的氨基酸序列,或者具有与选自SEQ ID NOs:5-8的所述氨基酸序列至少约90%同源性的氨基酸序列。

[0016] 在某些方面,本公开提供了人源化抗C1q抗体,或其抗原结合片段,所述抗体包括重链可变域和轻链可变域,其中所述重链可变域包括选自SEQ ID NOs:1-4的氨基酸序列,或者具有与选自SEQ ID NOs:1-4的所述氨基酸序列至少约90%同源性的氨基酸序列。

[0017] 在某些方面,本公开提供了人源化抗C1q抗体,或其抗原结合片段,所述抗体包括重链可变域和轻链可变域,其中所述轻链可变域包括选自SEQ ID NOs:5-8的氨基酸序列,或者具有与选自SEQ ID NOs:5-8的所述氨基酸序列至少约90%同源性的氨基酸序列。

[0018] 在某些方面,本公开提供了人源化抗C1q抗体,或其抗原结合片段,所述抗体包括:  
a) 重链可变域,所述重链可变域包括选自SEQ ID NOs:1-4的氨基酸序列,或者具有与选自SEQ ID NOs:1-4的所述氨基酸序列至少约90%同源性的氨基酸序列;和/或b) 轻链可变域,所述轻链可变域包括选自SEQ ID NOs:5-8的氨基酸序列,或者具有与选自SEQ ID NOs:5-8的所述氨基酸序列至少约90%同源性的氨基酸序列。

[0019] 在某些方面,本公开提供了人源化抗C1q抗体,或其抗原结合片段,所述抗体包括:  
a) 重链可变域,所述重链可变域包括SEQ ID NO:1的氨基酸序列,或者具有与SEQ ID NO:1的所述氨基酸序列至少约90%同源性的氨基酸序列;和b) 轻链可变域,所述轻链可变域包

括选自SEQ ID NOs:5-8的氨基酸序列,或者具有与选自SEQ ID NOs:5-8的所述氨基酸序列至少约90%同源性的氨基酸序列。在某些方面,本公开提供了人源化抗C1q抗体,或其抗原结合片段,所述抗体包括:a)重链可变域,所述重链可变域包括SEQ ID NO:2的氨基酸序列,或者具有与SEQ ID NO:2的所述氨基酸序列至少约90%同源性的氨基酸序列;和b)轻链可变域,所述轻链可变域包括选自SEQ ID NOs:5-8的氨基酸序列,或者具有与选自SEQ ID NOs:5-8的所述氨基酸序列至少约90%同源性的氨基酸序列。在某些方面,本公开提供了人源化抗C1q抗体,或其抗原结合片段,所述抗体包括:a)重链可变域,所述重链可变域包括SEQ ID NO:3的氨基酸序列,或者具有与SEQ ID NO:3的所述氨基酸序列至少约90%同源性的氨基酸序列;和b)轻链可变域,所述轻链可变域包括选自SEQ ID NOs:5-8的氨基酸序列,或者具有与选自SEQ ID NOs:5-8的所述氨基酸序列至少约90%同源性的氨基酸序列。在某些方面,本公开提供了人源化抗C1q抗体,或其抗原结合片段,所述抗体包括:a)重链可变域,重链可变域包括SEQ ID NO:4的氨基酸序列,或者具有与SEQ ID NO:4的所述氨基酸序列至少约90%同源性的氨基酸序列;和b)轻链可变域,所述轻链可变域包括选自SEQ ID NOs:5-8的氨基酸序列,或者具有与选自SEQ ID NOs:5-8的所述氨基酸序列至少约90%同源性的氨基酸序列。

[0020] 在某些方面,本公开提供了人源化抗C1q抗体,或其抗原结合片段,所述抗体包括:a)重链可变域,所述重链可变域包括选自SEQ ID NOs:1-4的氨基酸序列,或者具有与选自SEQ ID NOs:1-4的所述氨基酸序列至少约90%同源性的氨基酸序列;和b)轻链可变域,所述轻链可变域包括SEQ ID NO:5的氨基酸序列,或者具有与SEQ ID NO:5的所述氨基酸序列至少约90%同源性的氨基酸序列。在某些方面,本公开提供了人源化抗C1q抗体,或其抗原结合片段,所述抗体包括:a)重链可变域,所述重链可变域包括选自SEQ ID NOs:1-4的氨基酸序列,或者具有与选自SEQ ID NOs:1-4的所述氨基酸序列至少约90%同源性的氨基酸序列;和b)轻链可变域,所述轻链可变域包括SEQ ID NO:6的氨基酸序列,或者具有与SEQ ID NO:6的所述氨基酸序列至少约90%同源性的氨基酸序列。在某些方面,本公开提供了人源化抗C1q抗体,或其抗原结合片段,所述抗体包括:a)重链可变域,所述重链可变域包括选自SEQ ID NOs:1-4的氨基酸序列,或者具有与选自SEQ ID NOs:1-4的所述氨基酸序列至少约90%同源性的氨基酸序列;和b)轻链可变域,所述轻链可变域包括SEQ ID NO:7的氨基酸序列,或者具有与SEQ ID NO:7的所述氨基酸序列至少约90%同源性的氨基酸序列。在某些方面,本公开提供了人源化抗C1q抗体,或其抗原结合片段,所述抗体包括:a)重链可变域,所述重链可变域包括选自SEQ ID NOs:1-4的氨基酸序列,或者具有与选自SEQ ID NOs:1-4的所述氨基酸序列至少约90%同源性的氨基酸序列;和b)轻链可变域,所述轻链可变域包括SEQ ID NO:8的氨基酸序列,或者具有与SEQ ID NO:8的所述氨基酸序列至少约90%同源性的氨基酸序列。

[0021] 在某些方面,本公开提供了人源化抗C1q抗体,或其抗原结合片段,所述抗体包括:a)重链可变域,所述重链可变域包括SEQ ID NO:1的氨基酸序列,或者具有与SEQ ID NO:1的所述氨基酸序列至少约90%同源性的氨基酸序列;和b)轻链可变域,所述轻链可变域包括SEQ ID NO:5的氨基酸序列,或者具有与SEQ ID NO:5的所述氨基酸序列至少约90%同源性的氨基酸序列。在某些方面,本公开提供了人源化抗C1q抗体,或其抗原结合片段,所述抗体包括:a)重链可变域,所述重链可变域包括SEQ ID NO:1的氨基酸序列,或者具有与SEQ



述轻链可变域包括SEQ ID NO:7的氨基酸序列,或者具有与SEQ ID NO:7的所述氨基酸序列至少约90%同源性的氨基酸序列。在某些方面,本公开提供了人源化抗C1q抗体,或其抗原结合片段,所述抗体包括:a)重链可变域,所述重链可变域包括SEQ ID NO:3的氨基酸序列,或者具有与SEQ ID NO:3的所述氨基酸序列至少约90%同源性的氨基酸序列;和b)轻链可变域,所述轻链可变域包括SEQ ID NO:8的氨基酸序列,或者具有与SEQ ID NO:8的所述氨基酸序列至少约90%同源性的氨基酸序列。

[0024] 在某些方面,本公开提供了人源化抗C1q抗体,或其抗原结合片段,所述抗体包括:a)重链可变域,所述重链可变域包括SEQ ID NO:4的氨基酸序列,或者具有与SEQ ID NO:4的所述氨基酸序列至少约90%同源性的氨基酸序列;和b)轻链可变域,所述轻链可变域包括SEQ ID NO:5的氨基酸序列,或者具有与SEQ ID NO:5的所述氨基酸序列至少约90%同源性的氨基酸序列。在某些方面,本公开提供了人源化抗C1q抗体,或其抗原结合片段,所述抗体包括:a)重链可变域,所述重链可变域包括SEQ ID NO:4的氨基酸序列,或者具有与SEQ ID NO:4的所述氨基酸序列至少约90%同源性的氨基酸序列;和b)轻链可变域,所述轻链可变域包括SEQ ID NO:6的氨基酸序列,或者具有与SEQ ID NO:6的所述氨基酸序列至少约90%同源性的氨基酸序列。在某些方面,本公开提供了人源化抗C1q抗体,或其抗原结合片段,所述抗体包括:a)重链可变域,所述重链可变域包括SEQ ID NO:4的氨基酸序列,或者具有与SEQ ID NO:4的所述氨基酸序列至少约90%同源性的氨基酸序列;和b)轻链可变域,所述轻链可变域包括SEQ ID NO:7的氨基酸序列,或者具有与SEQ ID NO:7的所述氨基酸序列至少约90%同源性的氨基酸序列。在某些方面,本公开提供了人源化抗C1q抗体,或其抗原结合片段,所述抗体包括:a)重链可变域,所述重链可变域包括SEQ ID NO:4的氨基酸序列,或者具有与SEQ ID NO:4的所述氨基酸序列至少约90%同源性的氨基酸序列;和b)轻链可变域,所述轻链可变域包括SEQ ID NO:8的氨基酸序列,或者具有与SEQ ID NO:8的所述氨基酸序列至少约90%同源性的氨基酸序列。

[0025] 在一些可与任意前述实施方案相组合的实施方案中,所述抗体与人C1q和小鼠C1q二者特异性地结合。在一些可与任意前述实施方案相组合的实施方案中,所述抗体与大鼠C1q特异性地结合。在一些可与任意前述实施方案相组合的实施方案中,所述抗体与人C1q、小鼠C1q和大鼠C1q特异性地结合。在一些可与任意前述实施方案相组合的实施方案中,所述抗体或其抗原结合片段结合与抗体M1或其抗C1q结合片段实质上相同的C1q表位,所述抗体M1是由具有ATCC登录号PTA-120399的杂交瘤细胞系产生的。在一些可与任意前述实施方案相组合的实施方案中,所述抗体或其抗原结合片段抑制单克隆抗体M1与人C1q或小鼠C1q的结合,所述单克隆抗体M1是由ATCC登录号PTA-120399的杂交瘤细胞系产生的。在一些可与任意前述实施方案相组合的实施方案中,所述抗体属于IgG类。在一些可与任意前述实施方案相组合的实施方案中,所述抗体具有IgG1、IgG2、IgG3或IgG4同种型。在一些可与任意前述实施方案相组合的实施方案中,所述抗体具有IgG4同种型。在一些可与任意前述实施方案相组合的实施方案中,所述抗体包括人IgG4恒定区。在一些可与任意前述实施方案相组合的实施方案中,所述人IgG4重链恒定区包括SEQ ID NO:37的氨基酸序列,或者具有与SEQ ID NO:37的所述氨基酸序列至少约90%同源性的氨基酸序列。在一些可与任意前述实施方案相组合的实施方案中,所述人IgG4恒定区包括Fc区。在一些可与任意前述实施方案相组合的实施方案中,所述Fc区不能结合所述C1q蛋白。在一些可与任意前述实施方案相组

合的实施方案中,所述Fc区不能诱导补体活性。在一些可与任意前述实施方案相组合的实施方案中,所述Fc区不能诱导抗体依赖细胞毒性(ADCC)。在一些可与任意前述实施方案相组合的实施方案中,所述Fc区包括一个或更多个修饰。在一些可与任意前述实施方案相组合的实施方案中,所述Fc区包括一个或更多个氨基酸置换。在一些可与任意前述实施方案相组合的实施方案中,所述Fc区包括在根据Kabat编号规则248位点处的氨基酸置换。在一些可与任意前述实施方案相组合的实施方案中,所述Fc区包括在根据Kabat编号规则248的位点处的亮氨酸到谷氨酸的氨基酸置换。在一些可与任意前述实施方案相组合的实施方案中,所述在根据Kabat编号规则248位点处的氨基酸置换抑制所述Fc区与Fc受体的相互作用。在一些可与任意前述实施方案相组合的实施方案中,所述Fc区包括在根据Kabat编号规则241位点处的氨基酸置换。在一些可与任意前述实施方案相组合的实施方案中,所述Fc区包括在根据Kabat编号规则241位点处的丝氨酸到脯氨酸的氨基酸置换。在一些可与任意前述实施方案相组合的实施方案中,所述在根据Kabat编号规则241位点处的氨基酸置换阻止在所述抗体中的臂转换。在一些可与任意前述实施方案相组合的实施方案中,所述抗体是双特异性抗体。在一些可与任意前述实施方案相组合的实施方案中,所述抗体已经被工程化以提高脑穿透性。在一些可与任意前述实施方案相组合的实施方案中,所述抗体是识别第一抗原和第二抗原的双特异性抗体。在一些可与任意前述实施方案相组合的实施方案中,所述第一抗原是C1q蛋白,所述第二抗原是便利运输通过血脑屏障的抗原。在一些可与任意前述实施方案相组合的实施方案中,所述第二抗原选自转铁蛋白受体(TR)、胰岛素受体(HIR)、胰岛素样生长因子受体(IGFR)、低密度脂蛋白受体相关蛋白1和2(LPR-1和2)、白喉毒素受体、CRM197、美洲驼单域抗体、TMEM 30(A)、蛋白质转导域、TAT、Syn-B、穿膜肽、聚精氨酸肽、angiopep肽和ANG1005。在一些可与任意前述实施方案相组合的实施方案中,所述抗原结合片段是Fab、F(ab')<sub>2</sub>或Fab'片段。在一些可与任意前述实施方案相组合的实施方案中,所述抗体片段较之于所述抗体片段的相应的全长抗体具有更好的脑穿透性。在一些可与任意前述实施方案相组合的实施方案中,所述抗体片段较之于所述抗体片段的相应的全长抗体具有更短的半衰期。在一些可与任意前述实施方案相组合的实施方案中,所述抗体对于人C1q具有从小于约10pM到小于约5pM范围的解离常数(K<sub>d</sub>)。在一些可与任意前述实施方案相组合的实施方案中,所述抗体对于小鼠C1q具有从小于约125nM到小于约5pM范围的解离常数(K<sub>d</sub>)。在一些可与任意前述实施方案相组合的实施方案中,所述抗体与C1q特异性地结合,并中和C1q的生物活性。在一些可与任意前述实施方案相组合的实施方案中,所述生物活性是(1) C1q与自身抗体结合,(2) C1q与C1r结合,(3) C1q与C1s结合,(4) C1q与磷脂酰丝氨酸结合,(5) C1q与穿透素-3结合,(6) C1q与C-反应蛋白(CRP)结合,(7) C1q与球形C1q受体(gC1qR)结合,(8) C1q与补体受体1(CR1)结合,(9) C1q与β-淀粉样蛋白结合,或(10) C1q与钙网蛋白结合。在一些可与任意前述实施方案相组合的实施方案中,所述生物活性是(1) 传统补体活化通路的激活,(2) 抗体和补体依赖细胞毒性的激活,(3) CH50溶血,(4) 突触丢失,(5) B-细胞抗体产生,(6) 树突细胞成熟,(7) T-细胞增殖,(8) 细胞因子产生,(9) 小胶质细胞激活,(10) 阿瑟氏反应,(11) 突触或神经末梢的吞噬作用,或(12) 补体受体3(CR3/C3)表达细胞的激活。在一些可与任意前述实施方案相组合的实施方案中,CH50溶血包括人、小鼠和/或大鼠CH50溶血。在一些可与任意前述实施方案相组合的实施方案中,所述抗体能中和从至少约50%到至少约90%的CH50溶血。在一些可与任意前述实施方案相组合的

实施方案中,所述抗体能以小于150ng、小于100ng、小于50ng或小于20ng的剂量中和至少50%的CH50溶血。在一些可与任意前述实施方案相组合的实施方案中,所述抗体以从20:1至1.0:1的范围或小于1.0:1的结合化学计量结合C1q。

[0026] 在某些方面,本公开提供了一种分离的多核苷酸,所述分离的多核苷酸包括编码任意前述实施方案中所述人源化抗C1q抗体的核酸序列。在某些方面,本公开提供了一种分离的宿主细胞,所述分离的宿主细胞包括任意前述实施方案中所述的核酸序列。在某些方面,本公开提供了一种药物组合物,所述药物组合物包括任意前述实施方案中所述的人源化抗C1q抗体和药学上可接受的载体。

[0027] 在某些方面,本公开提供了一种在需要这种治疗的个体中治疗或预防与补体活化相关的疾病的方法,所述方法包括施用治疗有效量的任意前述实施方案的人源化抗C1q抗体的步骤。在其他方面,本公开提供了用于在需要这种治疗的个体中治疗或预防与补体活化相关的疾病的任意前述实施方案的人源化抗C1q抗体。在其他方面,本公开提供了任意前述实施方案的人源化抗C1q抗体在制造用于在需要这种治疗的个体中治疗或预防与补体活化相关的疾病的药物中的用途。

[0028] 在一些可与前述任一实施方案相组合的实施方案中,所述与补体活化相关的疾病是神经退行性病症。在一些可与前述任一实施方案相组合的实施方案中,所述神经退行性病症与突触的丢失或丢失神经连接有关。在一些可与前述任一实施方案相组合的实施方案中,所述神经退行性病症与依赖于补体受体3 (CR3) /C3或补体受体CR1的突触丢失有关。在一些可与前述任一实施方案相组合的实施方案中,所述神经退行性病症与依赖于病理活性的突触修剪有关。在一些可与前述任一实施方案相组合的实施方案中,所述神经退行性病症与小胶质细胞对突触的吞噬作用有关。在一些可与前述任一实施方案相组合的实施方案中,所述神经退行性病症选自阿尔茨海默病、肌萎缩性侧索硬化症、多发性硬化、青光眼、肌强直性营养不良、格林-巴利综合征 (GBS)、重症肌无力、大疱性类天疱疮、脊髓性肌萎缩、唐氏综合症、帕金森病和亨廷顿病。在一些可与前述任一实施方案相组合的实施方案中,所述与补体活化相关的疾病是炎性疾病、自身免疫疾病或代谢失调。在一些可与前述任一实施方案相组合的实施方案中,所述炎性疾病、自身免疫疾病或代谢失调选自糖尿病、肥胖症、类风湿性关节炎 (RA)、急性呼吸窘迫综合症 (ARDS)、局部缺血和再灌注之后的远端组织损伤、体外循环手术过程中的补体活化、皮炎、天疱疮、狼疮性肾炎及导致的肾小球性肾炎和脉管炎、体外循环、心脏停搏液诱导的冠状动脉内皮功能障碍、II型膜增生性肾小球肾炎、IgA肾病、急性肾衰竭、冷球蛋白血症、抗磷脂综合症、慢性开角青光眼、急性闭角青光眼、黄斑变性疾病、老年性黄斑变性 (AMD)、(AMD-湿性)、地图状萎缩脉络膜血管新生 (CNV)、葡萄膜炎、糖尿病视网膜病变、缺血性视网膜病变、眼内炎、眼内血管新生疾病、糖尿病黄斑水肿、病理性近视、小脑视网膜血管瘤、眼组织胞浆菌病、视神经脊髓炎 (NMO)、视网膜中央静脉阻塞 (CRVO)、角膜血管新生、视网膜血管新生、利伯氏遗传性视神经病变、视神经炎、白塞氏视网膜病变、缺血性视神经病变、视网膜血管炎、ANCA血管炎、普尔夏视网膜病变、斯耶格伦干眼症、干性AMD、结节病、颞动脉炎、结节性多发性动脉炎、多发硬化症、移植排斥、超急性排斥反应、血液透析、慢性阻塞性肺病 (COPD)、哮喘和吸入性肺炎。在一些可与前述任一实施方案相组合的实施方案中,与补体活化相关的疾病是自身免疫疾病,所述自身免疫疾病选自重症肌无力、1型糖尿病、桥本氏甲状腺炎、阿狄森氏病、乳糜泻、克罗恩氏病、恶性

贫血、慢性天疱疮、白癜风、自身免疫性溶血性贫血、副肿瘤综合征、脉管炎疾病、低补体血症荨麻疹性血管炎(HUV)、风湿性多肌痛症、颞动脉炎和韦格纳肉芽肿。

[0029] 在某些方面,本公开提供了一种试剂盒和包装说明书,所述试剂盒包括前述任一实施方案中所述的人源化抗C1q抗体,所述包装说明书包括使用该抗体在需要这种治疗的个体中治疗或预防与补体活化相关的疾病的说明。在一些实施方案中,所述与补体活化相关的疾病是神经退行性病症。在一些实施方案中,所述神经退行性病症与突触的丢失或丢失神经连接有关。在一些实施方案中,所述神经退行性病症与依赖于补体受体3(CR3)/C3或补体受体CR1的突触丢失有关。在一些实施方案中,所述神经退行性病症与依赖于病理活性的突触修剪有关。在一些实施方案中,所述神经退行性病症与小胶质细胞对突触的吞噬作用有关。在一些实施方案中,所述神经退行性病症选自阿尔茨海默病、肌萎缩性侧索硬化症、多发性硬化、青光眼、肌强直性营养不良、唐氏综合症、帕金森病和亨廷顿病。在一些实施方案中,所述与补体活化相关的疾病是炎性疾病、自身免疫疾病或代谢失调。在一些实施方案中,所述炎性疾病、自身免疫疾病或代谢失调选自糖尿病、肥胖症、类风湿性关节炎(RA)、急性呼吸窘迫综合症(ARDS)、缺血和再灌注之后的远端组织损伤、体外循环手术过程中的补体活化、皮炎、天疱疮、狼疮性肾炎及导致的肾小球性肾炎和脉管炎、体外循环、心脏停搏液诱导的冠状动脉内皮功能障碍、II型膜增生性肾小球肾炎、IgA肾病、急性肾衰竭、冷球蛋白血症、抗磷脂综合症、慢性开角青光眼、急性闭角青光眼、黄斑变性疾病、老年性黄斑变性(AMD)、地图状萎缩、脉络膜血管新生(CNV)、葡萄膜炎、糖尿病视网膜病变、缺血性视网膜病变、眼内炎、眼内血管新生疾病、糖尿病黄斑水肿、病理性近视、小脑视网膜血管瘤、眼组织胞浆菌病、视神经脊髓炎(NMO)、视网膜中央静脉阻塞(CRVO)、角膜血管新生、视网膜血管新生、利伯氏世袭视神经病变、视神经炎、白塞氏视网膜病变、缺血性视神经病变、视网膜血管炎、ANCA血管炎、普尔夏视网膜病变、斯耶格伦干眼症、干性AMD、结节病、颞动脉炎、结节性多发性动脉炎、多发硬化症、移植排斥、超急性排斥反应、血液透析、慢性阻塞性肺病(COPD)、哮喘和吸入性肺炎。在一些实施方案中,所述与补体活化相关的疾病是自身免疫疾病,所述自身免疫疾病选自重症肌无力、I型糖尿病、桥本氏甲状腺炎、阿狄森氏病、乳糜泻、克罗恩氏病、恶性贫血、慢性天疱疮、白癜风、自身免疫性溶血性贫血、副肿瘤综合征、脉管炎疾病、低补体血症荨麻疹性血管炎(HUV)、风湿性多肌痛症、颞动脉炎和韦格纳肉芽肿。

[0030] 在某些方面,本公开提供了一种包括任意前述实施方案中所述的人源化抗C1q抗体的试剂盒。在一些实施方案中,所述试剂盒用于本文公开的诊断或治疗应用。

[0031] 在某些方面,本公开提供了一种检测个体中的突触的方法,该方法包括a)给前述任一实施方案所述个体施用人源化抗C1q抗体,和b)检测与突触结合的抗体,由此检测所述个体中的突触。在其他方面,本公开提供前述任一实施方案所述抗C1q抗体在检测个体中的突触中的应用。在其他方面,本公开提供前述任一实施方案所述抗C1q抗体在制备用于检测个体中突触的药物中的应用。在一些可与前述任一实施方案相组合的实施方案中,所述与突触结合的抗体是通过使用成像技术检测的,所述成像技术选自正电子发射断层摄影术(PET)、X-射线计算机断层摄影术、单光子发射计算机断层摄影术(SPECT)、计算机断层摄影术(CT)和轴向计算机断层摄影术(CAT)。在一些可与任意前述实施方案相组合的实施方案中,对与突触结合的抗体的检测提供了对所述个体中突触数量的定量测量。在一些可与前述任一实施方案相组合的实施方案中,所述个体患有神经退行性疾病或自身免疫疾病。在



一些可与前述任一实施方案相组合的实施方案中,所述个体中的突触数量在一段时间内被重复测量,并且所述个体中突触丢失随时间被检测。在一些可与前述任一实施方案相组合的实施方案中,突触随时间的丢失是对神经退行性疾病或自身免疫疾病的治疗效力的测量。

[0032] 在某些方面,本公开提供了一种检测生物样品中突触的方法,所述方法包括a)使所述生物样品与前述任一实施方案所述的人源化抗C1q抗体接触,和b)检测与突触结合的抗体,由此检测所述生物样品中的突触。

[0033] 在一些可与前述任一实施方案相组合的实施方案中,所述的方法还包括步骤a)之前的步骤,即从个体获得生物样品。在一些可与前述任一实施方案相组合的实施方案中,所述生物样品包括组织活检样本、组织或细胞。在一些可与前述任一实施方案相组合的实施方案中,所述抗体通过免疫荧光显微技术、免疫细胞化学、免疫组织化学、ELISA、FACS分析、免疫沉淀检测反应或微型正电子发射断层扫描方法被检测。

[0034] 应当理解,本文所述的各个实施方案中的一个、一些或所有特征可以组合以形成本文提供的组合物和方法的其它实施方案。本文提供的组合物的这些和其它方面对本领域技术人员来说将是显而易见的。

## 附图说明

[0035] 图1图示轻链和重链表达载体的质粒图谱。图1A图示轻链表达载体pANTV $\kappa$ 的质粒图谱。图1B图示重链表达载体pANTVhG4 (S241P L248E)的质粒图谱。载体VH和V $\kappa$ 两者都包含基因组DNA片段,所述基因组DNA片段中合并了内含子和polyA序列。两种链段的表达都是由CMV启动子驱动的,筛选(在重链载体上)经由DHFR mini gene。

[0036] 图2A图示了M1抗体的重链可变区(VH)的氨基酸序列和人源化VH变体VH1-VH2的氨基酸序列的比对。图2B图示了M1抗体的重链可变区(VH)的氨基酸序列和人源化VH变体VH3-VH4的氨基酸序列的比对。图2C图示了M1抗体的kappa轻链可变区(V $\kappa$ )的氨基酸序列和人源化V $\kappa$ 变体V $\kappa$ 1-V $\kappa$ 2的氨基酸序列的比对。图2D图示了M1抗体的kappa轻链可变区(V $\kappa$ )的氨基酸序列和人源化V $\kappa$ 变体V $\kappa$ 3-V $\kappa$ 4的氨基酸序列的比对。

[0037] 图3图示蛋白A纯化抗体的考马斯亮蓝染色的聚丙烯酰胺凝胶电泳图。以每个样品2 $\mu$ g加载到NuPage 4-12%Bis-Tris凝胶中,并且在200V下运行35分钟。分子量标记是预染色的蛋白标准Fermentas PageRuler Plus。

[0038] 图4图示人C1q竞争ELISA测定。一系列稀释的纯化人源化抗C1q抗体与固定浓度的生物素酰化的单克隆抗体M1竞争结合人C1q。结合的生物素酰化M1抗体通过链霉亲和素-过氧化物酶共轭物和TMB底物而被检测。图4A图示与人源化抗体VH1/V $\kappa$ 1、VH1/V $\kappa$ 2和VH1/V $\kappa$ 3的结果。图4B图示与人源化抗体VH1/V $\kappa$ 4、VH2/V $\kappa$ 1、VH2/V $\kappa$ 2、VH2/V $\kappa$ 3和VH2/V $\kappa$ 4的结果。图4C图示与人源化抗体VH3/V $\kappa$ 1、VH3/V $\kappa$ 2、VH3/V $\kappa$ 3和VH3/V $\kappa$ 4的结果。图4D图示与人源化抗体VH4/V $\kappa$ 1、VH4/V $\kappa$ 2、VH4/V $\kappa$ 3和VH4/V $\kappa$ 4的结果。

[0039] 图5图示小鼠C1q的竞争ELISA测定。一系列稀释的纯化人源化抗C1q抗体与固定浓度的嵌合M1抗体竞争结合小鼠C1q。结合的生物素酰化嵌合M1通过链霉亲和素-过氧化物酶共轭物和TMB底物而被检测。

[0040] 图6图示凝胶过滤纯化的抗体的考马斯亮蓝染色的聚丙烯酰胺凝胶电泳图。1 $\mu$ g的

每个样品加载到NuPage 4-12%Bis-Tris凝胶中,并且在200V下运行35分钟。分子量标记(M)是预染色的蛋白标准Fermentas PageRuler Plus。泳道1图示Fab VH3/Vκ3降低;泳道2图示Fab VH3/Vκ3未降低;泳道3图示IgG VH3/Vκ3降低;泳道4图示IgG VH3/Vκ3未降低。

[0041] 图7图示说明在人的抗C1q抗体的C1q中和活性,以及大鼠CH50溶血在剂量响应模式方面的测定。图7A图示说明来自人CH50溶血测定的结果。图7B图示说明来自大鼠CH50溶血测定的结果。“ANN-005”对应于单克隆抗体M1,“3E2”对应于嵌合M1抗体,“2B12”对应于抗体VH1/Vκ1,“5H7”对应于抗体VH3/Vκ3,“3F1”对应于抗体VH3/Vκ4,并且“1D3”对应于抗体VH4/Vκ3。

[0042] 图8图示在15mg/Kg和100mg/Kg剂量下单次静脉施用,猴体内血清5H7水平的时间进程。

[0043] 图9图示说明在15mg/Kg和100mg/Kg剂量下单次静脉施用,猴体内血清C1q水平的时间进程。图9A图示通过JL1-M1测定,猴体内血清C1q水平的时间进程。图9B图示通过JL1-JL1测定,猴体内血清C1q水平的时间进程。

[0044] 图10示出在15mg/Kg和100mg/Kg剂量下单次静脉施用,猴体内血清溶血的持续降低。

[0045] 详细说明

[0046] 通用技术

[0047] 对于本领域技术人员来说,本文所描述的和引用的技术和方法一般是容易理解的,并且通常通过常规方法加以使用,如,例如Sambrook et al.,*Molecular Cloning:A Laboratory Manual* 3d edition(2001) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.;*Current Protocols in Molecular Biology* (F.M.Ausubel, et al.eds.,(2003));the series *Methods in Enzymology* (Academic Press, Inc.):*PCR 2:A Practical Approach* (M.J.MacPherson, B.D.Hames and G.R.Taylor eds. (1995)), Harlow and Lane, eds. (1988) *Antibodies, A Laboratory Manual*, and *Animal Cell Culture* (R.I.Freshney, ed. (1987));*Oligonucleotide Synthesis* (M.J.Gait, ed., 1984);*Methods in Molecular Biology*, Humana Press;*Cell Biology:A Laboratory Notebook* (J.E.Cellis, ed., 1998) Academic Press;*Animal Cell Culture* (R.I.Freshney), ed., 1987);*Introduction to Cell and Tissue Culture* (J.P.Mather and P.E.Roberts, 1998) Plenum Press;*Cell and Tissue Culture:Laboratory Procedures* (A.Doyle, J.B.Griffiths, and D.G.Newell, eds., 1993-8) J.Wiley and Sons;*Handbook of Experimental Immunology* (D.M.Weir and C.C.Blackwell, eds.);*Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells* (J.M.Miller and M.P.Calos, eds., 1987);*PCR:The Polymerase Chain Reaction*, (Mullis et al., eds., 1994);*Current Protocols in Immunology* (J.E.Coligan et al., eds., 1991);*Short Protocols in Molecular Biology* (Wiley and Sons, 1999);*Immunobiology* (C.A.Janeway and P.Travers, 1997);*Antibodies* (P.Finch, 1997);*Antibodies:A Practical Approach* (D.Catty., ed., IRL Press, 1988-1989);*Monoclonal Antibodies:A Practical Approach* (P.Shepherd and C.Dean, eds., Oxford University Press, 2000);*Using Antibodies:A Laboratory Manual* (E.Harlow and D.Lane (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999);*The*

Antibodies (M.Zanetti and J.D.Capra, eds., Harwood Academic Publishers, 1995); 和 Cancer: Principles and Practice of Oncology (V.T.DeVita et al., eds., J.B.Lippincott Company, 1993) 中所述的广泛使用的方法。

[0048] 定义

[0049] 如本文所使用的, 术语“预防”包括针对个体中特定疾病、病症或状况的发生或复发提供预防。个体可以是易患特定疾病、病症或状况或者对其敏感, 或者具有患这种疾病、病症或状况的风险, 但是还没有被诊断为患该疾病、病症或状况。

[0050] 如本文所使用的, 在使用本文所述的治疗方法之前, “具有”患特定疾病、病症或状况“的风险”的个体可以具有或不具有可检测到的疾病或疾病的症状, 并且可以表现出或不表现出可检测到的疾病或疾病的症状。如本领域已知的, “具有风险”是指个体具有一种或更多种风险因素, 所述风险因素是与特定疾病、病症或状况的发展有关的可测量的参数。具有一种或更多种这些风险因素的个体与没有一种或更多种这些风险因素的个体相比, 患特定疾病、病症或状况的可能性更高。

[0051] 如本文所使用的, 术语“治疗”指临床干预, 其目的在于在临床病理学的过程中改变接受治疗的个体的自然进程。令人满意的治疗效果包括减缓进展的速度, 改善或减轻病理状态, 以及缓解或改善特定疾病、病症或状况的预后。例如, 如果与特定疾病、病症或状况相关的一个或更多个症状被减轻或消除了, 则个体被成功“治疗”。

[0052] 针对剂量和一段必需的时间而言, “有效量”指获得所希望的治疗或预防结果的至少有效的量。有效量可以在一次或更多次施用中提供。

[0053] “治疗有效量”至少是产生对特定疾病、病症或状况的可测量的改善所需要的最小浓度。本文的治疗有效量可以根据以下因素而不同: 例如疾病状态、年龄、性别、和患者体重、以及抗C1q抗体在个体中引发所希望的反应的能力。治疗有效量还是这样的量, 其中抗C1q抗体的任何毒性或有害影响被治疗的有益效果超过。

[0054] “慢性”施用指以连续模式而不是急性模式施用药物, 以便在延长的时间内保持最初的治疗效果(活性)。“间歇”施用指治疗不是不间断地连续进行, 而是其性质是周期性的。

[0055] 如本文所使用的, 与另一种化合物或组合物“联合”施用包括同时施用和/或在不同的时间施用。联合施用还包括作为共制剂施用或作为单独的组合物施用, 包括以不同的给药频率或间隔, 以及使用相同的给药途径或不同的给药途径。

[0056] 为治疗、预防或降低风险的目的, “个体”指任何被分类为哺乳动物的动物, 包括人、家畜和农场动物、以及动物园、运动场或宠物动物, 例如狗、马、兔、牛、猪、仓鼠、沙鼠、小鼠、白鼬、大鼠、猫等等。在一些实施方案中, 个体是人。

[0057] 如本文所使用的, “自身抗体”指识别宿主抗原的任何抗体。

[0058] 术语“免疫球蛋白”(Ig) 在本文中可与“抗体”互换使用。本文的“抗体”以其最广泛的意义使用, 特别涵盖了单克隆抗体、多克隆抗体、由至少两个完整抗体形成的多特异性抗体(例如双特异性抗体), 以及抗体片段(只要其表现出所希望的生物学活性)。

[0059] 基本的4-链抗体单元是异四聚体的糖蛋白, 由两个相同的轻(L)链和两个相同的重(H)链组成。 $V_H$ 和 $V_L$ 配对在一起形成单个抗原结合部位。不同类别的抗体的结构和性质请参见, 例如, Basic and Clinical Immunology, 8th Ed., Daniel P.Stites, Abba I.Terr和 Tristram G.Parslow (eds.), Appleton&Lange, Norwalk, CT, 1994, page 71 and Chapter 6。

[0060] 来自任何脊椎动物的L链基于其恒定域的氨基酸序列可以被分为两种明显不同的类型,称为kappa(“κ”)和lambda(“λ”)。根据其重链(CH)的恒定域的氨基酸序列,免疫球蛋白可以被分为不同的类或同种型。存在五类免疫球蛋白:IgA、IgD、IgE、IgG和IgM,分别具有被称为alpha(“α”)、delta(“δ”)、epsilon(“ε”)、gamma(“γ”)和mu(“μ”)的重链。基于CH序列和功能的相对较小的差异,γ和α类被分为亚类(同种型),例如,人表达下述亚类:IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1和IgA2。不同类的免疫球蛋白的亚单元结构和三维构型是众所周知的,在例如Abbas et al.,*Cellular and Molecular Immunology*,4<sup>th</sup>ed.(W.B.Saunders Co.,2000)中进行了一般性地描述。

[0061] “天然抗体”通常是大约150,000道尔顿的异四聚体糖蛋白,由两条相同的轻(L)链和两个相同的重(H)链组成。每条轻链与一条重链通过一个共价二硫键相连,而不同的免疫球蛋白同种型的重链的二硫键的数量不同。每条重链和轻链还具有规则间隔排列的链内二硫桥。每条重链在一个末端具有可变域(VH),后面接着是多个恒定域。每条轻链在一个末端具有可变域(VL),在另一个末端具有恒定域;轻链的恒定域与重链的第一恒定域对齐,轻链可变域与重链可变域对齐。特定氨基酸残基被认为形成了轻链和重链可变域之间的界面。

[0062] “分离的”抗体(例如本公开的抗C1q抗体)是已被鉴别、分离和/或从其生产环境的组分中被回收(例如天然的或重组的)的抗体。在一些实施方案中,分离的多肽不与来自其生产环境的所有其它污染组分结合。来自其生产环境的污染组分,例如重组转染细胞所导致的污染组分是通常会干扰抗体的研究、诊断或治疗应用的材料,且其可能包括酶、激素和其它蛋白质或非蛋白质溶质。在一些实施方案中,多肽将被纯化:(1)至按抗体重量计大于95%(由例如Lowry法测定),并且在一些实施方案中,至按重量计大于99%;(2)达到利用转杯式测序仪(spinning cup sequenator)足以获得N-末端或内部氨基酸序列的至少15个残基的程度,或(3)达到在非还原或还原条件下进行SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳并利用考马斯亮蓝或银染色的均一性。分离的抗体包括重组T-细胞中的原位抗体,因为抗体天然环境中的至少一种组分将不存在。但是,分离的多肽或抗体通常通过至少一个纯化步骤来制备。

[0063] 抗体的“可变区”或“可变域”,例如本公开的抗C1q抗体,指抗体重链或轻链的氨基末端域。重链和轻链的可变域也可以分别被称为“V<sub>H</sub>”和“V<sub>L</sub>”。这些域通常是抗体的最可变的部份(相对于同一类别的其它抗体来说)并且含有抗原结合位点。

[0064] 术语“可变”指抗体(例如本公开的抗C1q抗体)之间可变域的特定区段在序列上大部分不相同。V域介导抗原结合,并定义特定抗体对其特定抗原的特异性。但是,可变性并不是均匀分布在可变域的整体跨度。相反,在轻链和重链可变区中,可变性都集中在三个被称为高度可变区(HVRs)的区段上。可变域的更高度保守的部分被称为框架区(FR)。天然重链和轻链的可变域每一个都包括四个FR区,其主要采用beta-折叠构型,由三个HVRs连接而形成环状连接,并且在某些情况下形成beta-折叠结构的一部分。每条链中的HVRs通过FR区保持相互靠近,并且与其它链的HVRs一起促使形成抗体的抗原结合部位(参见Kabat et al.,*Sequences of Immunological Interest*,Fifth Edition,National Institute of Health,Bethesda,MD(1991))。恒定域不直接参与抗体与抗原的结合,但是表现出各种效应子功能,例如抗体依赖细胞毒性中抗体的参与。

[0065] 本文使用的术语“单克隆抗体”指由基本上同质的抗体群体获得的抗体,例如本公

开的抗C1q抗体,所述基本上同质的抗体群体即该群体中包括的单个抗体是相同的,除了可能少量存在的可能的自然突变和/或翻译后修饰(例如异构化、酰胺化)。单克隆抗体是高度特异性的,其指向单个抗原部位。与通常包括指向不同决定簇(表位)的不同抗体的多克隆抗体制剂不同,每一个单克隆抗体指向抗原上的一个决定簇。除了其特异性之外,单克隆抗体的优势在于其通过杂交瘤培养合成,不受其它免疫球蛋白污染。修饰语“单克隆”表明抗体的特征是从基本上同质的抗体群体获得的,而不应被解读为需要通过任何特定的方法产生抗体。例如,根据本公开所使用的单克隆抗体可以通过多种技术制备,包括,例如,杂交瘤方法(例如,Kohler and Milstein.,*Nature*,256:495-97(1975);Hongo et al.,*Hybridoma*,14(3):253-260(1995),Harlow et al.,*Antibodies:A Laboratory Manual*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press,2d ed.1988);Hammerling et al.,in:*Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas* 563-681(Elsevier,N.Y.,1981))、重组DNA方法(参见,例如,美国专利No.4816567)、噬菌体展示技术(参见,例如,Claackson et al.,*Nature*,352:624-628(1991);Marks et al.,*J.Mol.Biol.*222:581-597(1992);Sidhu et al.,*J.Mol.Biol.*338(2):299-310(2004);Lee et al.,*J.Mol.Biol.*340(5):1073-1093(2004);Fellouse,*Proc.Nat'l Acad.Sci.USA* 101(34):12467-472(2004)和Lee et al.,*J.Immunol.Methods* 284(1-2):119-132(2004)和用于在动物中产生具有部分或全部编码人免疫球蛋白序列的人免疫球蛋白位点或基因的人或类人抗体的技术(参见,例如,WO 1998/24893;WO 1996/34096;WO 1996/33735;WO 1991/10741;Jakobovits et al.,*Proc.Nat'l Acad.Sci.USA* 90:2551(1993);Jakobovits et al.,*Nature* 362:255-258(1993);Bruggemann et al.,*Year in Immunol.*7:33(1993);美国专利Nos.5545807、5545806、5569825、5625126、5633425和5661016;Marks et al.,*Bio/Technology*10:779-783(1992);Lonberg et al.,*Nature* 368:856-859(1994);Morrison,*Nature* 368:812-813(1994);Fishwild et al.,*Nature Biotechnol.*14:845-851(1996);Neuberger,*Nature Biotechnol.*14:826(1996)和Lonberg and Huszar,*Intern.Rev.Immunol.*13:65-93(1995)。

[0066] 术语“全长抗体”、“完整抗体”或“整个抗体”可以互换使用来指基本上完整的形式,与抗体片段不同的抗体(例如本公开的抗C1q抗体)。特别地,整个抗体包括那些具有包括Fc区的重链和轻链的抗体。恒定域可以是天然序列恒定域(例如人天然序列恒定域)或其氨基酸序列变体。在一些情况下,所述完整抗体可以具有一种或更多种效应子功能。

[0067] “抗体片段”包括完整抗体的一部分,完整抗体的抗原结合区和/或可变区。抗体片段的实例包括Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>和Fv片段;双体;线性抗体(参见美国专利5641870,实例2;Zapata et al.,*Protein Eng.*8(10):1057-1062(1995));由抗体片段形成的单链抗体分子和多特异性抗体。

[0068] 抗体(例如本公开的抗C1q抗体)用木瓜蛋白酶消化产生两个相同的抗原结合片段或区,称为“Fab”片段或区,和剩余的“Fc”片段或区,其名称反映了易于结晶的能力。Fab片段或区由全部L链和H链的可变区域(V<sub>H</sub>),以及一条重链的第一恒定域(C<sub>H1</sub>)一起组成。每一个Fab片段或区对于抗原结合来说都是一价的,即其具有一个抗原结合部位。对抗体进行胃蛋白酶处理产生一个大的F(ab')<sub>2</sub>片段或区,其大致相应于两个通过二硫键相连的具有不同抗原结合活性的Fab片段并且仍然能够交联抗原。Fab'片段或区不同于Fab片段之处在于

其 $C_{H1}$ 域的羧基末端有少量额外的残基,包括来自抗体铰链区的一个或更多个半胱氨酸。 $Fab'-SH$ 在本文中指代 $Fab'$ ,其中恒定域的半胱氨酸残基携带游离的巯基。 $F(ab')_2$ 抗体片段最初是作为 $Fab'$ 片段对产生的,所述 $Fab'$ 片段之间具有铰链半胱氨酸。抗体片段的其它化学偶联也是已知的。

[0069] Fc片段或区包括两个H链的羧基末端部分,其通过二硫键结合在一起。抗体的效应子功能由Fc区的序列决定,该区域被在某些类型的细胞上发现的Fc受体(FcR)识别。

[0070] “Fv”是含有完整抗原识别和抗原结合位点的最小抗体片段。该片段由以紧密、非共价方式结合的一条重链和一条轻链可变区域的二聚体组成。由这两个域的折叠产生六个高度可变环(3个环来自H链,3个环来自L链),其提供了抗原结合的氨基酸残基,并赋予抗体以抗原结合特异性。但是,即使单个可变域(或Fv的一半,其只包括三个对一抗原特异性的HVRs)也具有识别和结合抗原的能力,虽然与整个结合部位相比亲和力较低。

[0071] “单链Fv”也简称为“sFv”或“scFv”,是包括 $V_H$ 和 $V_L$ 抗体域的抗体片段,其中 $V_H$ 和 $V_L$ 抗体域连接到一个多肽链上。在一些实施方案中,sFv多肽进一步包括 $V_H$ 和 $V_L$ 域之间的多肽接头,其使得sFv能够形成对于抗原结合而言符合期望的结构。关于sFv的综述参见Plückthun in *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol.113, Rosenberg and Moore eds., Springer-Verlag, New York, pp.269-315 (1994)。

[0072] 抗体(例如本公开的抗C1q抗体)的“功能性片段”,包括完整抗体的一部分,其通常包括完整抗体的抗原结合或可变区,或抗体的F区,所述F区保留有或具有修饰的FcR结合能力。抗体片段的实例包括线性抗体、单链抗体分子和由抗体片段形成的多特异性抗体。

[0073] 术语“双体(diabodies)”指小抗体片段,其制备是通过使用 $V_H$ 和 $V_L$ 域之间的短接头(大约5-10个残基)构建sFv片段(参见前述段落),使得V域形成链间而不是链内配对,由此获得双价片段,即具有两个抗原结合部位的片段。双特异性双体是两个“交叉的”sFv片段的异二聚体,其中两个抗体的 $V_H$ 和 $V_L$ 域存在于不同的多肽链上。双体的更多细节在例如EP 404,097;WO 93/11161;Hollinger et al.,*Proc.Nat'l Acad.Sci.USA* 90:6444-48 (1993)中描述。

[0074] 如本文所使用的,“嵌合抗体”指这样的抗体(免疫球蛋白)(例如本公开的抗C1q抗体):其中重链和/或轻链的一部分与来自特定物种或属于特定抗体类或亚类的抗体中的相应序列相同或同源,而链的其余部分与来自另一个物种或属于另一个抗体类或亚类的抗体中的相应序列以及该抗体的片段相同或同源,只要所述抗体片段表现出所希望的生物学活性(美国专利No.4816567;Morrison et al.,*Proc.Nat'l Acad.Sci.USA*,81:6851-55 (1984)。本文感兴趣的嵌合抗体包括PRIMATIZED<sup>®</sup>抗体,其中抗体的抗原结合区来自于例如通过用感兴趣的抗原免疫猕猴产生的抗体。如本文所使用的,所使用的“人源化抗体”是“嵌合抗体”的子集。

[0075] 非人(例如鼠类)抗体(例如本公开的抗C1q抗体)的“人源化”形式是包含来自非人免疫球蛋白的最小序列的嵌合抗体。在一个实施方案中,人源化抗体是人免疫球蛋白(受者抗体),其中受者的HVR的残基被替换为具有所希望的特异性、亲和力和/或能力的非人物种(供者抗体)例如小鼠、大鼠、兔或非人灵长动物的HVR的残基。在一些例子中,人免疫球蛋白的FR残基被相应的非人残基取代。此外,人源化抗体可以包括在受者抗体中或在供者抗体中没有的残基。可以进行这些修饰以进一步改善抗体性能,例如结合亲和力。通常,人源化

抗体将包括至少一个,以及典型地两个,可变域的基本上全部,可变域中所有的或基本上所有的高度可变环对应于非人免疫球蛋白序列的高度可变环,并且所有的或基本上所有的FR区是人免疫球蛋白序列的FR区,虽然FR区可以包括改善抗体性能(例如结合亲和力、异构化、免疫原性等)的一个或更多个单个的FR残基置换。FR上这类氨基酸置换的数量通常在H链上不超过6个,在L链上不超过3个。人源化抗体还任选地包括免疫球蛋白(通常是人免疫球蛋白)恒定区(Fc)的至少一部分。更多细节参见,例如, Jones et al., *Nature* 321:522-525 (1986); Riechmann et al., *Nature* 332:323-329 (1988) 和 Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2:593-596 (1992)。另外参见,例如, Vaswani and Hamilton, *Ann. Allergy, Asthma & Immunol.* 1:105-115 (1998); Harris, *Biochem. Soc. Transactions* 23:1035-1038 (1995); Hurlle and Gross, *Curr. Op. Biotech.* 5:428-433 (1994) 和美国专利 Nos. 6982321 和 7087409。

[0076] “人抗体”是由人产生的和/或使用任何制备人抗体的技术制备的抗体,如本文所述的,它具有相应于抗体,例如本公开的抗C1q抗体的序列的氨基酸序列。上述人抗体的定义特别地排除了包括非人抗原结合残基的人源化抗体。人抗体可以通过本领域已知的各种方法产生,包括噬菌体展示文库。Hoogenboom and Winter, *J. Mol. Biol.*, 227:381 (1991); Marks et al., *J. Mol. Biol.*, 222:581 (1991)。在 Cole et al., *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, p.77 (1985); Boerner et al., *J. Immunol.*, 147 (1): 86-95 (1991) 中也描述了制备人单克隆抗体的方法。另外参见 van Dijk and van de Winkel, *Curr. Opin. Pharmacol.* 5:368-74 (2001)。人抗体可以通过施用抗原给转基因动物来制备,所述转基因动物已被改造以响应抗原刺激产生人抗体,但其内源性基因座已被破坏,例如免疫的 xenomice (参见,例如,美国专利 Nos. 6075181 和 6150584 关于 XENOMOUSE™ 技术的内容)。另外参见,例如, Li et al., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA*, 103:3557-3562 (2006) 中关于通过人B细胞杂交瘤技术产生人抗体的内容。

[0077] 术语“高度可变区”、“HVR”或“HV”在本文中使用时指抗体可变域的区域,例如本公开的抗C1q抗体可变域的区域,其在序列上是高度可变的和/或形成结构上确定的环。通常,抗体包括六个HVRs;三个在VH中(H1, H2, H3),三个在VL中(L1, L2, L3)。在天然抗体中,H3和L3显示出六个HVRs的最大差异,H3尤其被认为在赋予抗体精确特异性上具有独特的作用。参见,例如, Xu et al., *Immunity* 13:37-45 (2000); Johnson and Wu in *Methods in Molecular Biology* 248:1-25 (Lo, ed., Human Press, Totowa, NJ, 2003)。事实上,仅由重链组成的天然存在的骆驼抗体在缺少轻链的情况下是有功能的以及稳定的。参见,例如, Hamers-Casterman et al., *Nature* 363:446-448 (1993) 和 Sheriff et al., *Nature Struct. Biol.* 3:733-736 (1996)。

[0078] 有多种HVR描述被使用并被包括在本文中。Kabat互补决定区(CDRs)的HVRs是基于序列可变性的,并且是最常用的(上述Kabat et al.)。相反,Chothia是指结构环的位置(Chothia and Lesk *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987))。AbM HVRs体现了Kabat CDRs和Chothia结构环的折衷,并被Oxford Molecular's AbM抗体建模软件所使用。“Contact”HVRs是基于对可获得的复合物晶体结构的分析的。这些HVRs的每一个的残基如下所示。

[0079]

环	Kabat	AbM	Chothia	Contact
L1	L24-L34	L24-L34	L26-L32	L30-L36
L2	L50-L56	L50-L56	L50-L52	L46-L55
L3	L89-L97	L89-L97	L91-L96	L89-L96
H1	H31-H35B	H26-H35B	H26-H32	H30-H35B (Kabat 编号)
H1	H31-H35	H26-H35	H26-H32	H30-H35 (Chothia 编号)
H2	H50-H65	H50-H58	H53-H55	H47-H58
H3	H95-H102	H95-H102	H96-H101	H93-H101

[0080] HVRs可包括“延长的HVRs”，如下所示：在VL中24-36或24-34 (L1)、46-56或50-56 (L2) 和89-97或89-96 (L3)，以及在VH中26-35 (H1)、50-65或49-65 (H2) 和93-102、94-102或95-102 (H3)。对于这些延长的HVR定义的每一个，可变域的残基根据上述Kabat et al.进行编号。

[0081] “框架”或“FR”残基是除本公开定义的HVR残基之外的那些可变域残基。

[0082] 短语“可变域残基编号如Kabat编号”或“氨基酸位置编号如Kabat编号”及其变形形式，指在上述Kabat et al.中用于抗体编译的重链可变域或轻链可变域的编号系统。使用该编号系统，实际的线性氨基酸序列可以含有较少的或额外的氨基酸，所述较少的或额外的氨基酸对应于可变域的FR或HVR的缩短或插入。例如，重链可变域可以在H2的残基52之后包括单个氨基酸插入（根据Kabat编号为残基52a）和重链FR残基82之后的插入残基（例如根据Kabat编号的残基82a、82b和82c等）。对于给定的抗体，残基的Kabat编号可以通过将该抗体同源区域序列与“标准的”Kabat编号序列比对来确定。

[0083] 当提及可变域（大约是轻链的残基1-107和重链的残基1-113）中的残基时，通常使用Kabat编号系统（例如，Kabat et al., Sequences of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)）。当提及免疫球蛋白重链恒定区时，通常使用“EU编号系统”或“EU索引”（例如上述Kabat et al.中报道的EU索引）。“Kabat的EU索引”指人IgG1EU抗体的残基编号。除非本文中另有说明，提及抗体可变域中的残基编号指Kabat编号系统下的残基编号。除非本文中另有说明，提及抗体恒定域的残基编号指EU编号系统下的残基编号（例如，参见，美国专利公开文本No. 2010-280227）。

[0084] 本文所使用的“受体人框架”是包括VL或VH框架的氨基酸序列的框架，其中VL或VH框架来自人免疫球蛋白框架或人共有框架。“来自”人免疫球蛋白框架或人共有框架的受体人框架可以包括与其相同的氨基酸序列，或者其可以含有先已存在的氨基酸序列改变。在一些实施方案中，先已存在的氨基酸序列改变的数量是10个或更少、9个或更少、8个或更少、7个或更少、6个或更少、5个或更少、4个或更少、3个或更少、2个或更少。在一些实施方案中，当先已存在的氨基酸改变存在于VH中，那些改变仅发生在位置71H、73H和78H中的三个、两个或一个上；例如，那些位置上的氨基酸残基可以是71A、73T和/或78A。在一个实施方案中，VL受体人框架在序列上与VL人免疫球蛋白框架序列或人共有框架序列相同。

[0085] “人共有框架”是这样的框架，它代表人免疫球蛋白VL或VH框架序列的选择中最普遍存在的氨基酸残基。通常，人免疫球蛋白VL或VH框架序列的选择是来自可变域序列的亚组。通常，序列的亚组是Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological



Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991) 中所述的亚组。其实例包括, 对于VL, 亚组可以是上述Kabat et al. 中所述的亚组 kappa I、kappa II、kappa III 或 kappa IV。此外, 对于VH, 亚组可以是上述Kabat et al. 中所述的亚组I、亚组II或亚组III。

[0086] 在特定位置处的“氨基酸修饰”(例如在本公开的抗C1q抗体的特定位置处的氨基酸修饰)是指特定残基的置换或缺失, 或特定残基附近至少一个氨基酸残基的插入。特定残基“附近的”插入是指在其一至两个残基之内的插入。所述插入可以是在特定残基的N-末端或C-末端。在一些实施方案中, 本文的氨基酸修饰是置换。

[0087] “亲和力成熟的”抗体, 例如本公开的抗C1q抗体, 是在其一个或更多个HVRs中具有一个或更多个改变的抗体, 与不具有那些改变的亲代抗体相比, 上述改变导致其对抗原的亲和力提高。在一个实施方案中, 亲和力成熟的抗体对于靶抗原具有纳摩尔或甚至皮摩尔的亲和力。亲和力成熟的抗体通过本领域已知的程序产生, 例如Marks et al., *Bio/Technology* 10:779-783 (1992) 描述了通过VH和VL的域改组实现亲和力成熟。HVR和/或框架残基的随机诱变在例如Barbas et al. *Proc Nat. Acad. Sci. USA* 91:3809-3813 (1994); Schier et al. *Gene* 169:147-155 (1995); Yelton et al. *J. Immunol.* 155:1994-2004 (1995); Jackson et al., *J. Immunol.* 154(7):3310-9 (1995) 和Hawkins et al., *J. Mol. Biol.* 226:889-896 (1992) 中描述。

[0088] 如本文使用的, 术语“特异性识别”或“特异性结合”指可测量到的和可重现的相互作用(例如靶和抗体(例如本公开的抗C1q抗体)之间的吸引或结合), 在包括生物分子在内的异质群体分子存在的情况下, 其对于确定靶的存在是决定性的。例如, 特异性或优先与靶或表位结合的抗体(例如本公开的抗C1q抗体)是这样的抗体, 其与该靶或表位的结合相比于其与其它靶或该靶的其它表位的结合, 具有更强的亲和力、更强的抗体亲抗原性、更容易和/或具有更长的持续时间。通过阅读该定义还可知道, 例如, 特异性或优先结合第一靶的抗体(或基团)可以也可以不特异性或优先结合第二靶。同样地, “特异性结合”或“优先结合”不一定要(尽管其可以包含)排外地结合。与靶特异性结合的抗体可以具有至少约 $10^3\text{M}^{-1}$ 或 $10^4\text{M}^{-1}$ 的结合常数, 有时约 $10^5\text{M}^{-1}$ 或 $10^6\text{M}^{-1}$ , 在其它实例中约 $10^6\text{M}^{-1}$ 或 $10^7\text{M}^{-1}$ , 约 $10^8\text{M}^{-1}$ 至 $10^9\text{M}^{-1}$ , 或约 $10^{10}\text{M}^{-1}$ 至 $10^{11}\text{M}^{-1}$ 或更高。各种免疫测定方法可以被用来选择与特定蛋白具有特异性免疫反应的抗体。例如, 固相酶联免疫吸附测定(ELISA)被常规用于选择与蛋白具有特异的免疫反应性的单克隆抗体。参见, 例如, Harlow and Lane (1988) *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Publications, New York 中对于可用于确定特异性免疫反应的免疫测定方法和条件的描述。

[0089] 如本文所使用的, 补体蛋白(例如补体因子C1q和第二种蛋白)之间的“相互作用”包括, 但不限于, 蛋白质-蛋白质相互作用、物理相互作用、化学相互作用、结合、共价结合和离子结合。如本文所使用的, 当抗体破坏、减少或完全消除两种蛋白之间的相互作用时, 该抗体“抑制”两种蛋白之间的“相互作用”。当本公开的抗体或其片段与两种蛋白之一结合时, 该抗体或其片段“抑制”两种蛋白之间的“相互作用”。

[0090] “阻断”抗体、“拮抗剂”抗体、“抑制”抗体或“中和”抗体是这样的抗体, 例如本公开的抗C1q抗体, 其抑制或降低其结合的抗原的一种或更多种生物活性, 例如与一种或更多种蛋白的相互作用。在一些实施方案中, 阻断抗体、拮抗剂抗体、抑制抗体或“中和”抗体基本

上或完全地抑制抗原的一种或多种生物活性或相互作用。

[0091] 抗体“效应子功能”是指抗体由于Fc区(天然序列Fc区或氨基酸序列变体Fc区)引起的那些生物活性,且随抗体同种型而不同。

[0092] 本文中的术语“Fc区”被用于定义免疫球蛋白重链的C末端区,包括天然序列Fc区和变体Fc区。虽然免疫球蛋白重链的Fc区的边界可能变化,但人IgG重链Fc区通常被定义为从位置Cys226上的氨基酸残基,或从Pro230延伸至其羧基末端。Fc区的C-末端赖氨酸(根据EU编号系统的残基447)可以被移除,例如在抗体的产生或纯化过程中,或者通过重组工程化编码抗体重链的核酸。相应地,完整抗体的组合物可以包括移除所有K447残基的抗体群体、没有移除K447残基的抗体群体以及包含K447残基的抗体和没有K447残基的抗体的混合物的抗体群体。用于本公开抗体的适合的天然序列Fc区包括人IgG1、IgG2、IgG3和IgG4。

[0093] “天然序列Fc区”包含与在自然界中发现的Fc区的氨基酸序列相同的氨基酸序列。天然序列人Fc区包括天然序列人IgG1Fc区域(非A和A同种异型);天然序列人IgG2Fc区域;天然序列人IgG3Fc区域;和天然序列人IgG4Fc区域以及其天然存在的变体。

[0094] “变体Fc区”包括与天然序列Fc区由于至少一个氨基酸修饰而不同的氨基酸序列。在一些实施方案中,变体Fc区在一个或多个氨基酸置换上不相同。在一些实施方案中,相比于天然序列Fc区,或亲代多肽的Fc区,变体Fc区具有至少一个氨基酸置换,例如在天然序列Fc区或在亲代多肽的Fc区具有约一个至约十个氨基酸取代,以及,在一些实施方案中,在天然序列Fc区域中或在亲代多肽的Fc区域中具有约一个至约五个氨基酸取代。在一些实施方案中,本文中的变体Fc区与天然序列Fc区和/或与亲代多肽的Fc区具有至少约80%的同源性,以及,在一些实施方案中,与其具有至少约90%的同源性,以及,在一些实施方案中,与其具有至少约95%的同源性。

[0095] “Fc受体”或“FcR”是与抗体的Fc区结合的受体。在一些实施方案中,FcR是天然序列人FcR。而且,在一些实施方案中,FcR与IgG抗体结合的受体( $\gamma$ 受体),并包括Fc $\gamma$ RI、Fc $\gamma$ RII和Fc $\gamma$ RIII亚类的受体,包括这些受体的等位基因变体和选择性剪接形式,Fc $\gamma$ RII受体包括Fc $\gamma$ RIIA(“激活受体”)和Fc $\gamma$ RIIB(“抑制受体”),它们具有相似的氨基酸序列,主要在胞浆域上有所不同。激活受体Fc $\gamma$ RIIA在其胞浆域中含有免疫受体酪氨酸活化基序(“ITAM”)。抑制受体在其胞浆域中含有免疫受体酪氨酸抑制基序(“ITIM”)。(参见,例如,M. Daëron, *Annu. Rev. Immunol.* 15:203-234 (1997))。Ravetch and Kinetic, *Annu. Rev. Immunol.* 9:457-92 (1991); Capel et al., *Immunomethods* 4:25-34 (1994) 和 de Haas et al., *J. Lab. Clin. Med.* 126:330-41 (1995) 中对FcRs进行了综述。其它FcRs,包括那些未来被鉴别的,包括在本文的术语“FcR”中。FcRs还可以增加抗体的血清半衰期。

[0096] 可以测定多肽在活体内与FcRn的结合和人FcRn高亲和力结合的血清半衰期,例如在表达人FcRn的转基因小鼠或转染的人细胞系中,或者在被施用了具有变体Fc区域的多肽的灵长类动物中。WO 2004/42072 (Presta) 描述了与FcRs的结合增强或减弱的抗体变体。还参见,例如,Shields et al., *J. Biol. Chem.* 9 (2):6591-6604 (2001)。

[0097] 本文使用的术语“ $k_{on}$ ”意指抗体与抗原结合的速率常数。

[0098] 本文使用的术语“ $k_{off}$ ”意指抗体从抗体/抗原复合物上解离的速率常数。

[0099] 本文使用的术语“ $K_D$ ”意指抗体-抗原相互作用的平衡解离常数。

[0100] 本文所使用的肽、多肽或抗体序列的“氨基酸序列同一性百分比(%)”和“同源性”

是指在对序列进行比对,并在必要的时候引入缺口以获得最大的序列同一性百分比,并且不考虑任何保守取代作为序列同一性的一部分之后,候选序列中的氨基酸残基与某些肽或多肽序列中的氨基酸残基相同的百分比。为确定氨基酸序列同一性百分比目的的比对可以通过本领域技术之内的多种方式实现,例如,使用公众可获得的计算机软件如BLAST、BLAST-2、ALIGN或MEGALIGN (DNASTAR) 软件。本领域技术人员能够确定用于测量比对的适当的参数,包括获得所比较的序列在全长上的最大程度的对齐所需要的任何本领域已知的算法。

[0101] “分离的”分子或细胞是被鉴别的并从至少一种污染分子或细胞中被分离的分子或细胞,所述至少一种污染分子或细胞通常在其被产生的环境中与其结合。在一些实施方案中,分离的分子或细胞不与其产生环境相关的所有组分相结合。分离的分子或细胞处于与其天然形式或状态不同的形式。因此,分离的分子不同于细胞中天然存在的分子;分离的细胞不同于组织、器官或个体中天然存在的细胞。在一些实施方案中,分离的分子是本公开的抗C1q抗体。在其它实施方案中,分离的细胞是产生本公开的抗C1q抗体的宿主细胞或杂交瘤细胞。

[0102] 编码抗体(例如本公开的抗C1q抗体)的“分离的”核酸分子,是被鉴别的并从至少一种污染核酸分子分离的核酸分子,所述至少一种污染核酸分子通常在所述核酸分子所产生的环境中与其结合。在一些实施方案中,分离的核酸分子不与其产生环境相关的所有组分相结合。编码本文的多肽和抗体的分离的核酸分子处于与其天然形式或状态不同的形式。因此,分离的核酸分子不同于细胞中天然存在的编码本文中的多肽和抗体的核酸。

[0103] 本文所用的术语“载体(vector)”是指能够运输与其连接的另一种核酸的核酸分子。一种类型的载体是“质粒(plasmid)”,它是环形双链DNA,其它的DNA区段可以连接到其中。另一种类型的载体是噬菌体载体。另一种类型的载体是病毒载体,其中其它的DNA区段可以连接到病毒基因组中。某些载体能够在其被引入的宿主细胞中自主复制(例如具有细菌复制起点的细菌载体和游离哺乳动物载体)。其它载体(例如非游离哺乳动物载体)在被引入到宿主细胞之后,可以被整合到宿主细胞基因组中,从而与宿主基因组一同被复制。而且,某些载体能够指导与其可操作连接的基因的表达。这种载体在本文中被称作“重组表达载体”,或者被简单地称为“表达载体”。通常,重组DNA技术中使用的表达载体常常是质粒的形式。在本说明书中,“质粒(plasmid)”和“载体(vector)”可以互换使用,因为质粒是最常用形式的载体。

[0104] “多核苷酸”或“核酸”在文本中可互换使用,指任何长度的核苷酸聚合物,且包括DNA和RNA。核苷酸可以是脱氧核糖核苷酸、核糖核苷酸、修饰的核苷酸或碱基和/或其类似物,或者可以通过DNA或RNA聚合酶或者通过合成反应掺入到聚合物中的任何底物。多核苷酸可以包含修饰的核苷酸,例如甲基化的核苷酸和其类似物。如果存在修饰,对核苷酸结构的修饰可以在聚合物组装之前或之后被赋予。核苷酸序列可以被非核苷酸成分打断。多核苷酸可以包含合成后进行的修饰,例如与标记物结合。其它类型的修饰包括,例如,“帽”,用类似物置换一个或多个天然存在的核苷酸,核苷酸间修饰如,例如,那些具有不带电荷的连接(例如甲基磷酸酯、磷酸三酯、氨基磷酸酯(phosphoamidates)、氨基甲酸酯等)的修饰和具有带电荷的连接(例如硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯等)的修饰、那些含有悬垂部分(pendant moieties),如,例如,蛋白质(例如核酸酶、毒素、抗体、信号肽、聚-L-赖氨酸等)

的修饰、那些具有嵌入剂(例如吡啶、补骨脂等)的修饰、那些含有螯合剂(例如金属、放射性金属、硼、氧化型金属等)的修饰、那些含有烷化剂的修饰、那些具有修饰的键(例如异头核苷酸等)的修饰、以及未修饰形式的多核苷酸。而且,通常存在于糖中的任何羟基基团可以被替换为,例如,磷酸酯基团、磷酸酯基团,被标准保护基团保护,或者被活化以制备与其它核苷酸的其它连接,或者可以与固体或半固体支持物结合。5'和3'末端的OH可以被磷酸化或者可以被胺或1-20个碳原子的有机加帽基团部分取代。其它羟基还可以被衍生化为标准保护基团。多核苷酸还可以含有本领域通常已知的核糖或脱氧核糖的类似形式,包括,例如,2'-O-甲基,2'-O-烯丙基,2'-氟-或2'-叠氨基-核糖,碳环糖类似物, $\alpha$ -异头糖,差向异构糖例如阿拉伯糖、木糖或来苏糖,吡喃糖,呋喃糖,景天庚酮糖,无环类似物,和碱性核苷类似物例如甲基核糖苷。一个或多个磷酸二酯键可以被替代性的连接基团替换。这些替代性的连接基团包括,但不限于其中磷酸酯被P(O)S(“硫代酯(thioate)”)、P(S)S(“二硫代酯(dithioate)”)、(O)NR<sub>2</sub>(“酰胺化物”)、P(O)R、P(O)OR'、CO或CH<sub>2</sub>(“甲缩醛(formacetal)”)替换的实施方案,其中每个R或R'独立地是H或取代的或未取代的任选地含有醚(-O-)键、芳基、链烯基、环烷基、环烯基或芳烷基(araldyl)的烷基(1-20C),。多核苷酸中所有的键无需是相同的。前述的描述适用于在此提及的所有多核苷酸,包括RNA和DNA。

[0105] “宿主细胞”包括可以作为或已经作为整合多核苷酸插入的载体的受体的单个细胞或细胞培养物。宿主细胞包括单个宿主细胞的后代,并且该后代因自然的、偶然的或故意的变异可以无需与原始亲代细胞完全相同(在形态上或在基因组DNA互补上)。宿主细胞包括用本公开的多核苷酸体内转染的细胞。

[0106] 本文使用的“载体(Carriers)”包括药学可接受的载体、赋形剂或稳定剂,它们在所使用的剂量和浓度下对暴露于其的细胞或哺乳动物无毒。通常生理学可接受的载体是水性pH缓冲溶液。生理学可接受的载体的实例包括缓冲液例如磷酸盐、柠檬酸盐和其它有机酸;抗氧化剂包括抗坏血酸;低分子量(少于约10个残基)多肽;蛋白质,例如血清白蛋白、明胶或免疫球蛋白;亲水性聚合物例如聚乙烯吡咯烷酮;氨基酸例如甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、精氨酸或赖氨酸;单糖、二糖和其它碳水化合物,包括葡萄糖、甘露糖或糊精;螯合剂例如EDTA;糖醇例如甘露糖醇或山梨糖醇;成盐平衡离子例如钠;和/或非离子表面活性剂例如TWEEN<sup>TM</sup>、聚乙二醇(PEG)和PLURONICS<sup>TM</sup>。

[0107] 本文使用的术语“约”指本技术领域技术人员易于知晓的相应值的通常误差范围。本文中提及“约”某个数值或参数包括(并描述了)涉及该数值或参数本身的实施方案。

[0108] 如本文中以及附随的权利要求中所使用的,单数形式“一(a)”、“一(an)”和“该(the)”包括复数形式的引用,除非上下文明确另外指出。例如,提及“抗体”是提及来从一种至许多种的抗体,例如摩尔数量,并且包括本领域技术人员已知的其等同物,诸如此类。

[0109] 应当理解,本文描述的本公开的方面和实施方案包括“包括”各方面和实施方案、“由”各方面和实施方案“组成”和“基本上由”各方面和实施方案“组成”。

[0110] 概述

[0111] 本公开提供人源化抗C1q抗体及其应用。本公开的抗C1q抗体特异性结合本公开的C1q蛋白。在一些实施方案中,人源化抗C1q抗体是C1中和抗体。在一些实施方案,本公开的人源化抗C1q抗体可以与C1复合物结合。

[0112] 在某些方面,本公开提供了与C1q蛋白特异性结合的人源化抗体,其中所述抗体包

括重链可变区和人重链恒定区,其中所述重链可变区包括Fab区,所述重链恒定区包括Fc区,其中所述Fab区与C1q蛋白特异性结合,并且其中所述Fc区不能结合C1q蛋白。

[0113] 在某些方面,本公开提供了人源化抗C1q抗体,或其抗原结合片段,所述抗体包括重链可变域和轻链可变域,其中所述重链可变域包括选自SEQ ID NOs:1-4的氨基酸序列,或者具有与选自SEQ ID NOs:1-4的所述氨基酸序列至少约90%同源性的氨基酸序列。

[0114] 在某些方面,本公开提供了人源化抗C1q抗体,或其抗原结合片段,所述抗体包括重链可变域和轻链可变域,其中所述轻链可变域包括选自SEQ ID NOs:5-8的氨基酸序列,或者具有与选自SEQ ID NOs:5-8的所述氨基酸序列至少约90%同源性的氨基酸序列。

[0115] 在某些方面,本公开提供了人源化抗C1q抗体,或其抗原结合片段,所述抗体包括:重链可变域和/或轻链可变域,所述重链可变域包括选自SEQ ID NOs:1-4的氨基酸序列,或者具有与选自SEQ ID NOs:1-4的所述氨基酸序列至少约90%同源性的氨基酸序列,所述轻链可变域包括选自SEQ ID NOs:5-8的氨基酸序列,或者具有与选自SEQ ID NOs:5-8的所述氨基酸序列至少约90%同源性的氨基酸序列。

[0116] 在一些实施方案中,本公开的人源化抗C1q抗体中和C1q的生物活性。抗C1q抗体的应用包括,但不限于,对补体因子C1q的检测,例如在患有与依赖于补体因子1 (CF1) 的病理性突触丢失相关的神经退行性病症的个体中。其它的非限制性的应用包括对补体活化的经典途径的抑制,例如在经典补体途径被自身抗体激活的情况下。人源化抗C1q抗体的进一步的非限制性的应用包括与补体因子例如C1q的表达升高相关的病症或者与补体途径的活化相关的病症的诊断和治疗。此类病症可以包括,但不限于,自身免疫病症,炎性病症和神经退行性病症,包括与突触丢失相关的神经退行性病症。

[0117] 在另一个方面,本公开提供分离编码本公开的抗体的核酸分子。

[0118] 本公开还提供分离的宿主细胞,其含有编码本公开的抗体的核酸分子。此外,提供药物组合物,其含有与药学可接收的载体组合的抗C1q抗体,例如本公开的人源化C1q中和抗体。本公开还提供含有用于本文所述的任意一种方法中的人源化抗C1q抗体的试剂盒。

[0119] 本公开进一步提供使用本公开的人源化C1q抗体(例如本公开的人源化C1q中和抗体)在需要这种治疗的个体中治疗或预防神经退行性疾病或自身免疫疾病,在患有神经退行性疾病或自身免疫疾病的个体中检测突触,以及在生物样品中检测突触的方法。本公开还提供含有本公开的人源化C1q抗体(例如本公开的人源化C1q中和抗体)的试剂盒。

[0120] 补体蛋白

[0121] 本公开的抗体特异性识别补体因子C1q和/或经典补体活化途径的C1复合物中的C1q。被识别的补体因子可以来自于,不限于,具有补体系统的任何生物体,包括任何哺乳动物生物体,例如人、小鼠、大鼠、兔、猴、狗、猫、牛、马、骆驼、绵羊、山羊或猪。

[0122] 如本文所使用的,“C1复合物”指蛋白质复合物,其可以包括,但不限于,一个C1q蛋白、两个C1r蛋白和两个C1s蛋白(例如,C1qr<sup>2</sup>s<sup>2</sup>)。

[0123] 如本文所使用的,“补体因子C1q”指野生型序列和天然存在的变体序列。

[0124] 被本公开的抗体识别的补体因子C1q的非限制性实例是人C1q,其包括三条多肽链A、B和C:

[0125] C1q,链A(智人),Protein Data Base登录号:NP\_057075.1;GenBank登录号:NM\_015991:>gi|7705753|ref|NP\_057075.1|complement C1q subcomponent subunit A

precursor[Homo sapiens]

[0126]

MEGPRGWLVLCLVLAISLASMVTEDLCRAPDGKKGEAGRPGRRRGRPGLKGEQGEPEGAPGIRGTGIQGLKGDQGEPPGSPG  
NPGKVGYPGSPGLGARGIPGIKGTGKSPGNIKDQPRPAFSAIRRNPPMGGNVVIFDVTITNQEEPYQNHSGRFVCT  
VPGYYYFTFQVLSQWEICLSIVSSSRGQVRRSLGFCDTTNKGLFQVVSGGMVLQLQQGDQVWVEKDPKKGHIYQGSE  
ADSVFSGFLIFPSA (SEQ ID NO:9)

[0127] C1q,链B(智人),Protein Data Base登录号:NP\_000482.3;GenBank登录号:NM\_000491.3:>gi|87298828|ref|NP\_000482.3|complement C1q subcomponent subunit B precursor[Homo sapiens]

[0128]

MMMKIPWGSIPVLMLLLLLGLIDISQAQLSCTGPPAIPGIPGIPGTPGPDGQPGTPGIKGEKGLPGLAGDHGEFGEK  
GDPGIPGNPGKVGPKGPMGPKGGPGAPGAPGPKGESGDYKATQKIAFSATRRTINVPLRRDQTI RFDHVI TNMNNNYE  
PRSGKFTCKVPGLYYFTHASSRGNLCVNLMRGRERAQKVVTFCDYAYNTFQVTTGGMVLKLEQGENVFLQATDKNS  
LLGMEGANSIFSGFLLFPDMEA (SEQ ID NO:10)

[0129] C1q,链C(智人),Protein Data Base登录号:NP\_001107573.1;GenBank登录号:NM\_001114101.1:

[0130] >gi|166235903|ref|NP\_001107573.1|complement C1q subcomponent subunit C precursor[Homo sapiens]

[0131]

MDVGPSSPLHLGLKLLLLLLLLPLRGQANTGCYGIPGMPGLPGAPGKGDYDGLPGPKGEPGIPAIPGIRGPKGQKGE  
PGLPGHPGKNGPMGPPGMPGVPGPMGIPGEPGEEGRYKQKFQSVFTVTRQTHQPPAPNSLIRFNAVLTNPQGDYDTS  
TGKFTCKVPGLYYFVYHASHTANLCVLLYRSGVKVVTFCGHTSKTNQVNSGGVLLRLQVGEEVWLAVNDYYDMVGIQ  
GSDSVFSGFLLFPD (SEQ ID NO:11)

[0132] 相应地,本公开的人源化抗C1q抗体可以与C1q蛋白的多肽链A、多肽链B和/或多肽链C结合。在一些实施方案中,本公开的人源化抗C1q抗体与人C1q或其类似物(例如小鼠、大鼠、兔、猴、狗、猫、牛、马、骆驼、绵羊、山羊或猪C1q)的多肽链A、多肽链B和/或多肽链结合。

[0133] 人源化抗C1q抗体

[0134] 本公开的抗体与补体因子C1q和/或经典补体活化途径的C1复合物中的C1q蛋白特异性结合。在一些实施方案中,人源化抗C1q抗体与人C1q特异性结合。在一些实施方案中,人源化抗C1q抗体与人和小鼠C1q特异性结合。在一些实施方案中,人源化抗C1q抗体与大鼠C1q特异性结合。在一些实施方案中,人源化抗C1q抗体与人C1q、小鼠C1q和大鼠C1q特异性结合。

[0135] 在一些实施方案中,本公开的人源化抗C1q抗体包括重链可变区和重链恒定区,所述重链可变区包括Fab区,所述重链恒定区包括Fc区,其中Fab区与本公开的C1q蛋白特异性结合,但是Fc区不能结合C1q蛋白。在一些实施方案中,Fc区是来自人IgG1、IgG2、IgG3或IgG4同种型。在一些实施方案中,Fc区不能诱导补体活性,和/或不能诱导抗体依赖细胞毒性(ADCC)。在一些实施方案中,Fc区包括一个或更多个修饰,包括,不限于,氨基酸置换。在某些实施方案中,本公开的人源化抗C1q抗体的Fc区在根据Kabat编号规则248位点处或在与根据Kabat编号规则248位点相对应的位点处,和/或在根据Kabat编号规则241位点处或

在与根据Kabat编号规则241位点相对应的位点处包括氨基酸置换。在一些实施方案中,在248位点处或与248位点相对应的位点处的氨基酸置换抑制所述Fc区与和Fc受体的相互作用。在一些实施方案中,在248位点处或与248位点相对应的位点处的氨基酸置换是亮氨酸到谷氨酸的氨基酸置换。在一些实施方案中,在241位点处或与241位点相对应的位点处的氨基酸置换阻止在所述抗体中的臂转换。在一些实施方案中,在241位点处或与241位点相对应的位点处的氨基酸置换是丝氨酸到脯氨酸的氨基酸置换。在某些实施方案中,本公开的人源化抗C1q抗体的Fc区包括SEQ ID NO:37的氨基酸序列,或具有与SEQ ID NO:37的氨基酸序列至少约70%、至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%、或至少约95%同源性的氨基酸序列。

[0136] 在一些实施方案中,本公开的人源化抗C1q抗体中和补体因子C1q的生物活性。在一些实施方案中,该抗体抑制补体因子C1q和其它补体因子(例如C1r或C1s之间的或者C1q和抗体,例如自身抗体)之间的相互作用。如本文所公开的,本公开的自身抗体包括,但不限于,识别宿主抗原并激活经典补体活化途径的抗体。在上述激活过程的第一步中,补体因子C1q与自身抗体-自身抗原-免疫复合物结合。在一些实施方案中,该抗体抑制补体因子C1q和非补体因子之间的相互作用。非补体因子可以包括磷脂酰丝氨酸、穿透素-3、C-反应蛋白(CRP)、球形C1q受体(gC1qR)、补体受体1(CR1)、 $\beta$ -淀粉样蛋白和钙网蛋白。在一些实施方案中,该抗体抑制经典补体活化途径。在某些实施方案中,该抗体进一步抑制旁路途径。在一些实施方案中,该抗体抑制自身抗体依赖细胞毒性和补体依赖细胞毒性(CDC)。在一些实施方案中,该抗体抑制补体依赖细胞介导的细胞毒性(CDCC)。在一些实施方案中,该抗体抑制B细胞抗体产生、树突细胞成熟、T-细胞增殖、细胞因子产生或小胶质细胞激活。在一些实施方案中,该抗体抑制阿瑟氏反应。在一些实施方案中,该抗体抑制突触或神经末梢的吞噬作用。在一些实施方案中,该抗体抑制补体受体3(CR3/C3)表达细胞的激活。

[0137] 本公开的抗体的功能特性,例如对抗原的解离常数、蛋白质-蛋白质相互作用(例如C1q自身抗体的相互作用)的抑制、自身抗体依赖细胞毒性和补体依赖细胞毒性(CDC)的抑制、补体依赖细胞介导的细胞毒性(CDCC)的抑制或损伤的形成,可以,但不限于在体外、离体或在体内实验中测量。

[0138] 人源化抗C1q抗体对C1q的解离常数( $K_D$ )可以是小于125nM、小于120nM、小于115nM、小于110nM、小于100nM、小于90nM、小于80nM、小于70nM、小于60nM、小于50nM、小于40nM、小于30nM、小于20nM、小于10nM、小于9nM、小于8nM、小于7nM、小于6nM、小于5nM、小于4nM、小于3nM、小于2nM、小于1nM、小于0.5nM、小于0.1nM、小于0.05nM、小于0.01nM或小于0.005nM。在一些实施方案中,解离常数的范围从小于约125nM至小于约5pM。

[0139] 在一些实施方案中,本公开的人源化抗C1q抗体对人C1q的解离常数是小于约10pM到小于约5pM。在一些实施方案中,对人C1q的解离常数小于约10pM、小于约9.9pM、小于约9.8pM、小于约9.7pM、小于约9.6pM、小于约9.5pM、小于约9.4pM、小于约9.3pM、小于约9.2pM、小于约9.1pM、小于约9pM、小于约8.9pM、小于约8.8pM、小于约8.7pM、小于约8.6pM、小于约8.5pM、小于约8.4pM、小于约8.3pM、小于约8.2pM、小于约8.1pM、小于约8pM、小于约7.9pM、小于约7.8pM、小于约7.7pM、小于约7.6pM、小于约7.5pM、小于约7.4pM、小于约7.3pM、小于约7.2pM、小于约7.1pM、小于约7pM、小于约6.9pM、小于约6.8pM、小于约6.7pM、小于约6.6pM、小于约6.5pM、小于约6.4pM、小于约6.3pM、小于约6.2pM、小于约6.1pM、小于

约6pM、小于约5.9pM、小于约5.8pM、小于约5.7pM、小于约5.6pM、小于约5.5pM、小于约5.4pM、小于约5.3pM、小于约5.2pM、小于约5.1pM或者小于约5pM。

[0140] 在一些实施方案中,本公开的人源化抗C1q抗体对小鼠C1q的解离常数是小于125nM、小于120nM、小于115nM、小于110nM、小于100nM、小于90nM、小于80nM、小于70nM、小于60nM、小于50nM、小于40nM、小于30nM、小于20nM、小于10nM、小于9nM、小于8nM、小于7nM、小于6nM、小于5nM、小于4nM、小于3nM、小于2nM、小于1nM、小于0.5nM、小于0.1nM或小于0.05nM。

[0141] 抗体对于除C1q以外的其它抗原的解离常数可以比其对C1q的解离常数高至少5倍、至少10倍、至少100倍、至少1000倍、至少10000倍或至少100000倍。例如,本公开的人源化抗C1q抗体对C1s的解离常数可以比其对C1q的解离常数高至少1000倍。解离常数可以通过包括任何生物化学或生物物理技术,例如ELISA、表面等离子体共振 (SPR)、生物薄膜干涉技术(参见,例如,ForteBio的Octet System)、等温滴定量热法 (ITC)、差示扫描量热法 (DSC)、圆二色谱 (CD)、停流分析和比色或荧光蛋白熔融分析的任何分析技术被测定。抗C1q抗体对C1q的解离常数 ( $K_D$ ) 可以通过使用例如全长抗体或抗体片段,例如Fab片段被测定。

[0142] 测定人源化抗体对C1q的结合亲和力的一个示例性方法是测量抗体的单功能Fab片段的结合亲和力。为了获得单功能Fab片段,抗体可以被木瓜蛋白酶切割(例如IgG)或者重组表达。抗体的Fab片段的亲和力可以通过配备有预固定化的链霉亲和素传感器芯片 (SA) 的表面等离子体共振 (Biacore3000™表面等离子体共振 (SPR) 系统,Biacore.TM.,INC, Piscataway N.J.), 使用HBS-EP运行缓冲液 (0.01M HEPES, pH 7.4, 0.15NaCl, 3mM EDTA, 0.005% v/v表面活性剂P20) 被测定。生物素化的人C1q (或任何其它C1q) 可以在HBS-EP缓冲液中被稀释至浓度为低于0.5 $\mu$ g/mL,并使用不同的接触时间将其注射穿过单个芯片通道,以获得两种范围的抗原密度,用于详细动力学研究的50-200反应单位 (RU) 或用于筛选测定的800-1000RU。再生研究表明,在超过200次的注射中,25% v/v乙醇中的25mM NaOH有效除去结合的Fab,同时保持芯片上C1q的活性。典型地,连续稀释(跨越估计 $K_D$ 0.1-10倍的浓度)的纯化Fab样品以100 $\mu$ L/分钟的速率被注射1分钟,并允许至多2小时的解离时间。使用已知浓度(通过氨基酸分析测定)的Fab作为标准, Fab蛋白的浓度通过ELISA和/或SDS-PAGE被测定。动力学结合速率 ( $k_{on}$ ) 和解离速率 ( $k_{off}$ ) 可以通过使用BIAevaluation方法,将数据整体拟合到1:1的Langmuir结合模型 (Karlsson, R. Roos, H. Fagerstam, L. Petersson, B. (1994) .Methods Enzymology 6.99-110) 而同时被获得。平衡解离常数 ( $K_D$ ) 值按 $k_{off}/k_{on}$ 计算。该方案适用于测定抗体对任何C1q,包括人C1q、另一种哺乳动物的C1q (例如小鼠C1q、大鼠C1q、灵长类动物C1q) 以及不同形式的C1q的结合亲和力。抗体的结合亲和力通常在25 $^{\circ}$ C被测量,但也可以在37 $^{\circ}$ C被测量。

[0143] 本公开的人源化抗体可以与来自具有补体系统的任何生物体的C1q抗原结合,所述生物体包括任何哺乳动物生物体,例如人、小鼠、大鼠、兔、猴、狗、猫、牛、马、骆驼、绵羊、山羊或猪。在一些实施方案中,抗C1q抗体与人C1q上的表位特异性结合。在一些实施方案中,抗C1q抗体与人和小鼠C1q二者上的表位特异性结合。在一些实施方案中,抗C1q抗体与人、小鼠和大鼠C1q上的表位特异性结合。

[0144] 在一些实施方案中,本文提供人源化抗C1q抗体,所述人源化抗C1q抗体结合的C1q的表位与本公开的另一抗体结合的C1q表位相同或重叠。在某些实施方案中,本文提供人



源化抗C1q抗体,所述人源化抗C1q抗体结合的C1q的表位与由ATCC登录号PTA-120399的杂交瘤细胞系产生的抗C1q抗体M1结合的C1q表位相同或重叠。在一些实施方案中,人源化抗C1q抗体与本公开的另一抗体竞争结合C1q。在某些实施方案中,抗C1q抗体与由ATCC登录号PTA-120399的杂交瘤细胞系产生的抗C1q抗体M1或其抗原结合片段竞争结合C1q。

[0145] 可用于确定人源化抗C1q抗体与哪个C1q表位结合,或者两个抗体是否结合相同的或重叠的表位的方法,可以包括,但不限于,X射线晶体学、核磁共振、丙氨酸扫描突变、包括具有重叠C1q序列的C1q衍生肽的肽文库筛选和竞争测定。竞争测定在确定是否两个抗体通过识别相同的或空间上重叠的表位来结合相同的表位,或者确定是否一个抗体竞争性抑制另一个抗体与抗原的结合方面特别有用。这些测定是本领域已知的。典型地,抗原或抗原表达细胞被固定多孔板上,测量未标记的抗体阻断标记的抗体的结合的能力。这种竞争测定常用的标记物是放射性标记或酶标记。

[0146] 本文包括的竞争性抗体是在1 $\mu$ M或更低浓度下抑制(即与对照相比阻止或干扰),或减少本公开的任何抗C1q抗体(例如M1或M1的抗原结合片段)与C1q的结合,使这种结合减少至少50%、60%、70%、80%、90%和95%的人源化抗体。例如,在竞争测定中竞争抗体的浓度可以是抗体M1或M1的抗原结合片段的K<sub>D</sub>或低于该K<sub>D</sub>。结合成员之间的竞争可以容易地在体外测定,例如通过ELISA和/或通过监测抗体和C1q在溶液中的相互作用。进行分析所使用的确切方法并不重要。C1q可以被固定在96孔板上或者可以被放置在均相溶液中。在特定的实施方案中,未标记的候选抗体阻断标记的抗C1q抗体(例如M1)的能力可以通过使用放射性(radioactive)、酶或其它标记物被测量。在反向测定中,未标记的抗体干扰标记的抗C1q抗体与C1q相互作用的能力被测定,其中所述标记的抗C1q抗体,例如M1已经与C1q结合。读数是通过结合标记物的测量获得的。C1q和候补抗体可以以任何顺序或者同时加入。

[0147] 在一些实施方案中,人源化抗C1q抗体抑制C1q和自身抗体之间的相互作用。

[0148] 在一些实施方案中,本公开的人源化抗C1q抗体与由ATCC登录号PTA-120399的杂交瘤细胞系产生的抗体M1或其抗C1q结合片段本质上相同的C1q表位结合。

[0149] 在一些实施方案中,人源化抗C1q抗体是抗体或者其抗原结合片段,其包括重链可变域,所述重链可变域包括选自SEQ ID NOs:1-4的氨基酸序列,或者具有与选自SEQ ID NOs:1-4的所述氨基酸序列至少约70%、至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%或至少约95%同源性的氨基酸序列。在一些实施方案中,人源化抗C1q抗体是抗体或者其抗原结合片段,其包括轻链可变域,所述轻链可变域包括选自SEQ ID NOs:5-8的氨基酸序列,或者具有与选自SEQ ID NOs:5-8的所述氨基酸序列至少约70%、至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%或至少约95%同源性的氨基酸序列。在一些实施方案中,人源化抗C1q抗体是抗体或者其抗原结合片段,其包括重链可变域和/或轻链可变域,所述重链可变域包括选自SEQ ID NOs:1-4的氨基酸序列,或者具有与选自SEQ ID NOs:1-4的所述氨基酸序列至少约70%、至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%或至少约95%同源性的氨基酸序列,所述轻链可变域包括选自SEQ ID NOs:5-8的氨基酸序列,或者具有与选自SEQ ID NOs:5-8的所述氨基酸序列至少约70%、至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%或至少约95%同源性的氨基酸序列。

[0150] 在一些实施方案中,人源化抗C1q抗体或者其抗原结合片段包括重链可变域和轻链可变域,所述重链可变域包括SEQ ID NO:1的氨基酸序列,或者具有与SEQ ID NO:1的所





链可变域包括SEQ ID NO:7的氨基酸序列,或者具有与SEQ ID NO:7的所述氨基酸序列至少约70%、至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%或至少约95%同源性的氨基酸序列。在一些实施方案中,人源化抗C1q抗体或者其抗原结合片段包括重链可变域和轻链可变域,所述重链可变域包括SEQ ID NO:4的氨基酸序列,或者具有与SEQ ID NO:4的所述氨基酸序列至少约70%、至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%或至少约95%同源性的氨基酸序列,所述轻链可变域包括SEQ ID NO:8的氨基酸序列,或者具有与SEQ ID NO:8的所述氨基酸序列至少约70%、至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%或至少约95%同源性的氨基酸序列。

[0154] 在一些实施方案中,本公开的人源化抗C1q抗体可以包括至少一个HVR,所述HVR选自ATCC登录号PTA-120399的杂交瘤细胞系或其后代产生的单克隆抗体M1的轻链可变域的HVR-L1、HVR-L2和HVR-L3。在一些实施方案中,本公开的人源化抗C1q抗体可以包括至少一个HVR,所述HVR选自ATCC登录号PTA-120399的杂交瘤细胞系或其后代产生的单克隆抗体M1的重链可变域的HVR-H1、HVR-H2和HVR-H3。在一些实施方案中,本公开的人源化抗C1q抗体可以包括至少一个选自ATCC登录号PTA-120399的杂交瘤细胞系或其后代产生的单克隆抗体M1的轻链可变域的HVR-L1、HVR-L2和HVR-L3的HVR,和至少一个选自ATCC登录号PTA-120399的杂交瘤细胞系或其后代产生的单克隆抗体M1的重链可变域的HVR-H1、HVR-H2和HVR-H3的HVR。

[0155] 在一些实施方案中,本公开的人源化抗C1q抗体可以与C1q结合,并与位于选自下列的氨基酸残基中的C1q蛋白的一个或多个氨基酸结合:(a) SEQ ID NO:9的氨基酸残基196-226 (SEQ ID NO:12),或相应于SEQ ID NO:9的氨基酸残基196-226 (GLFQVVSGGMVLQLQQGDQVWVEKDPKKGHI) (SEQ ID NO:12)的C1q蛋白链A (C1qA)的氨基酸残基;(b) SEQ ID NO:9的氨基酸残基196-221 (SEQ ID NO:13)、或相应于SEQ ID NO:9的氨基酸残基196-221 (GLFQVVSGGMVLQLQQGDQVWVEKDP) (SEQ ID NO:13)的C1qA的氨基酸残基;(c) SEQ ID NO:9的氨基酸残基202-221 (SEQ ID NO:14)、或相应于SEQ ID NO:9的氨基酸残基202-221 (SGGMVLQLQQGDQVWVEKDP) (SEQ ID NO:14)的C1qA的氨基酸残基;(d) SEQ ID NO:9的氨基酸残基202-219 (SEQ ID NO:15)、或相应于SEQ ID NO:9的氨基酸残基202-219 (SGGMVLQLQQGDQVWVEK) (SEQ ID NO:15)的C1qA的氨基酸残基;和(e) SEQ ID NO:9的氨基酸残基Lys 219和/或SEQ ID NO:9的Ser 202、或相应于SEQ ID NO:9的Lys 219和/或Ser 202的C1qA的氨基酸残基。

[0156] 在一些实施方案中,人源化抗C1q体进一步与位于选自下列的氨基酸残基中的C1q蛋白的一个或更多个氨基酸结合:(a) SEQ ID NO:11的氨基酸残基218-240 (SEQ ID NO:16)或相应于SEQ ID NO:11的氨基酸残基218-240 (WLAVNDYYDMVGI QGSDSVFSGF) (SEQ ID NO:16)的C1q蛋白链C (C1qC)的氨基酸残基;(b) SEQ ID NO:11的氨基酸残基225-240 (SEQ ID NO:17)或相应于SEQ ID NO:11的氨基酸残基225-240 (YDMVGI QGSDSVFSGF) (SEQ ID NO:17)的C1qC的氨基酸残基;(c) SEQ ID NO:11的氨基酸残基225-232 (SEQ ID NO:18)或相应于SEQ ID NO:11的氨基酸残基225-232 (YDMVGIQG) (SEQ ID NO:18)的C1qC的氨基酸残基;(d) SEQ ID NO:11的氨基酸残基Tyr 225或相应于SEQ ID NO:11的氨基酸残基Tyr 225的C1qC的氨基酸残基;(e) SEQ ID NO:11的氨基酸残基174-196 (SEQ ID NO:19)或相应于SEQ ID NO:11的氨基酸残基174-196 (HTANLCVLLYRSGVKVVTFCGHT) (SEQ ID NO:19)的C1qC的氨

氨基酸残基; (f) SEQ ID NO:11的氨基酸残基184-192 (SEQ ID NO:20) 或相应于SEQ ID NO:11的氨基酸残基184-192 (RSGVKVTF) (SEQ ID NO:20) 的C1qC的氨基酸残基; (g) SEQ ID NO:11的氨基酸残基185-187或相应于SEQ ID NO:11的氨基酸残基185-187 (SGV) 的C1qC的氨基酸残基; 和 (h) SEQ ID NO:11的氨基酸残基Ser 185或相应于SEQ ID NO:11的氨基酸残基Ser 185的C1qC的氨基酸残基。

[0157] 在某些实施方案中,本公开的人源化抗C1q抗体可以与SEQ ID NO:9所示的人C1qA的氨基酸残基Lys 219和Ser 202或相应于SEQ ID NO:9所示的Lys 219和Ser 202的人C1qA的氨基酸,以及SEQ ID NO:11所示的人C1qC的氨基酸残基Tyr 225或相应于SEQ ID NO:11所示的Tyr 225的人C1qC的氨基酸残基结合。在某些实施方案中,抗C1q抗体与SEQ ID NO:9所示的人C1qA的氨基酸残基Lys 219或相应于SEQ ID NO:9所示的Lys 219的人C1qA的氨基酸残基,以及SEQ ID NO:11所示的人C1qC的氨基酸残基Ser 185或相应于SEQ ID NO:11所示的Ser 185的人C1qC的氨基酸残基结合。

[0158] 在一些实施方案中,本公开的人源化抗C1q抗体与C1q蛋白结合,并与位于选自下列的氨基酸残基中的C1q蛋白的一个或多个氨基酸结合: (a) SEQ ID NO:11的氨基酸残基218-240 (SEQ ID NO:16) 或相应于SEQ ID NO:11的氨基酸残基218-240 (WLAVNDYYDMVGI QGSDSVFSGF) (SEQ ID NO:16) 的C1qC的氨基酸残基; (b) SEQ ID NO:11的氨基酸残基225-240 (SEQ ID NO:17) 或相应于SEQ ID NO:11的氨基酸残基225-240 (YDMVGI QGSDSVFSGF) (SEQ ID NO:17) 的C1qC的氨基酸残基; (c) SEQ ID NO:11的氨基酸残基225-232 (SEQ ID NO:18) 或相应于SEQ ID NO:11的氨基酸残基225-232 (YDMVGIQG) (SEQ ID NO:18) 的C1qC的氨基酸残基; (d) SEQ ID NO:11的氨基酸残基Tyr 225或相应于SEQ ID NO:11的氨基酸残基Tyr 225的C1qC的氨基酸残基; (e) SEQ ID NO:11的氨基酸残基174-196 (SEQ ID NO:19) 或相应于SEQ ID NO:11的氨基酸残基174-196 (HTANLCVLLYRSGVKVTF) (SEQ ID NO:19) 的C1qC的氨基酸残基; (f) SEQ ID NO:11的氨基酸残基184-192 (SEQ ID NO:20) 或相应于SEQ ID NO:11的氨基酸残基184-192 (RSGVKVTF) (SEQ ID NO:20) 的C1qC的氨基酸残基; (g) SEQ ID NO:11的氨基酸残基185-187或相应于SEQ ID NO:11的氨基酸残基185-187 (SGV) 的C1qC的氨基酸残基; 和 (h) SEQ ID NO:11的氨基酸残基Ser 185或相应于SEQ ID NO:11的氨基酸残基Ser 185的C1qC的氨基酸残基。

[0159] 在一些实施方案中,本公开的人源化抗C1q抗体抑制C1q和C1s之间的相互作用。在一些实施方案中,人源化抗C1q抗体抑制C1q和C1r之间的相互作用。在一些实施方案中,人源化抗C1q抗体抑制C1q和C1s之间以及C1q和C1r之间的相互作用。在一些实施方案中,人源化抗C1q抗体抑制C1q和另一种抗体,例如自身抗体之间的相互作用。在一些实施方案中,人源化抗C1q抗体以小于2.5:1、2.0:1、1.5:1或1.0:1的化学计量抑制各个相互作用。在一些实施方案中,人源化C1q抗体在大概等摩尔浓度的C1q和抗C1q抗体的情况下抑制相互作用,例如C1q-C1s的相互作用。在其它实施方案中,抗C1q抗体以小于20:1、小于19.5:1、小于19:1、小于18.5:1、小于18:1、小于17.5:1、小于17:1、小于16.5:1、小于16:1、小于15.5:1、小于15:1、小于14.5:1、小于14:1、小于13.5:1、小于13:1、小于12.5:1、小于12:1、小于11.5:1、小于11:1、小于10.5:1、小于10:1、小于9.5:1、小于9:1、小于8.5:1、小于8:1、小于7.5:1、小于7:1、小于6.5:1、小于6:1、小于5.5:1、小于5:1、小于4.5:1、小于4:1、小于3.5:1、小于3:1、小于2.5:1、小于2.0:1、小于1.5:1或小于1.0:1的化学计量与C1q结合。在某些实施方案

中,人源化抗C1q抗体以从20:1至1.0:1范围内或小于1.0:1的结合化学计量结合C1q。在某些实施方案中,人源化抗C1q抗体以从6:1至1.0:1范围内或小于1.0:1的结合化学计量结合C1q。在某些实施方案中,人源化抗C1q抗体以从2.5:1至1.0:1范围内或小于1.0:1的结合化学计量结合C1q。在一些实施方案中,本公开的对C1q具有1.0:1的结合化学计量的抗C1q抗体产生C1F溶血的大约50%的抑制,由例如本公开中CH50测定所确定。在一些实施方案中,人源化抗C1q抗体抑制C1q和C1r之间的,或C1q和C1s之间的,或C1q和C1r以及C1s二者之间的相互作用。在一些实施方案中,人源化抗C1q抗体抑制C1q和C1r之间的,C1q和C1s之间的,和/或C1q和C1r以及C1s二者之间的相互作用。在一些实施方案中,人源化抗C1q抗体与C1q A链结合。在其他实施方案中,人源化抗C1q抗体与C1q B链结合。在其它实施方案中,人源化抗-C1q抗体与C1q C链结合。在一些实施方案中,人源化抗C1q抗体与C1q A链、C1q B链和/或C1q C链结合。在一些实施方案中,人源化抗C1q抗体与C1q A链、C1q B链和/或C1q C链的球状结构域结合。在其它的实施方案中,人源化抗C1q抗体与C1q A链、C1q B链和/或C1q C链的胶原蛋白样结构域结合。

[0160] 在本公开的人源化抗体抑制两种或更多种补体因子之间的相互作用,例如C1q和C1s之间的相互作用,或C1q和C1r之间的相互作用的情况下,相对于没有本公开抗体的对照,在存在抗体的条件下发生的相互作用可以减少至少10%、至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少95%或至少99%。在某些实施方案中,相对于没有本公开的人源化抗体的对照,在存在人源化抗体的条件下发生的相互作用减少至少30%至至少99%的量。

[0161] 在一些实施方案中,相对于没有本公开抗体的对照,本公开的人源化抗C1q抗体以至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少95%或至少99%,或至少30%至至少99%范围内的量抑制C4切割。测量C4切割的方法是本领域公知的。对于C4切割,本公开的抗体的EC<sub>50</sub>值可以是小于3μg/ml、2.5μg/ml、2.0μg/ml、1.5μg/ml、1.0μg/ml、0.5μg/ml、0.25μg/ml、0.1μg/ml、0.05μg/ml。在一些实施方案中,本公开的抗体在等摩尔浓度的C1q和相应的抗C1q抗体的情况下抑制C4切割。

[0162] 在一些实施方案中,相对于没有本公开抗体的对照,本公开的人源化抗C1q抗体以至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少95%或至少99%,或至少30%至至少99%范围内的量抑制。对于自身抗体依赖和补体依赖的细胞毒性的抑制,本公开的抗体的EC<sub>50</sub>值可以是小于3μg/ml、2.5μg/ml、2.0μg/ml、1.5μg/ml、1.0μg/ml、0.5μg/ml、0.25μg/ml、0.1μg/ml、0.05μg/ml。

[0163] 在一些实施方案中,相对于没有本公开抗体的对照,本公开的人源化抗C1q抗体对依赖于补体的细胞-介导的细胞毒性(CDCC)抑制以至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少95%或至少99%,或至少30%至至少99%范围内的量抑制补体依赖细胞介导的细胞毒性(CDCC)。测量CDCC的方法是本领域公知的。对于CDCC抑制,本公开的抗体的EC<sub>50</sub>值可以是小于3μg/ml、2.5μg/ml、2.0μg/ml、1.5μg/ml、1.0μg/ml、0.5μg/ml、0.25μg/ml、0.1μg/ml、0.05μg/ml。在一些实施方案中,本公开的抗体抑制CDCC但不抑制抗体依赖细胞毒性(ADCC)。

[0164] 在一些实施方案中,相对于没有本公开抗体的对照或者与所使用的对照抗体不结合补体因子或另一种抗体如自身抗体的对照,本公开的人源化抗C1q抗体以至少20%、至少

30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少95%或至少99%，或至少30%至至少99%范围内的量抑制C1F溶血（也称为CH50溶血）（参见，例如，下文实例部分）。测量C1F溶血的方法是本领域公知的（参见，例如，下文实例部分）。对于C1F溶血，本公开的人源化抗体的EC<sub>50</sub>值可以是小于3μg/ml、2.5μg/ml、2.0μg/ml、1.5μg/ml、1.0μg/ml、0.5μg/ml、0.25μg/ml、0.1μg/ml、0.05μg/ml。在一些实施方案中，本公开的人源化抗C1q抗体以小于200ng/ml、小于100ng/ml、小于50ng/ml或小于20ng/ml的剂量中和至少50%的C1F溶血。在一些实施方案中，本公开的人源化抗体在等摩尔浓度的C1q和抗C1q抗体的情况下中和C1F溶血。在一些实施方案中，本公开的人源化抗C1q抗体在人C1F溶血测定中中和溶血。在一些实施方案中，本公开的人源化抗C1q抗体在人、小鼠、和大鼠C1F溶血测定中中和溶血（参见，例如，下文实例部分）。

[0165] 在一些实施方案中，旁路途径可以放大由C1q结合以及后续的C1s激活所引发的CDC；在至少一些这种实施方案中，相对于没有本公开抗体的对照，本公开的抗体以至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少95%或至少99%，或至少30%至至少99%范围内的量抑制旁路途径。

[0166] 在一些实施方案中，本公开的人源化抗C1q抗体在细胞体外模型或突触丢失的体内模型，例如体内小鼠模型中阻止突触丢失。体内小鼠模型可以包括阿尔茨海默病的小鼠淀粉样前体蛋白（APP）转基因模型Tg2576；亨廷顿病的转基因模型R6/2NT-CAG150；或脊肌萎缩症的小鼠模型SMA Δ 7；或，青光眼的遗传小鼠模型DBA/2J。通常，任何显示突触丢失神经退行性疾病模型都可以被使用。

[0167] 在体外或体内测量突触丢失的方法是本领域公知的。相对于没有本公开抗体的对照，体外损伤形成可以以至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%或至少95%，或至少30%至至少95%范围内的量减少。对于预防体外损伤形成，本公开的抗体的EC<sub>50</sub>值可以是小于3μg/ml、2.5μg/ml、2.0μg/ml、1.5μg/ml、1.0μg/ml、0.5μg/ml、0.25μg/ml、0.1μg/ml、0.05μg/ml。相对于没有本公开抗体的对照，体内突触丢失可以以至少5%、至少10%、至少15%、至少20%、至少35%、至少40%或至少50%，或至少5%至至少50%范围内的量减少。

[0168] 在一些实施方案中，本公开的人源化抗C1q抗体在NMO的离体脊髓切片模型中或在NMO的体内小鼠模型中阻止损伤形成。测量离体或体内损伤形成的方法是本领域公知的。离体损伤形成可以以至少0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5或4.0的相对分数减少。对于阻止离体损伤形成，本公开的抗体的EC<sub>50</sub>值可以是小于3μg/ml、2.5μg/ml、2.0μg/ml、1.5μg/ml、1.0μg/ml、0.5μg/ml、0.25μg/ml、0.1μg/ml、0.05μg/ml。体内损伤形成可以按染色的消失（面积%）以至少5%、至少10%、至少15%、至少20%、至少35%、至少40%或至少50%，或至少5%至至少50%的量减少。染色可以通过，但不限于APQ4染色、GFAP染色或MBP染色来评估。

[0169] 本公开提供人源化抗C1q抗体，本公开的人源化抗体可以具有下述特征的一个或多个。本公开的抗体可以是多克隆抗体、单克隆抗体、嵌合抗体、人抗体、抗体片段、双特异性和多特异性抗体、多价抗体、或异源结合抗体（heteroconjugate antibodies）。本公开的抗体片段可以是结合本公开的任何人源化抗C1q抗体相同表位的功能性片段。在一些实施方案中，本公开的抗体片段与C1q特异性结合并中和C1q的生物活性。在一些实施方案中，抗体片段是人源化抗C1q抗体的小型化版本或者与相应的全长抗体具有相同表位，但分子

量小更多的本公开的抗原片段。这种小型化的抗C1q抗体片段可以具有更好的脑穿透能力和更短的半衰期,这对于成像和诊断应用来说是有利的(参见,例如,Lütje S et al., *Bioconjug Chem.* 2014Feb 19;25 (2) :335-41;TavaréR et al., *Proc Nat' l Acad Sci U S A.* 2014 Jan 21;111 (3) :1108-13和Wiehr S et al., *Prostate.* 2014May;74 (7) :743-55)。相应地,在一些实施方案中,本公开的人源化抗C1q抗体片段相比于其相应的全长抗体具有更好的脑穿透性,和/或与相比于其相应的全长抗体相比具有更短的半衰期。在一些实施方案中,本公开的人源化抗C1q抗体是双特异性抗体,其识别第一抗原和第二抗原。在一些实施方案中,第一抗原是C1q抗原。在一些实施方案中,第二抗原是便利运输通过血脑屏障的抗原,其包括但不限于转铁蛋白受体 (TR)、胰岛素受体 (HIR)、胰岛素样生长因子受体 (IGFR)、低密度脂蛋白受体相关蛋白1和2 (LPR-1和2)、白喉毒素受体、CRM197、美洲驼单域抗体、TMEM 30 (A)、蛋白质转导域、TAT、Syn-B、穿膜肽、聚精氨酸肽、angiopep肽和ANG1005。

[0170] 本公开的人源化抗C1q抗体可以进一步含有工程化的效应子功能、氨基酸序列修饰或其它本领域已知的抗体修饰;例如,本文所述的抗C1q抗体的恒定区可以被修饰以破坏补体活化。例如,不希望被理论束缚,不同于人IgG1、IgG2和IgG3的Fc区,人IgG4的Fc区不与C1q结合。相应地,在一些实施方案中,本公开的人源化抗C1q抗体可以进一步包括人IgG4的Fc区。在一些实施方案中,本公开的人源化抗C1q抗体包括Fc区内的一个或多个氨基酸置换,所述氨基酸置换例如阻止臂转换,和/或减少,或者以另外的方式抑制Fc区与细胞中表达的Fc受体相互作用的能力(参见,例如Angal S et al., *Mol Immunol.* 1993Jan;30 (1) :105-8;和Morgan A et al., *Immunology* 1995 86 319-324)。在一些实施方案中,本公开的人源化抗C1q抗体包括Fc区,所述Fc区包括根据Kabat编号规则241或248位点处的氨基酸置换。在一些实施方案中,Fc区包括阻止臂转换的在241位点处的丝氨酸到脯氨酸的氨基酸置换。在一些实施方案中,Fc区包括在根据Kabat编号规则241位点处的丝氨酸到脯氨酸的氨基酸置换。在一些实施方案中,Fc区包括减少或者以另外的方式抑制Fc区与Fc受体相互作用的能力的在248位点处的丝氨酸到脯氨酸的氨基酸置换。在一些实施方案中,Fc区包括在根据Kabat编号规则248位点处的亮氨酸到谷氨酸的氨基酸置换。在一些实施方案中,本公开的人源化抗C1q抗体包括Fc区,所述Fc区包括SEQ ID NO:37的氨基酸序列。

[0171] 其它的人源化抗C1q抗体,例如与本公开的C1q抗体特异性结合的人源化抗体,可以通过本领域已知的各种方法被鉴别、筛选和/或表征其的物理/化学性质和/或生物活性。

[0172] 抗体制备

[0173] 本公开的抗C1q抗体可以使用本文中描述的或者本领域公知的任何方法产生。本公开的单克隆抗体(例如人源化抗体)可以使用各种已知的技术产生,例如Kohler and Milstein, *Nature* 256:495 (1975) 描述的标准体细胞杂交技术。尽管体细胞杂交程序是优选的,原则上,产生单克隆抗体的其他技术也可被使用,例如B淋巴细胞和噬菌体的病毒化或致癌转变展示了使用人抗体基因库的技术。

[0174] 一种用于生产产生本公开的单克隆抗体的杂交瘤的方法是鼠类系统。在小鼠内生产杂交瘤细胞是本领域公知的,包括分离和融合免疫淋巴细胞的免疫方案和技术。

[0175] 多克隆抗体可以通过用多肽免疫原免疫合适的对象来制备。被免疫对象中的多肽抗体的滴定浓度通过标准技术(例如使用固定化多肽的酶联免疫吸附测定(ELISA))随时间被监控。如果期望,针对抗原的抗体可以从哺乳动物中(例如从血液中)分离,并通过已知的



技术(例如蛋白A层析法获得IgG部分)进一步纯化。在免疫后的合适的时间,例如当抗体的滴定浓度最高时,抗体生产细胞可以从所述对象中获得,并通过标准技术,例如Kohler and Milstein(1975) *Nature* 256:495-497最初描述的杂交瘤技术(另外参见Brown et al. (1981) *J. Immunol.* 127:539-46; Brown et al. (1980) *J. Biol. Chem.* 255:4980-83; Yeh et al. (1976) *Proc. Nat' l. Acad. Sci.* 76:2927-31; 和Yeh et al. (1982) *Int. J. Cancer* 29:269-75), 近期的人B细胞杂交瘤技术(Kozbor et al. (1983) *Immunol. Today* 4:72), the EBV杂交瘤技术(Cole et al. (1985) *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96) 或三元杂交瘤技术用于制备单克隆抗体。生产单克隆抗体杂交瘤的技术是已知的(通常参见Kenneth, R.H. in *Monoclonal Antibodies: A New Dimension In Biological Analyses*, Plenum Publishing Corp., New York, New York (1980); Lerner, E.A. (1981) *Yale J. Biol. Med.* 54:387-402; Gefter, M.L. et al. (1977) *Somatic Cell Genet.* 3:231-36)。简而言之,无限增殖细胞系(典型地骨髓瘤细胞)融合到来自上文描述的免疫原免疫的哺乳动物的淋巴细胞(典型地脾细胞),并且筛选获得的杂交瘤细胞的培养上清液以鉴别生产与多肽抗原结合(优选特异性结合)的单克隆抗体的杂交瘤细胞。

[0176] 很多已知的用于融合淋巴细胞和无限增殖细胞系的方案中的任意方案可以被用于生产抗PD-1、PD-L1或PD-L2单克隆抗体(参见,例如Galfré, G. et al. (1977) *Nature* 266:550-52; Gefter et al. (1977) *supra*; Lerner (1981) *supra*; Kenneth (1980) *supra*)的目的。此外,普通的技术人员将理解,这样的方法有许多变体也是有用的。典型地,无限增殖细胞系(例如,骨髓瘤细胞系)是源自和淋巴细胞相同的哺乳动物种类。例如,鼠类杂交瘤细胞可以通过融合由本公开的免疫原制备的免疫的小鼠的淋巴细胞和无限增殖小鼠胞系。优选的无限增殖细胞系是对包含有次黄嘌呤、氨基蝶呤和胸腺嘧啶的培养基(“HAT培养基”)敏感的小鼠骨髓瘤细胞系。根据标准技术,一些骨髓瘤细胞系中的任一种可以被用作融合伙伴,例如P3-NS1/1-Ag4-1, P3-x63-Ag8.653或Sp2/0-Ag14骨髓瘤细胞系。这些骨髓瘤细胞系可以从美国菌种保藏中心(ATCC, Rockville, Md)获得。典型地,HAT敏感的小鼠骨髓细胞使用聚乙二醇(“PEG”)融合到小鼠脾细胞中。得自融合的杂交瘤细胞随后使用HAT培养基被筛选,所述HAT培养基杀死未融合以及未有效融合的骨髓瘤细胞(未融合的脾细胞由于未转变而在几天后死亡)。对于结合特定多肽的抗体,通过筛选杂交瘤细胞培养上清液,例如使用标准ELISA测定,生产本公开的单克隆抗体的杂交瘤细胞被检测。

[0177] 作为制备单克隆抗体分泌杂交瘤细胞的替代方案,对期望的多肽(例如C1q)的特异性的单克隆,可以通过使用合适的多肽筛选重组组合免疫球蛋白库(例如抗体噬菌展示库),由此分离结合所述多肽的免疫球蛋白库成员来鉴别和分离。生产和筛选噬菌展示库的试剂盒是商业可获得的(例如, the Pharmacia Recombinant Phage Antibody System, Catalog No. 27-9400-01; 和the Stratagene SurfZAP™ Phage Display Kit, Catalog No. 240612)。此外,在例如Ladner et al. 美国专利No. 5,223,409; Kang et al. 国际公开No. WO 92/18619; Dower et al. 国际公开No. WO 91/17271; Winter et al. 国际公开WO 92/20791; Markland et al. 国际公开No. WO 92/15679; Breitling et al. 国际公开WO 93/01288; McCafferty et al. 国际公开No. WO 92/01047; Garrard et al. 国际公开No. WO 92/09690; Ladner et al. 国际公开No. WO 90/02809; Fuchs et al. (1991) *Biotechnology (NY)* 9:1369-1372; Hay et al. (1992) *Hum. Antibod. Hybridomas* 3:81-85; Huse et al. (1989)

Science 246:1275-1281;Griffiths et al.(1993)EMBO J.12:725-734;Hawkins et al.(1992)J.Mol.Biol.226:889-896;Clarkson et al.(1991)Nature 352:624-628;Gram et al.(1992)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 89:3576-3580;Garrard et al.(1991)Biotechnology (NY) 9:1373-1377;Hoogenboom et al.(1991)Nucleic Acids Res.19:4133-4137;Barbas et al.(1991)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 88:7978-7982;和McCafferty et al.(1990)Nature 348:552-554中可以找到特别合适的用于生产和筛选抗体展示库的方法和试剂的例子。

[0178] 此外,重组抗C1q抗体,例如人源化和嵌合的单克隆抗体,可以被生产,所述抗体可以使用标准重组DNA技术被制得。这样的人源化和嵌合的单克隆抗体可以通过本领域已知的重组DNA技术(例如使用:Robinson et al.国际专利公开PCT/US86/02269;Akira et al.欧洲专利申请184,187;Taniguchi,M.欧洲专利申请171,496;Morrison et al.欧洲专利申请173,494;Neuberger et al.PCT申请W0 86/01533;Cabilly et al.美国专利No.4,816,567;Cabilly et al.欧洲专利申请125,023;Better et al.(1988)Science 240:1041-1043;Liu et al.(1987)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 84:3439-3443;Liu et al.(1987)J.Immunol.139:3521-3526;Sun et al.(1987)Proc.Natl.Acad.Sci.84:214-218;Nishimura et al.(1987)Cancer Res.47:999-1005;Wood et al.(1985)Nature 314:446-449;Shaw et al.(1988)J.Natl.Cancer Inst.80:1553-1559;Morrison,S.L.(1985)Science 229:1202-1207;Oi et al.(1986)Biotechniques 4:214;Winter美国专利5,225,539;Jones et al.(1986)Nature 321:552-525;Verhoeyan et al.(1988)Science 239:1534;和Beidler et al.(1988)J.Immunol.141:4053-4060中描述的方法)被制备。

[0179] 此外,人源化抗体可以根据标准方案(例如美国专利5,565,332中所公开的那些方案)生产。在另一实施方案中,抗体链或者特异性结合对成员可以使用本领域已知的技术通过包括编码特定结合对成员的多肽链和可复制通用展示包的组件的融合的核酸分子的载体与包含编码单个结合对成员的第二多肽链的核酸分子的载体之间的重组被生产,例如,如美国专利5,565,332,5,871,907或5,733,743中所描述的。使用分子间抗体以抑制细胞中的蛋白质功能也是本领域已知的(参见,例如Carlson,J.R.(1988)Mol.Cell.Biol.8:2638-2646;Biocca,S.et al.(1990)EMBO J.9:101-108;Werge,T.M.et al.(1990)FEBS Lett.274:193-198;Carlson,J.R.(1993)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 90:7427-7428;Marasco,W.A.et al.(1993)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 90:7889-7893;Biocca,S.et al.(1994)Biotechnology (NY) 12:396-399;Chen,S-Y.et al.(1994)Hum.Gene Ther.5:595-601;Duan,L et al.(1994)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 91:5075-5079;Chen,S-Y.et al.(1994)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 91:5932-5936;Beerli,R.R.et al.(1994)J.Biol.Chem.269:23931-23936;Beerli,R.R.et al.(1994)Biochem.Biophys.Res.Commun.204:666-672;Mhashilkar,A.M.et al.(1995)EMBO J.14:1542-1551;Richardson,J.H.et al.(1995)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 92:3137-3141;PCT公开No.W0 94/02610Marasco et al.;和PCT公开No.W0 95/03832Duan et al.)。

[0180] 在另一实施方案中,人单克隆抗C1q抗体可以使用转基因的或反式染色体(transchromosomal)小鼠来生成,所述小鼠携带部分人免疫系统而非小鼠免疫系统。在一实施方案中,转基因小鼠,本文中指代“HuMAb小鼠”,其包含编码非重排的人重链( $\mu$ 和 $\gamma$ )和

$\kappa$ 轻链免疫球蛋白序列的人免疫球蛋白基因的迷你基因座,以及钝化内源 $\mu$ 和 $\kappa$ 链基因座的定向突变(Lonberg, N. et al. (1994) *Nature* 368 (6474):856-859)。相应地,所述小鼠呈现下降的小鼠IgM或 $\kappa$ 的表达,并且引入的人重链和轻链转基因经历类转变和体细胞突变,产生高亲和力人IgG $\kappa$ 单克隆抗体来应答免疫作用(Lonberg, N. et al. (1994), *supra*; reviewed in Lonberg, N. (1994) *Handbook of Experimental Pharmacology* 113:49-101; Lonberg, N. and Huszar, D. (1995) *Intern. Rev. Immunol.* Vol. 13:65-93, 和Harding, F. and Lonberg, N. (1995) *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 764:536-546)。HuMAb小鼠的制备在Taylor, L. et al. (1992) *Nucleic Acids Research* 20:6287-6295; Chen, J. et al. (1993) *International Immunology* 5:647-656; Tuailon et al. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:3720-3724; Choi et al. (1993) *Nature Genetics* 4:117-123; Chen, J. et al. (1993) *EMBO J.* 12:821-830; Tuailon et al. (1994) *J. Immunol.* 152:2912-2920; Lonberg et al., (1994) *Nature* 368 (6474):856-859; Lonberg, N. (1994) *Handbook of Experimental Pharmacology* 113:49-101; Taylor, L. et al. (1994) *International Immunology* 6:579-591; Lonberg, N. and Huszar, D. (1995) *Intern. Rev. Immunol.* Vol. 13:65-93; Harding, F. and Lonberg, N. (1995) *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 764:536-546; Fishwild, D. et al. (1996) *Nature Biotechnology* 14:845-851中进行了描述。还参见,美国专利Nos. 5,545,806; 5,569,825; 5,625,126; 5,633,425; 5,789,650; 5,877,397; 5,661,016; 5,814,318; 5,874,299; 和5,770,429; Lonberg and Kay, and GenPharm International; 美国专利No. 5,545,807 Surani et al.; 国际公开Nos. WO 98/24884, 公开于1998年6月11日; WO 94/25585, 公开于1994年11月10日; WO 93/1227, 公开于1993年6月24日; WO 92/22645, 公开于1992年12月23日; WO 92/03918, 公开于1992年3月19日。

[0181] 然而,本公开的另一方面涉及抗C1q抗体,所述抗C1q抗体是通过包括用免疫原C1q多肽或其免疫原部分分别免疫动物,然后从与多肽特异性结合的动物抗体中分离的方法可获得的。

[0182] 在本公开的再另一方面,部分或已知的抗体序列可以被用来生产和/或表达新的抗体。抗体主要通过位于六个重链和轻链互补决定区(CDRs)的氨基酸残基与目标抗原相互作用。出于这个理由,在各个抗体之间,相比于CDRs外部的序列,CDRs内部的氨基酸序列更加多样化。因为CDR序列负责大部分的抗体-抗原相互作用,通过构建包含CDR序列的表达载体,表达模仿特定天然存在的抗体的特性的重组抗体是可能的,所述CDR序列来自接枝在来自具有不同特性的不同抗体的框架序列上的特定天然存在的抗体(参见,例如Riechmann, L. et al., 1998, *Nature* 332:323-327; Jones, P. et al., 1986, *Nature* 321:522-525; 和Queen, C. et al., 1989, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86:10029-10033)。这样的框架序列可以从包含生殖细胞系抗体基因序列或非生殖细胞系抗体基因序列的公共DNA数据库获得。这些生殖细胞系序列将不同于成熟抗体基因序列,因为其将不包含在B细胞成熟期间由V(D)J连接形成的完全组装可变基因。生殖细胞系基因序列也将在均匀跨可变区的个别位置不同于高亲和力次级全套抗体的序列。例如,体细胞突变在框架区的氨基端部分相对不频繁。例如,体细胞突变在框架区1的氨基端部分和框架区4的羧基端部分是相对补频繁的。此外,许多体细胞突变并未显著地改变抗体的结合特性。出于这个理由,为了重建具有与原始抗体相似的结合特性的完整的重组抗体,获得特定抗体的整个DNA序列不是必需的(参见

1999年3月12日递交的PCT/US99/05535)。典型地,跨越CDR区的部分重链和轻链序列对该目的是足够的。所述部分序列被用于确定哪个生殖细胞系和/或非生殖细胞系可变,并连接对重组抗体可变基因有贡献的基因区段。生殖细胞系和/或非生殖细胞系序列然后被用来填补可变区缺失的部分。重链和轻链前导序列在蛋白质成熟期间被切割,并且其对最终抗体的特性无贡献。为了加入缺失的序列,克隆cDNA序列可以通过连接作用或PCR扩增,与合成的寡核苷酸结合。可替换地,整个可变区被合成为一组短的,重叠的寡核苷酸,并通过PCR扩增结合,以产生完全合成的可变区克隆。该过程具有某些优势,例如消除或包含特定限制性位点,或者优化特定密码子。上述过程也可以用来在某物种(例如人)中筛选特定免疫球蛋白编码序列库,以从另一物种(例如小鼠)中的已知的抗体序列设计同源免疫球蛋白编码序列(参见,例如,以下的实施例部分)。

[0183] 来自杂交瘤的重链和轻链的编码本的核苷酸序列可以被用来设计合成寡核苷酸的重叠组,以产生于天然序列具有相同氨基酸编码能力的合成序列。合成的重链和Kappa链序列可以与天然序列有三种方式不同:重复的核苷酸碱基串被打断,以便利寡核苷酸合成和PCR扩增;根据Kozak规则(Kozak, 1991, J. Biol. Chem. 266L19867019870),最佳翻译起始位点被并入;以及翻译起始位点上游的HindIII位点被工程化。

[0184] 对于重链和轻链可变区两者,优化的编码链序列和对应的未优化的编码链序列大约在对应的非编码寡核苷酸的中点处被分解成30-50个核苷酸。因此,对每个链,所述的寡核苷酸可以被组装成跨越150-400个核苷酸的区段的重叠双链组。上述集合体然后被用作模板,以生产150-400个核苷酸的PCR扩增产物。典型地,单个可变区寡核苷酸组将分解成两个集合体,其分别扩增以产生2种重叠PCR产物。这些重叠产物之后通过PCR扩增被组合,以形成完整的可变区。在PCR扩增中,包含重链或者轻链恒定区的重叠片段,以产生可以被容易克隆到表达载体结构中的片段可能也是符合期望的。

[0185] 重建的重链和轻链可变区接着与克隆启动子序列、前导序列、翻译起始序列、前导序列、恒定区序列、3'非翻译序列、多聚多聚腺苷化序列和翻译终止序列结合,以形成表达载体结构。重链和轻链表达结构可以与单个载体结合,共转染、连续转染或者分别转染进入宿主细胞,然后融合形成表达两种链的宿主细胞。

[0186] 此用途中的质粒是本领域公知的,并且包括下文实施例部分所提供的质粒。本公开的完全人抗体和嵌合抗体也包括抗体IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgE、IgA、IgM和IgD及其变体和突变。相似的质粒可以被构建用来表达其他重链同种型或者用来表达包括lambda轻链的抗体。

[0187] 因此,在本公开的一方面,已知的、非人或人抗体(例如,小鼠抗人抗C1q抗体,例如由具有ATCC登录号PTA-120399的杂交瘤细胞系产生的单克隆抗体M1)被用于产生保留本公开的抗体的至少一种功能性特性(例如,与C1q蛋白结合)的结构相关的人抗人C1q抗体。另一功能性特性包括在竞争ELISA测定中抑制单克隆抗体M1与C1q的结合。在一些实施方案中,当采用下文实施例部分所描述的IC<sub>50</sub>值测定时,相比于单克隆抗体M1,结构相关的抗人C1q抗体对抗原具有相当的结合亲和力。在一些实施方案中,当采用下文实施例部分所描述的IC<sub>50</sub>值测定时,相比于单克隆抗体M1,结构相关的抗人C1q抗体对抗原具有更高的结合亲和力。此外,抗C1q抗体(例如,由具有ATCC登录号PTA-120399的杂交瘤细胞系产生的单克隆抗体M1)的一个或更多个CDR或者可变区可以与已知的人框架区和CDRs重组性结合,从而产

生本公开另外的重组工程化的人抗C1q抗体。

[0188] 由于抗体重链和轻链CDR3域在抗体与抗原的结合特异性/亲和力方面具有特别重要的作用是本领域的公知,在一些实施方案中,本公开的如上文所述制备的重组抗体可以包括由具有ATCC登录号PTA-120399的杂交瘤细胞系产生的单克隆抗体M1的可变区的重链和轻链CDR3s。在一些实施方案中,上述抗体可以进一步包括单克隆抗体M1的可变区的CDR2s。在一些实施方案中,上述抗体可以进一步包括单克隆抗体M1的可变区的CDR1s。在一些实施方案中,上述抗体可以进一步包括CDRs的任何组合。

[0189] 在一些实施方案中,上文所述工程化抗体的CDR1、CDR2和/或CDR3区可以包括如由具有ATCC登录号PTA-120399的杂交瘤细胞系产生的单克隆抗体M1的可变区氨基酸序列的精确的氨基酸序列。然而,普通的技术人员将理解,在依然保持抗体有效地与C1q结合的能力的同时,可以从精确的CDR序列存在一些偏离。相应地,在另一实施方案中,工程化的抗体可以由一个或更多个CDRs构成,所述一个或更多个CDRs例如50%、60%、70%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或99.5%相同于单克隆抗体M1的一个或更多个CDRs。

[0190] 抗体片段

[0191] 在某些实施方案中,使用抗C1q抗体片段,而非完整抗C1q抗体是有利的。更小的片段尺寸允许快速地清除。

[0192] 各种各样的技术已经被开发用于生产抗体片段。传统上,这些片段是通过对完整抗体进行蛋白质水解消化获得的(参见,例如,Morimoto et al., J. Biochem. Biophys. Method. 24:107-117 (1992) 和 Brennan et al., Science 229:81 (1985))。然而,这些片段现在可以通过重组宿主细胞直接产生,例如使用编码本公开的抗C1q抗体的核酸。Fab、Fv和scFv抗体片段都可以在大肠杆菌(E. coli)中表达并由大肠杆菌分泌,从而允许直接产生大量的这种片段。抗C1q抗体片段还可以从上述的抗体噬菌体文库中分离。或者,Fab'-SH片段可以直接从大肠杆菌中回收,并将其化学偶联形成F(ab')<sub>2</sub>片段(Carter et al., Bio/Technology 10:163-167 (1992))。根据另一种方法,F(ab')<sub>2</sub>片段可以直接从重组宿主细胞培养基中分离。具有增加的体内半衰期的Fab和F(ab')<sub>2</sub>片段抗体片段的产生在美国专利No. 5869046中描述。在其它实施方案中,选择的抗体是单链Fv片段(scFv)。参见W0 93/16185;美国专利No. 5571894和美国专利No. 5587458。抗C1q、抗C1r或抗C1s抗体片段还可以是“线性抗体”,例如美国专利5641870中所述的。这种线性抗体片段可以是单特异性的或双特异性的。

[0193] 双特异性和多特异性抗体

[0194] 在一些实施方案中,本公开的抗体包括双特异性抗体和多特异性抗体。

[0195] 双特异性抗体(BsAbs)是对至少两个不同的表位具有结合特异性的抗体,所述至少两个不同的表位包括那些在同一个蛋白上的或在另一个蛋白上的(例如本公开的一种或更多种C1q蛋白)。或者,BsAb的一部分可以具有结合靶C1q抗原的臂,另一部分可以与结合另一种蛋白的臂结合。这种抗体可以来自于全长抗体或抗体片段(例如,F(ab')<sub>2</sub>双特异性抗体)。

[0196] 制备双特异性抗体的方法是本领域已知的。传统的产生全长双特异性抗体的方法是基于两个免疫球蛋白重链/轻链对的共表达,其中两个链具有不同的特异性。Millstein

et al., Nature, 305:537-539 (1983)。由于免疫球蛋白重链和轻链的随机排列,这些杂交瘤(quadromas)可能产生10种不同抗体分子的混合物,其中只有一种具有正确的双特异性结构。纯化正确分子通常是通过亲和层析步骤进行,其相当地繁琐,并且产物的产率低。类似的方法在WO 93/08829和Traunecker et al., EMBO J., 10:3655-3659 (1991)中公开。

[0197] 根据不同的方法,具有所希望的结合特异性(抗体-抗原结合位点)的抗体可变域与免疫球蛋白恒定域序列融合。上述融合可以是与包含铰链的至少一部分、 $CH_2$ 和 $CH_3$ 区的免疫球蛋白的重链恒定域的融合。在一些实施方案中,包含轻链结合所必须位点的第一重链恒定区( $CH_1$ )出现在至少一种融合中。编码免疫球蛋白重链融合DNA,以及,如果需要的话,免疫球蛋白轻链,被插入到各自的表达载体中,并被共转染到合适的宿主生物体中。在构建过程中使用不等比例的三种多肽链以提供最佳产率的实施方案中,上述方法为调整三种多肽片段的相互比例提供了很大的灵活性。然而,当至少两种多肽链以相同比例表达可以获得高的产率,或者当比例不是十分重要时,可以在一个表达载体中插入两种或所有三种多肽链的编码序列。

[0198] 在该方法的一些实施方案中,双特异性抗体由位于一条臂上的具有第一结合特异性的杂交免疫球蛋白重链,和位于另一条臂上的杂交免疫球蛋白重链-轻链对(提供第二结合特异性)组成。发现这种不对称结构有利于从不需要的免疫球蛋白链组合中分离所希望的双特异性化合物,这是因为仅在双特异性分子的一半中存在免疫球蛋白轻链,这提供了一种简单的分离方法。该方法公开在WO 94/04690中。更多关于产生双特异性抗体的细节参见,例如,Suresh et al., Methods in Enzymology 121:210 (1986)。

[0199] 根据WO 96/27011或美国专利No. 5731168中描述的另一种方法,抗体分子对之间的界面可以被工程化,以使从重组细胞培养基中回收的异二聚体的百分比最大化。上述界面可以包括抗体恒定域的 $CH_3$ 区的至少一部分。在该方法中,来自第一抗体分子的界面的一个或更多个小氨基酸侧链被替换为大的侧链(例如,酪氨酸或色氨酸)。在第二抗体分子的界面上,通过用小氨基酸侧链(例如,丙氨酸或苏氨酸)取代大氨基酸侧链,可以产生具有与上述大侧链相同和相近尺寸的补偿“腔”。上述方法为提高异二聚体相对于其它不需要的终产物(例如同二聚体)的产率的提供了一种机制。

[0200] 从抗体片段产生双特异性抗体的技术在文献中已有描述。例如,双特异性抗体可以通过化学键(chemical linkage)制备。Brennan et al., Science 229:81 (1985)描述了一种将完整抗体通过蛋白水解切割产生 $F(ab')_2$ 片段的方法。在二巯基化合物络合剂亚砷酸钠的存在条件下,这些片段被还原,以稳定附近的二巯基化合物并阻止分子间二硫化物的形成。然后,产生的 $Fab'$ 片段被转化为硫代硝基苯甲酸盐(thionitrobenzoate, TNB)衍生物。其中一种 $Fab'$ -TNB衍生物接着被再转换为 $Fab'$ -TNB衍生物,以形成双特异性抗体。产生的双特异性抗体可以作为酶的选择性固定试剂。

[0201]  $Fab'$ 片段可以直接从大肠杆菌中回收并经化学偶联形成双特异性抗体。Shalaby et al., J. Exp. Med. 175:217-225 (1992)描述了全长人源化双特异性抗体 $F(ab')_2$ 分子的产生。每个 $Fab'$ 片段分别由大肠杆菌分泌并直接在体外经化学偶联以形成双特异性抗体。由此形成的双特异性抗体能够与过表达ErbB2受体的细胞和正常的人T细胞结合,并触发人类细胞毒性淋巴细胞的裂解活性,以对抗人类乳腺肿瘤目标。

[0202] 各种直接从重组细胞培养基中制备和分离双价抗体片段的技术也已被描述。例

如,双价异二聚体已通过亮氨酸拉链被制备。Kostelny et al.,*J.Immunol.*,148(5):1547-1553(1992)。来自Fos和Jun蛋白的亮氨酸拉链肽通过基因融合与两种不同抗体的Fab'部分连接。抗体同二聚体在铰链区被还原,形成单体,然后再被氧化形成抗体异二聚体。由Hollinger et al.,*Proc.Nat'l Acad.Sci.USA*,90:6444-6448(1993)描述的“双体(diabody)”技术提供了另一种制备双特异性/二价抗体片段的机制。该片段包含重链可变域(V<sub>H</sub>),其通过接头与轻链可变域(V<sub>L</sub>)相连,所述接头非常短以至于同一条链上的两个域之间无法配对。相应地,一个片段上的V<sub>H</sub>和V<sub>L</sub>域被迫与另一个片段上的互补V<sub>L</sub>和V<sub>H</sub>域配对,从而形成两个抗原结合位点。通过使用单链Fv(sFv)二聚体制备双特异性/二价抗体片段的另一种策略也已有报道。参见Gruber et al.,*J.Immunol.*,152:5368(1994)。

[0203] 还预期具有多于二价的抗体。例如,三特异性抗体也可以被制备。Tutt et al.,*J.Immunol.*147:60(1991)。

[0204] 示例性双特异性抗体可以结合两个不同的抗原。在一些实施方案中,双特异性抗体结合第一抗原C1q,和便利运输通过血脑屏障的第二抗原。本领域已知有多种抗原便利运输通过血脑屏障(参见,例如,Gabathuler R.,*Approaches to transport therapeutic drugs across the blood-brain barrier to treat brain diseases,Neurobiol.Dis.*37(2010)48-57)。此类第二抗原包括,但不限于,转铁蛋白受体(TR)、胰岛素受体(HIR)、胰岛素样生长因子受体(IGFR)、低密度脂蛋白受体相关蛋白1和2(LPR-1和2)、白喉毒素受体,包括CRM197(白喉毒素的无毒性突变体)、美洲驼单域抗体例如TMEM 30(A)(翻转酶)、蛋白质转导域例如TAT、Syn-B、或穿膜肽、聚精氨酸肽或通常带正电荷的肽和angiopep肽例如ANG1005(参见,例如,Gabathuler,2010)。

[0205] 多价抗体

[0206] 在一些实施方案中,本公开的抗体包括多价抗体。多价抗体可以比二价抗体更快地被表达该抗体所结合的抗原的细胞内在化(和/或被分解代谢)。本公开的抗C1q抗体或其抗体片段可以是具有三个或者更多个抗原结合位点(例如四价抗体)的多价抗体(除IgM类),其可以容易地通过重组表达编码所述抗体的多肽链的核酸而产生。多价抗体可以包括二聚化结构域以及三个或更多个抗原结合位点。在一些实施方案中,所述二聚化结构域包括Fc区或铰链区。在此情况下,抗体将包括Fc区和位于Fc区的氨基末端的三个或更多个抗原结合位点。在一些实施方案中,本文的多价抗体包含三个至约八个抗原结合位点,并且在一些实施方案中,其包含四个抗原结合位点。多价抗体包含至少一条多肽链(在一些实施方案中两条多肽链),其中一条或多条多肽链包含两个或更多个可变域。例如,一条或多条多肽链可以包括VD1-(X1)<sub>n</sub>-VD2-(X2)<sub>n</sub>-Fc,其中VD1是第一可变域,VD2是第二可变域,Fc是Fc区的一条多肽链,X1和X2代表氨基酸或多肽,n是0或1。类似地,一条或多条多肽链可以包括V<sub>H</sub>-C<sub>H</sub>1-弹性接头-V<sub>H</sub>-C<sub>H</sub>1-Fc区链;或V<sub>H</sub>-C<sub>H</sub>1-V<sub>H</sub>-C<sub>H</sub>1-Fc区链。本文的多价抗体可以进一步包括至少两个(在一些实施方案中四个)轻链可变域多肽。本文的多价抗体可以,例如,包括从约二个至约八个轻链可变域多肽。本文所预期的轻链可变域多肽包括轻链可变域以及,可选地还包括CL域。

[0207] 异源结合抗体

[0208] 异源结合抗体也在本公开的范围内。异源结合抗体由两个共价连接的抗体(例如本公开的抗C1q抗体或其抗体片段)组成。例如,异源结合抗体中的一个抗体可以与亲和素

偶联,另一个抗体与生物素偶联。此类抗体已经被提出用于将免疫系统细胞靶向定位到不需要的细胞,例如美国专利No.4676980,并且已被用于治疗HIV感染。国际公开Nos.WO 91/00360、WO 92/200373和EP 0308936。考虑可以用合成蛋白质化学中已知的方法在体外制备抗体,包括那些涉及交联剂的方法。例如,免疫毒素可以通过二硫化物互换反应或者通过形成硫醚键来构建。用于该目的的合适的试剂的实例包括亚氨基硫醇盐和甲基-4-巯基丁酰亚胺酸和例如美国专利No.4676980中公开的那些。异源结合抗体可以使用任何方便的交联方法来制备。合适的交联剂是本领域公知的,并与多种交联技术一同在美国专利No.4676980中公开。

#### [0209] 效应子功能的工程化

[0210] 在一些实施方案中,通过修饰本公开的人源化抗C1q抗体,以改变效应子功能和/或增加抗体的血清半衰期可能是符合期望的。例如,在恒定区的Fc受体结合位点可以修饰或突变,以移除或减少其对某些Fc受体,例如Fc $\gamma$ RI、Fc $\gamma$ RII和/或Fc $\gamma$ RIII,的结合亲和力。在一些实施方案中,效应子功能通过移除抗体Fc区(例如在IgG的CH<sub>2</sub>域)的N-糖基化而被破坏。在一些实施方案中,效应子功能通过修饰人IgG的区,例如233-236、297和/或327-331区,而被破坏,如PCT WO 99/58572和Armour et al., *Molecular Immunology* 40:585-593 (2003); Reddy et al., *J. Immunology* 164:1925-1933 (2000)中所描述的。

[0211] 本文所描述的抗-补体抗体的恒定区也可以被修饰从而破坏其补体的激活。例如,通过突变C1结合基序(例如C1q结合基序)中恒定区中的氨基酸残基,IgG抗体与补体的C1组分结合之后的补体激活也可以被减少。据报道,对人IgG1的D270、K322、P329、P331中的每一个,Ala突变都显著降低抗体与C1q结合并激活补体的能力。对于鼠类IgG2b,C1q结合基序包含E318、K320和K322。Idusogie et al. (2000) *J. Immunology* 164:4178-4184; Duncan et al. (1988) *Nature* 322:738-740。由于经鉴别的鼠类IgG2b的C1s结合基序E318、K320和K322被认为对于其它抗体同种型是共有的(Duncan et al. (1988) *Nature* 322:738-740),通过使用侧链上具有不恰当功能的残基替换三个指定残基中的任何一个,IgG2b的C1q结合活性可以被破坏。不一定仅用Ala替换离子型残基来破坏C1q结合。为了破坏C1q结合,还可以使用其它烷基取代的非离子型残基,例如Gly、Ile、Leu、或Val,或如Phe、Tyr、Trp和Pro这样的芳香族非极性残基替换上述三个残基中的任何一个。此外,为破坏C1s结合活性,还可以使用如Ser、Thr、Cys和Met这样的极性非离子型残基替换残基320和322,但不替换残基318,。此外,移除补体结合所必需的Fc区域的碳水化合物修饰可以阻止补体活化。IgG重链CH<sub>2</sub>域的保守天冬酰胺(Asn-297)的糖基化对于抗体效应子功能是必需的(Jefferis et al. (1998) *Immunol Rev* 163:59-76)。Fc聚糖的修饰改变IgG的构象并降低了Fc对补体蛋白C1q和效应子细胞受体FcR的结合亲和力(Alhorn et al. (2008) *PLoS ONE* 2008;3:e1413)。完全移除Fc聚糖破坏CDC和ADCC。去糖基化可以通过糖苷酶完成,所述糖苷酶是例如由化脓链球菌的基因endoS编码的108kDa的内切糖苷酶S(EndoS),其选择性消化所有IgG亚类的重链上的天冬酰胺连接的聚糖,对其它免疫球蛋白类或其它糖蛋白没有作用(Collin et al. (2001) *EMBO J* 2001;20:3046-3055)。

[0212] 为了增加抗体的血清半衰期,可以将补救受体(salvage receptor)结合表位合并入抗体(特别是抗体片段)中,如,例如美国专利5739277所述。如本文所使用的,术语“补救受体结合表位”指IgG分子(例如,IgG<sub>1</sub>、IgG<sub>2</sub>、IgG<sub>3</sub>或IgG<sub>4</sub>)的Fc区域的表位,器负责增加IgG



分子的体内血清半衰期。

[0213] 其它氨基酸序列修饰

[0214] 本公开的人源化抗C1q抗体,或其抗体片段的氨基酸序列修饰也被涉及到。例如,提高抗体或抗体片段的结合亲和力和/或其它生物学性质可能是可以期待的。通过引入适当的核苷酸变化到编码抗体或抗体片段的核酸中,或者通过肽合成,抗体或抗体片段的氨基酸序列变体被制备。这种修饰包括,例如,抗体的氨基酸序列中的残基缺失、和/或插入和/或置换。缺失、插入和置换可进行任何组合以获得具有所希望的特性(即与本公开的C1q蛋白结合或在物理上相互作用的能力)的最终构建体,只要最终的构建体。氨基酸变化还可以改变抗体的翻译后加工,例如改变糖基化位点的数量或位置。

[0215] 一种鉴别抗C1q抗体上作为优选突变位点的特定残基或特定区的有用的方法被称为“丙氨酸扫描突变”,如Cunningham and Wells在Science,244:1081-1085(1989)所述。其中,一个残基或一组靶残基被鉴别(例如,带电荷的残基如arg、asp、his、lys和glu),并被中性的或带负电荷的氨基酸(最优选丙氨酸或聚丙氨酸)替换,从而影响所述氨基酸与靶抗原的相互作用。随后,通过在置换位点引入另外的或其它的变体,那些显示对置换具有功能上的敏感性的氨基酸位点被改进。因此,虽然用于引入氨基酸序列变化的位点是预先确定了,突变的性质本身不需要预先确定。例如,为了分析在给定位点的突变的效能,在靶密码子或区进行丙氨酸扫描或随机突变,并筛选具有所期望活性的表达的抗体变体。

[0216] 氨基酸序列插入包括:氨基(“N”)和/或羧基(“C”)末端融合体,所述融合体的长度范围从一个残基至含有一百个或更多个残基的多肽;以及单个或多个氨基酸残基的序列内插入。末端插入的实例包括具有N-末端甲硫氨酰残基的抗体或与细胞毒性多肽融合的抗体。抗体分子的其它插入变体包括抗体的N-或C-末端与增加抗体血清半衰期的酶或多肽的融合体。

[0217] 另一类变体是氨基酸取代变体。这些变体的抗体分子中包含至少有一个被不同的残基氨基酸替换的氨基酸残基。最受关注的置换突变位点包括高变区,但FR改变也被考虑到。保守置换显示在下表A中“优选置换”标题下。如果这种取代导致生物学活性的改变,则可以引入在表A中命名为“示例置换”的,或者如下文对氨基酸类别进一步描述的更实质性的改变,并对产物进行筛选。

[0218] 表A:氨基酸置换

[0219]

原始残基	示例置换	优选置换
Ala (A)	val;leu;ile	val
Arg (R)	lys;gln;asn	lys
Asn (N)	gln;his;asp,lys;arg	gln
Asp (D)	glu;asn	glu
Cys (C)	ser;ala	ser
Gln (Q)	asn;glu	asn
Glu (E)	asp;gln	asp
Gly (G)	ala	ala
His (H)	asn;gln;lys;arg	arg

Ile (I)	leu;val;met;ala;phe;正亮氨酸	leu
Leu (L)	正亮氨酸;ile;val;met;ala;phe	ile
Lys (K)	arg;gln;asn	arg
Met (M)	leu;phe;ile	leu
Phe (F)	leu;val;ile;ala;tyr	tyr
Pro (P)	ala	ala
Ser (S)	thr	thr
Thr (T)	ser	ser
Trp (W)	tyr;phe	tyr
Tyr (Y)	trp;phe;thr;ser	phe
Val (V)	ile;leu;met;phe;ala;正亮氨酸	leu

[0220] 通过选择在下列方面上效果差别显著的置换,可实现对抗体生物学性质的实质性修饰:维持(a)置换区域中多肽骨架的结构,例如折叠或螺旋构象,(b)靶位点处分子的电荷或疏水性,或者(c)侧链体积。根据共同的侧链性质,天然存在的残基分为以下几类:

[0221] (1) 疏水的:正亮氨酸、met、ala、val、leu、ile;

[0222] (2) 中性亲水的:cys、ser、thr;

[0223] (3) 酸性的:asp、glu;

[0224] (4) 碱性的:asn、gln、his、lys、arg;

[0225] (5) 影响链方向的残基:gly、pro;和

[0226] (6) 芳香类的:trp、tyr、phe。

[0227] 非保守性置换必需用这些类别中一类的成员替换另一类的成员。

[0228] 任何不涉及维持抗体的正确构象的半胱氨酸残基也可以被置换代,通常用丝氨酸置换,以提高分子的氧化稳定性并防止异常交联。相反地,半胱氨酸键也可以被加入抗体中以提高稳定性(特别是当抗体是抗体片段,例如Fv片段)。

[0229] 在一些实施方案中,置换变体涉及置换亲代抗体(例如,人源化或人抗C1q抗体)的一个或多个高变区域的残基。通常,被选择用于进一步开发的所得到的变体,与产生其的亲代抗体相比,具有改进的生物学性质。产生这种取代变体的一种方便的方法涉及通过噬菌体展示的亲合力成熟。简而言之,几个高变区位点(例如,6-7个位点)被突变以在每一个位点上产生所有可能的氨基取代。从作为融合物的丝状噬菌体颗粒到包装在每个颗粒中的M13的基因III产物,由此产生的抗体变体以单价形式出现。然后,如本文所公开的,对噬菌体展示变体的生物学活性(例如,结合亲和力)进行筛选。为了鉴别用于修饰的候选高变区位点,进行丙氨酸扫描突变以鉴别对于抗原结合具有显著贡献的高变区残基。或者,或另外地,分析抗原-抗体复合物的晶体结构可能是有利于鉴别抗体和抗原(例如本公开的C1q蛋白)之间的接触点。根据本文所述的技术,这些接触残基和相邻的残基是取代的候选残基。一旦这样的变体产生,一组变体将如本文所述被筛选,并在一个或多个相关测定中具有优异性能的抗体将被选择进行进一步开发。

[0230] 另一种类型的抗体的氨基酸变体改变抗体的原始糖基化模式。改变意味着删除在抗体中发现的一个或多个碳水化合物分子,和/或加入一个或多个抗体中不存在的糖基化位点。

[0231] 抗体的糖基化通常是N-连接或O-连接的。N-连接指碳水化合物部分连接在天冬酰胺残基的侧链上。三肽序列天冬酰胺-X-丝氨酸和天冬酰胺-X-苏氨酸,是碳水化合物部分酶连于天冬酰胺侧链的识别序列,其中X是除了脯氨酸之外的任何氨基酸。因此,在多肽中存在任何一种这样的三肽序列会形成潜在的糖基化位点。O-连接的糖基化指N-乙酰半乳糖胺、半乳糖、或木糖这些糖中的一种连接于羟基氨基酸上,虽然5-羟基脯氨酸或5-羟基丝氨酸也可使用,最但常见的是丝氨酸或苏氨酸。

[0232] 在抗体中添加糖基化位点可以通过改变氨基酸序列以使其含有上述的三肽序列中的一个或多个(用于N-连接糖基化位点)而方便地实现。所述修饰还可以通过向原始抗体的序列(用于O-连接的糖基化位点)添加一个或多个丝氨酸或苏氨酸残基或者用其置换来进行。

[0233] 编码抗-IgE抗体的氨基酸序列变体的核酸分子可以用本领域已知的多种方法制备。这些方法包括,但不限于,从天然来源分离(在天然存在氨基酸序列变体的情况下)或通过先对早先制备的变异的或非变异的抗体(例如本公开的抗C1q抗体)或抗体片段进行寡核苷酸介导的(或定点)突变、PCR突变和盒式突变来制备。

[0234] 其它抗体修饰

[0235] 在一些实施方案中,本公开的人源化抗C1q抗体或其抗体片段可以被进一步修饰以含有额外的非蛋白质部分,所述非蛋白质部分是本领域已知的并且是容易获得的。在一些实施方案中,适合用于抗体衍生化的部分是水溶性聚合物。水溶性聚合物的非限制性实例包括,但不限于,聚乙二醇(PEG)、乙二醇/丙二醇共聚物、羧甲基纤维素、葡聚糖、聚乙烯醇、聚乙烯吡咯烷酮、聚-1,3-二噁茂烷、聚1,3,6-三噁烷、乙烯/马来酐共聚物、聚氨基酸(均聚物或无规共聚物)、葡聚糖或聚(正乙基吡咯烷酮)聚乙二醇、丙二醇均聚物、氧化聚丙烯/氧化乙烯共聚物、聚氧乙基化多元醇(如甘油)、聚乙烯醇以及它们的混合物。聚乙二醇丙醛可能因其在在水中的稳定性而在制备中具有优势。聚合物可以是任何分子量,可以是分枝的或不分枝的。与抗体连接的聚合物的数量可以变化,如果连接了超过一个聚合物,它们可以是相同的或不同的分子。通常,可以根据下述考虑来确定用于衍生化的聚合物的数目和/或类型,所述考虑包括但不限于要改进的抗体的具体性质或功能、抗体衍生物是否将用于指定条件下的治疗等。这些技术和其它适合的制剂在Remington:The Science and Practice of Pharmacy,20th Ed.,Alfonso Gennaro,Ed.,Philadelphia College of Pharmacy and Science(2000)中公开。

[0236] 核酸、载体和宿主细胞

[0237] 本公开的人源化抗C1q抗体可以通过重组方法和组合物产生,例如美国专利No.4816567中所述的。在一些实施方案中,提供分离的核酸,其具有编码本公开的任一种抗C1q抗体的核苷酸序列。这种核酸可以编码含有VL的氨基酸序列和/或含有抗C1q抗体的VH的氨基酸序列(例如,抗体的轻链和/或重链)。在一些实施方案中,提供含有这种核酸的一种或多种载体(例如,表达载体)。在一些实施方案中,还提供含有这种核酸的宿主细胞。在一些实施方案中,宿主细胞含有(例如用以下载体转染):(1)含有核酸的载体,所述核酸编码含抗体的VL的氨基酸序列和含抗体的VH的氨基酸序列,或(2)含有编码含抗体的VL的氨基酸序列的核酸的第一载体,和含有编码含抗体的VL的氨基酸序列的核酸的第二载体。在一些实施方案中,宿主细胞是真核的,例如,中国仓鼠卵巢(CHO)细胞或淋巴细胞(例如,Y0、

NS0、Sp20细胞)。

[0238] 本公开提供了抗C1q抗体的制备方法。在一些实施方案中,所述方法包括在适合于抗体表达的条件下,培养含有编码抗C1q抗体的核酸的本公开的宿主细胞。在一些实施方案中,抗体随后从宿主细胞(或宿主细胞培养基)回收。

[0239] 对于本公开的人源化抗C1q抗体的重组产生,编码抗C1q抗体的核酸被分离,并插入到一个或多个载体中进行进一步克隆和/或在宿主细胞中表达。这种核酸可以容易地被分离并通过常规程序测序(例如,通过使用能与编码抗体的重链和轻链的基因特异性结合的寡核苷酸探针)。

[0240] 含有本文所述的编码本公开的任何抗C1q抗体,或其片段多肽(包括抗体)的核酸序列的合适的载体包括,但不限于,克隆载体和表达载体。合适的克隆载体可以根据标准技术构建,或者可以从本领域可用的大量克隆载体中选择。虽然所选择的克隆载体根据要使用的宿主细胞而有所不同,但是可用的克隆载体通常具有自我复制的能力,可以具有一个特定限制性内切酶的靶,和/或可以携带可用于选择含有该载体的克隆的标记基因。合适的实例包括质粒和细菌病毒,例如pUC18、pUC19、Bluescript(例如,pBS SK+)和它的衍生物、mpl8、mpl9、pBR322、pMB9、ColE1、pCR1、RP4、噬菌体DNAs、和穿梭质粒例如pSA3和pAT28。这些和许多其它克隆载体可以从商业供应商例如BioRad、Stratagene和Invitrogen获得。

[0241] 表达载体通常是可复制的多核苷酸构建体,其含有本公开的核酸。表达载体可以作为游离基因或者作为染色体DNA的不可分割的一部分在宿主细胞中复制。合适的表达载体包括,但不限于,质粒,病毒载体,包括腺病毒、腺相关病毒、逆转录病毒,粘粒和PCT公开号No.WO 87/04462中公开的表达载体。载体组分通常可以包括,但不限于下述的一种或多种:信号序列;复制起点;一种或多种标记基因;合适的转录控制元件(例如启动子、增强子和终止子)。对于表达(即翻译),通常还需要一种或多种翻译控制元件,例如核糖体结合位点、翻译起始位点和终止密码子。

[0242] 含有感兴趣的核酸的载体可以通过多种适当方法中的任何一种被引入到宿主细胞中,包括电穿孔,利用氯化钙、氯化铷、磷酸钙、DEAE-葡聚糖或其他物质进行的转染;基因枪法(microprojectile bombardment);脂质体转染;和感染(例如,在载体是感染性试剂例如牛痘病毒的情况下)。引入载体或多核苷酸的选择通常取决于宿主细胞的特征。在一些实施方案中,载体含有核酸,所述核酸含有编码本公开的抗C1q抗体的一个或多个氨基酸序列。

[0243] 用于克隆或表达抗体-编码载体的合适的宿主细胞包括原核或真核细胞。例如,本公开的抗C1q抗体可以在细菌中产生,特别是当不需要糖基化和Fc效应子功能时。对于在细菌中表达抗体片段和多肽(例如,美国专利Nos.5648237、5789199和5840523;和Charlton, Methods in Molecular Biology, Vol.248 (B.K.C.Lo, ed., Humana Press, Totowa, NJ, 2003), pp.245-254,描述了在大肠杆菌中表达抗体片段)。在表达之后,抗体可以从细菌细胞体中被分离为可溶级分,并进行进一步纯化。

[0244] 除了原核生物之外,真核微生物,例如丝状真菌或酵母,也是适合于抗体-编码载体的克隆或表达宿主,包括糖基化途径被“人源化”的真菌和酵母菌株,其导致产生具有部分或完全的人糖基化模式的抗体(例如, Gerngross, Nat. Biotech. 22:1409-1414 (2004); 和 Li et al., Nat. Biotech. 24:210-215 (2006))。

[0245] 用于表达糖基化抗体的合适的宿主细胞还可以来自于多细胞生物体(无脊椎的和有脊椎的)。无脊椎生物细胞的实例包括植物和昆虫细胞。多种杆状病毒毒株已鉴别可以与昆虫细胞一起使用,特别是用于转染草地贪夜蛾(*Spodoptera frugiperda*)细胞。植物细胞培养基也可以用作宿主(例如,美国专利Nos. 5959177、6040498、6420548、7125978和6417429,其中描述了用于在转基因植物中产生抗体的PLANTIBODIES™技术)。

[0246] 脊椎动物细胞也可以用作宿主。例如,适应于在悬液中生长的哺乳动物细胞系可能是有用的。有用的哺乳动物细胞系的其它实例是用SV40转化的猴肾CV1系(COS-7);人胚肾系(293或如例如Graham et al., *J. Gen. Virol.* 36:59 (1977)中所述的293细胞);幼仓鼠肾细胞(BHK);小鼠睾丸支持细胞(如例如Mather, *Biol. Reprod.* 23:243-251 (1980)所述的TM4细胞);猴肾细胞(CV1);非洲绿猴肾细胞(VERO-76);人宫颈癌细胞(HELA);犬肾细胞(MDCK;buffalo大鼠肝细胞(BRL 3A);人肺细胞(W138);人肝细胞(Hep G2);小鼠乳腺肿瘤(MMT 060562);TRI细胞,如例如Mather et al., *Annals N.Y. Acad. Sci.* 383:44-68 (1982)中所述的;MRC 5细胞;和FS4细胞。其它有用的哺乳动物宿主细胞系包括中国仓鼠卵巢(CHO)细胞,包括DHFR-CHO细胞(Urlaub et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4216 (1980));和骨髓瘤细胞系例如Y0、NS0和Sp2/0。适用于抗体产生的特定哺乳动物宿主细胞系的综述,参见,例如Yazaki and Wu, *Methods in Molecular Biology*, Vol. 248 (B.K.C.Lo, ed., Humana Press, Totowa, NJ), pp. 255-268 (2003)。

#### [0247] 药物组合物

[0248] 本公开的人源化抗C1q抗体可以被结合到各种制剂中用于治疗用途(例如,通过施用)或者通过将抗体与合适的药学可接受的载体或稀释剂组合来制备药物(例如,用于治疗或预防神经退行性疾病或自身免疫疾病),并且可以被配制成固体、半固体、液体或气体形式的制剂。这种制剂的实例包括,但不限于,片剂、胶囊剂、粉剂、颗粒剂、软膏剂、溶液剂、栓剂、注射剂、吸入剂、凝胶剂、微球和气溶胶。药物组合物可以包括,依赖于所需制剂,稀释剂的药学可接受的、无毒性的载体,其是常用于配制用于动物或人给药的药物组合物的载体。选择稀释剂以使得它不影响组合的生物活性。这种稀释剂的实例包括,但不限于,蒸馏水、缓冲水、生理盐水、PBS、Ringer's溶液、葡聚糖溶液和Hank's溶液。本公开的药物组合物或制剂可以进一步包括其它载体、佐剂或无毒的、非治疗性的、无免疫原性的稳定剂、赋形剂等。组合物还可以包括其它的接近生理条件的物质,例如pH调节和缓冲试剂、毒性调节试剂、湿润剂和去垢剂。

[0249] 本公开的药物组合物还可以包括多种稳定剂的任何一种,例如抗氧化剂。当药物组合物包括多肽时,多肽可以与各种公知的化合物复合以增强多肽的体内稳定性,或者增强其药理学性质(例如,增加多肽的半衰期,降低其毒性,以及增加溶解性或吸收)。这种修饰或复合试剂的实例包括,但不限于,硫酸盐、葡糖酸盐、柠檬酸盐和磷酸盐。组合物的多肽还可以与增强他们的体内特性的分子复合。这种分子包括,但不限于,碳水化合物、聚胺类、氨基酸、其它肽、离子(例如,钠、钾、钙、镁、锰)和脂类。

[0250] 适合于不同类型给药的制剂的其它实例可以在Remington's Pharmaceutical Sciences, Mace Publishing Company, Philadelphia, PA, 17th ed. (1985)中找到。关于药物递送方法的简述,参见Langer, *Science* 249:1527-1533 (1990)。

[0251] 对于口服施用,活性成分可以以固体剂型,例如胶囊剂、片剂和粉剂,或者以液体

剂型,例如酞剂、糖浆剂和混悬剂的形式施用。活性组分可以与非活性成分和粉状载体,例如葡萄糖、乳糖、蔗糖、甘露醇、淀粉、纤维素或纤维素衍生物、硬脂酸镁、硬脂酸、糖精钠、滑石、碳酸镁一起包装在明胶胶囊中。可被加入以提供所希望的颜色、味道、稳定性、缓冲能力、分散性或其它已知的所希望的特征的其它非活性成分的实例是红色氧化铁、硅胶、十二烷基硫酸钠、二氧化钛和可食用白墨。类似的稀释剂可以被用于制备压缩片剂。片剂和胶囊剂都可以被制备成持续释放产品,以使药物在数小时时间段内连续释放。压缩片剂可以包有糖衣或膜,以掩盖任何令人不快的味道,并保护片剂免受空气的影响,或者可以包有肠溶衣,用于在胃肠道中选择性分解。口服施用的液体剂型可以含有着色剂和调味剂,以提高患者的接受程度。

[0252] 适合于肠胃外施用的制剂包括含水的和不含水的、等渗的无菌注射液,其可以含有抗氧化剂、缓冲剂、抑菌剂和使得制剂与预期的受者的血液等渗的溶质;以及含水的和不含水的无菌悬液,其可以包含悬浮剂、增溶剂、增稠剂、稳定剂和防腐剂。

[0253] 用于配制药物组合物的组分优选是高纯度的并且基本上不含可能有污染的污染物(例如至少是国家食品(National Food,NF)级,通常至少是分析级,更典型地是至少药用级)。而且,计划用于体内应用的组合物通常是无菌的。从这个意义上来说,给定的化合物必须在使用前合成,得到的产物通常基本不含任何可能的有毒物质,特别是任何内毒素,其可能存在于合成或纯化过程中。肠胃外施用的组合物也是无菌的,基本上是等渗的并且在GMP条件下制备。

[0254] 为在脑或中枢神经系统中的保留和稳定化的目的,制剂可以被优化。当试剂被施用到颅腔中时,试剂存留在该区室中,不扩散或者另外穿过血脑屏障是可以期待的。稳定化技术包括交联、聚合、或与基团例如聚乙二醇、聚丙烯酰胺、中性蛋白质载体等连接,以实现分子量的增加。

[0255] 其它增加保留的策略包括将抗体,例如本公开的人源化抗C1q抗体截留在生物可降解或生物可溶蚀的植入物中。治疗活性剂的释放速度通过转运通过聚合物基质的速度,和植入物的生物降解而被控制。药物通过聚合物屏障的转运也会受到以下因素的影响:化合物溶解度;聚合物亲水性;聚合物交联程度;聚合物在吸收水之后的膨胀,以便于聚合物屏障对药物更具有渗透性;植入物的几何形状等。植入物的外形尺寸与选择作为植入位点的区域的尺寸和形状相当。植入物可以是颗粒、片、贴片、板、纤维、微囊等,并且可以具有与所选择的插入位点相适应的任何尺寸和形状。

[0256] 植入物可以是整体的,即具有均匀分布于聚合物基质中的活性试剂,或者是包封的,其中活性试剂被包封在聚合物基质中。要使用的聚合物组合物的选择可随施用位点、期望的治疗时间、患者耐受、要治疗的疾病的性质等而变化。聚合物的特性包括植入位点处的生物可降解性、与感兴趣试剂的相容性、包封的容易度、在生理环境中的半衰期。

[0257] 可以使用的生物可降解聚合物组合物可以是有机酯或醚,当其降解时产生生理学可接受的降解产物,包括单体。酸酐、酰胺、原酸酯等自身或与其它单体的组合可以发挥作用。聚合物可以是缩合聚合物。聚合物可以是交联的或非交联的。尤其感兴趣的是羟基脂肪族羧酸的聚合物(均聚物或共聚物),和多糖类。感兴趣的聚酯包括D-乳酸、L-乳酸、外消旋乳酸、乙醇酸、聚己酸内酯的组合物和其组合。通过使用L-乳酸盐或D-乳酸盐,获得缓慢降解的聚合物,而外消旋物大大增加降解。尤其感兴趣的是乙醇酸和乳酸的共聚物,其中通过

乙醇酸与乳酸的比例控制生物降解速度。最快降解的共聚物具有几乎等量的乙醇酸和乳酸,其中任一种均聚物对降解都更有抵抗力。乙醇酸和乳酸的比例也会影响植入物的脆性,其中对于更大的几何形状来说更有弹性的植入物是合乎需要的。感兴趣的多糖包括藻酸钙和功能化纤维素,特别是羧甲基纤维素酯,其特征是不溶于水,分子量为大约5kD至500kD等。本公开的植入物中还可以使用生物可降解的水凝胶。水凝胶通常是共聚物材料,其特征是能够吸收液体。可以使用的示例性生物可降解水凝胶在Heller in:Hydrogels in Medicine and Pharmacy,N.A.Peppes ed.,Vol.III,CRC Press,Boca Raton,Fla.,1987,pp 137-149中描述。

[0258] 药物剂量

[0259] 含有本公开的人源化抗C1q抗体的本公开的药物组合物可以根据已知方法应用(例如,给需要用抗C1q抗体治疗的个体,例如人个体施用),所述方法例如静脉大剂量施用或在通过一段时间内连续输注、通过肌肉内、腹膜内、脑脊髓内、颅内、脊柱内、皮下、关节内、滑膜内、鞘内、口服、局部、或吸入途径。

[0260] 本公开的药物组合物的剂量和所希望的药物浓度可以随预期的特定应用而变化。合适的剂量或给药途径的确定完全在普通技术人员的能力之内。动物实验为确定人类治疗的有效剂量提供了可靠的指导。有效剂量在种间的调整可以按照Mordenti,J.and Chappell,W.“The Use of Interspecies Scaling in Toxicokinetics,”In Toxicokinetics and New Drug Development,Yacobi et al.,Eds,Pergamon Press,New York 1989,pp.42-46中所述的原则进行。

[0261] 对于本公开的任何人源化抗C1q抗体的体内施用,常规剂量可以在每天大约10ng/kg直至大约100mg/kg个体体重或更多之间变化,这取决于给药途径。在一些实施方案中,剂量是大约1mg/kg/天至10mg/kg/天。对于在几天或更长的时间中重复给药,这取决于要治疗的疾病、病症或状况的严重程度,持续进行治疗直至实现了对症状的所希望的抑制。

[0262] 示例性的给药方案可以包括施用人源化抗C1q抗体的初始剂量,为大约2mg/kg,然后每隔一周施用大约1mg/kg的周维持剂量。其它给药方案可能是有用的,这取决于医生希望达到的药代动力学衰减模式。例如,本文中预期每周对个体给药一次到二十一次。在某些实施方案中,剂量范围从大约3 $\mu$ g/kg至大约2mg/kg(例如大约3 $\mu$ g/kg、大约10 $\mu$ g/kg、大约30 $\mu$ g/kg、大约100 $\mu$ g/kg、大约300 $\mu$ g/kg、大约1mg/kg、或大约2mg/kg)可以被使用。在某些实施方案中,给药频率是每天三次、每天两次、每天一次、每隔一天一次、每周一次、每两周一次、每四周一次、每五周一次、每六周一次、每七周一次、每八周一次、每九周一次、每十周一次、每月一次、每两个月一次、每三个月一次、或者更长时间。治疗的进展可以容易地通过常规技术和测定进行监测。给药方案,包括施用的人源化抗C1q抗体,可以独立于所使用的剂量而随时间变化。

[0263] 对于特定的人源化抗C1q抗体,在已经施用过一次或多次人源化抗C1q抗体的个体中,抗体的剂量可以根据经验确定。个体被给予增加剂量的人源化抗C1q抗体。为评估人源化抗C1q抗体的效力,可以监测神经退行性病症、炎症病症或自身免疫病症的任何症状。

[0264] 本公开的人源化抗C1q抗体的施用可以是连续的或是间歇的,这取决于,例如,受者的生理条件、施用的目的是治疗还是预防以及技术人员已知的其它因素。人源化抗C1q抗体的施用可以在预定的时间段内是基本上连续的,或者可以是以一系列间隔性剂量施用。

[0265] 文献中提供了递送的具体剂量和方法的指导;参见,例如,美国专利Nos.4657760、5206344或5225212。不同的制剂将会对不同的治疗和不同的病症有效,而且为了治疗某一具体的器官或组织而进行的施用可能必需以不同的方式向另一个器官或组织递送,这些内容都在本公开的范围之内。而且,可以通过一次或多次单独的施用,或者通过连续输注施用剂量。对于在几天或更长的时间中重复施用,这取决于不同的情况,持续进行治疗直至实现了对症状的所希望的抑制。但是,其它的给药方案可能是有用的。这种治疗的进展可以容易地通过常规技术和测定进行监测。

#### [0266] 治疗应用

[0267] 本公开提供人源化抗C1q抗体,及其抗原结合片段,它们可以与C1q结合并中和C1q的生物活性。这些人源化抗C1q抗体在预防、降低其风险、或治疗与补体活化有关的许多疾病,包括,但不限于,神经退行性病症、炎性病症和自身免疫病症方面是有用的。相应地,如本文所公开的,本公开的人源化抗C1q抗体可用于在个体中治疗、预防与补体活化有关的疾病或降低其风险,所述疾病包括,但不限于,神经退行性病症、炎性病症和自身免疫病症。在一些实施方案中,所述个体具有这样的疾病。在一些实施方案中,所述个体是人。

[0268] 可以用本公开的人源化抗C1q抗体治疗的神经退行性病症包括与神经连接或突触丢失有关的病症,包括依赖于CF1的突触丢失。这些病症可以包括,但不限于,阿尔茨海默病、肌萎缩性侧索硬化症、多发性硬化、青光眼、肌强直性营养不良、格林-巴利综合征(GBS)、重症肌无力、大疱性类天疱疮、脊髓性肌萎缩、唐氏综合症、帕金森病和亨廷顿病。在一些神经退行性病症中,突触丢失依赖于补体受体3(CR3)/C3或补体受体CR1。在一些神经退行性病症中,突触丢失与依赖于病理活性的突触修剪有关。在一些病症中,突触被小胶质细胞吞噬。相应地,本公开的人源化抗C1q抗体可用于治疗、预防或改善本公开的神经退行性病症的一种或更多种症状。在一些实施方案中,本公开提供在患有本公开的神经退行性病症的个体中治疗、预防、或改善一种或更多种症状的方法,其是通过施用本公开的人源化抗C1q抗体以,例如,抑制C1q和自身抗体的相互作用,C1q和C1r的相互作用,和/或C1q和C1s的相互作用。

[0269] 可以用本公开的人源化抗C1q抗体治疗的炎性或自身免疫疾病包括,但不限于,类风湿性关节炎(RA)、急性呼吸窘迫综合症(ARDS)、局部缺血和再灌注之后的远端组织损伤、体外循环手术过程中的补体活化、皮炎、天疱疮、狼疮性肾炎及导致的肾小球性肾炎和肾管炎、体外循环、心脏停搏液诱导的冠状动脉内皮功能障碍、II型膜增生性肾小球肾炎、IgA肾病、急性肾衰竭、冷球蛋白血症、抗磷脂综合症、慢性开角青光眼、急性闭角青光眼、黄斑变性疾病、老年性黄斑变性(AMD)、(AMD-湿性)、地图状萎缩脉络膜血管新生(CNV)、葡萄膜炎、糖尿病视网膜病变、缺血性视网膜病变、眼内炎、眼内血管新生疾病、糖尿病黄斑水肿、病理性近视、小脑视网膜血管瘤、眼组织胞浆菌病、视神经脊髓炎(NMO)、视网膜中央静脉阻塞(CRVO)、角膜血管新生、视网膜血管新生、利伯氏遗传性视神经病变、视神经炎、白塞氏视网膜病变、缺血性视神经病变、视网膜血管炎、ANCA血管炎、普尔夏视网膜病变、斯耶格伦干眼症、干性AMD、结节病、颞动脉炎、结节性多发性动脉炎、多发硬化症以及移植排斥、超急性排斥反应、血液透析、慢性阻塞性肺病(COPD)、哮喘和吸入性肺炎。在一些实施方案中,自身免疫疾病可以进一步包括,但不限于,格林-巴利综合征(GBS)、重症肌无力、1型糖尿病、桥本氏甲状腺炎、阿狄森氏病、乳糜泻、克罗恩氏病、恶性贫血、慢性天疱疮、白癜风、自身免疫



性溶血性贫血、副肿瘤综合征、脉管炎疾病、低补体血症荨麻疹性血管炎(HUV)、风湿性多肌痛症、颞动脉炎和韦格纳肉芽肿。

[0270] 在自身免疫疾病,例如视神经脊髓炎(NMO)中,自身抗体激活补体系统。在NMO患者中,经典补体途径由自身抗体,例如AQP4-靶向自身抗体与其自身抗原AQP4的结合而引发。AQP4由此激活补体活化的经典途径。在这个激活过程的第一步骤中,补体因子C1q与自身抗体-自身抗原-免疫复合物结合。自身抗体可以包括天然存在的抗体,例如NMO患者的血清抗体(通常被称为NMO-IgG)或单克隆抗体,例如rAb-53。

[0271] 相应地,本公开的人源化抗C1q抗体可用于治疗、预防或改善本公开的炎性或自身免疫疾病的一种或更多种症状。在一些实施方案中,本公开提供在患有本公开的炎性或自身免疫疾病的个体中治疗、预防、或改善一种或更多种症状的方法,其是通过施用本公开的人源化抗C1q抗体以,例如,抑制C1q和自身抗体的相互作用,C1q和C1r的相互作用,和/或C1q和C1s的相互作用。

[0272] 可以用人源化抗C1q抗体治疗的代谢性疾病包括,但不限于,糖尿病,例如II型糖尿病,和肥胖症。可用于人源化抗C1q抗体测试的代谢性病症的体外和体内模型是本领域公知的。相应地,本公开的人源化抗C1q抗体可用于治疗、预防或改善本公开的代谢性疾病的一种或更多种症状。在一些实施方案中,本公开提供在患有本公开的代谢性疾病的个体中治疗、预防、或改善一种或更多种症状的方法,其是通过施用本公开的人源化抗C1q抗体以,例如,抑制C1q和自身抗体的相互作用,例如抗-神经节苷脂自身抗体的相互作用,C1q和C1r的相互作用,和/或C1q和C1s的相互作用。

[0273] 组合治疗

[0274] 本公开的抗体可以,但不限于与任何神经退行性病症、炎性病症和/或自身免疫病症的其它治疗组合使用。

[0275] 在一些实施方案中,本公开的人源化抗C1q抗体以治疗的有效量与第二抗-补体因子抗体(例如中和性抗-补体因子抗体),例如抗C1s或抗C1r抗体,或第二抗C1q抗体组合施用。在一些实施方案中,本公开的人源化抗C1q抗体以治疗的有效量与第二和第三中和性抗-补体因子抗体,例如第二抗C1q抗体、抗C1s抗体、和/或抗C1r抗体组合施用。

[0276] 在一些实施方案中,本公开的人源化抗C1q抗体与抗体依赖细胞毒性(ADCC)抑制剂组合施用。ADCC抑制剂可以包括,但不限于:可溶性NK细胞抑制受体例如识别HLA-A、HLA-B或HLA-C的杀伤细胞Ig-样受体(KIRs)和识别HLA-E的C型凝集素CD94/NKG2A异二聚体(参见,例如,López-Botet M.,T.Bellón,M.Llano,F.Navarro,P.García&M.de Miguel.(2000),Paired inhibitory and triggering NK cell receptors for HLA class I molecules.Hum.Immunol.61:7-17;Lanier L.L.(1998)Follow the leader:NK cell receptors for classical and nonclassical MHC class I.Cell 92:705-707.)以及镧(参见,例如,Immunopharmacology 1990;Volume 20,Pages 73-8)。

[0277] 在一些实施方案中,本公开的人源化抗C1q抗体与补体活化的旁路途径抑制剂组合施用。这种抑制剂可以包括,但不限于:因子B阻断抗体;因子D阻断抗体;能阻断C3的切割的CD59、DAF、CR1、CR2、Crry或Comstatin-样肽的可溶、膜结合、加标签或融合蛋白形式;非肽C3aR拮抗剂例如SB 290157;眼睛蛇毒因子或非特异性补体抑制剂例如蔡莫司他甲磺酸盐(FUTHAN;FUT-175)、抑肽酶、K-76单羧酸(MX-1)和肝素(参见,例如,T.E.Mollnes&

M.Kirschfink, *Molecular Immunology* 43 (2006) 107-121)。在一些实施方案中,本公开的人源化抗C1q抗体和自身抗体与其自身抗原之间相互作用的抑制剂组合施用。这种抑制剂可以包括纯化的自身抗原的可溶形式,或者抗原模拟物例如肽或RNA衍生的模拟表位,包括AQP4抗原的模拟表位。或者,这种抑制剂可以包括识别自身抗原并防止自身抗体的结合,并且不引发经典补体途径的阻断试剂。这种阻断试剂可以包括,例如,自身抗原结合RNA适体或其Fc域缺乏功能性C1q结合位点的抗体(例如,Fab片段或者被另外工程化使之不结合C1q的抗体)。

#### [0278] 诊断应用

[0279] 本公开的人源化抗C1q抗体,或其功能性片段,还具有诊断用途。因此,本公开提供使用本公开的抗体或其功能性片段的方法,其用于诊断目的,例如检测个体中或来源于个体的组织样品中的C1q。在一些实施方案中,所述个体是人。在一些实施方案中,所述个体是患有神经退行性病症或炎性、或自身免疫疾病的人患者。在一些实施方案中,本公开的人源化抗C1q抗体用于检测突触和突触丢失。例如,在患有神经退行性病症例如阿尔茨海默病或青光眼的患者中可以测量到突触丢失。

[0280] 在一些实施方案中,诊断方法涉及给个体施用本公开的人源化抗C1q抗体或其功能性片段并检测与个体的突触结合的抗体的步骤。对与突触的结合抗体可以进行定量,例如通过非侵入性技术如正电子发射断层摄影术(PET)、X-射线计算机断层摄影术、单光子发射计算机断层摄影术(SPECT)、计算机断层摄影术(CT)和轴向计算机断层摄影术(CAT)。

[0281] 在一些实施方案中,诊断方法涉及检测生物样品,例如组织活检样本、组织或细胞中的突触。人源化抗C1q抗体或其功能性片段与生物样品接触并检测与突触结合的抗体。该检测方法可以涉及对与突触结合的抗体进行定量。生物样品中的抗体检测可以与本领域已知的任何方法一起进行,包括免疫荧光显微技术、免疫细胞化学、免疫组织化学、ELISA、FACS分析或免疫沉淀检测反应或微型正电子发射断层扫描方法。在某些实施方案中,抗体是放射性同位素标记的,例如用<sup>18</sup>F,并随后利用微型正电子发射断层扫描方法被检测。

[0282] 对与突触结合的抗体的定量提供对于个体中存在的突触数量的相对测量。典型地,突触在一段时间内被重复定量。突触定量的确切周期取决于许多因素,包括神经退行性疾病的性质、疾病发展的阶段、治疗方式和许多其它因素。重复测量通常反映出患有神经退行性病症的患者中进行性的突触丢失。或者,相对突触数量可以比较单个时间点患病个体群体和健康对照个体群体。在正在进行治疗的患病个体中,治疗的疗效可以通过比较接受治疗个体中的突触丢失速度和对照组中的突触丢失速度来评估。对照组成员不接受治疗或接收对照治疗,例如安慰剂对照。

#### [0283] 试剂盒

[0284] 本公开还提供含有本公开的人源化抗C1q抗体或其功能性片段的试剂盒。本公开的试剂盒包括一个或更多个容器,所述容器中含有纯化的本公开的人源化抗C1q抗体。在一些实施方案中,试剂盒进一步包括根据本公开的方法的使用说明。在一些实施方案中,这些说明包括根据本公开的任何方法施用人源化抗C1q抗体以治疗或诊断与补体活化有关的疾病的说明,所述疾病包括,但不限于神经退行性病症(例如阿尔茨海默病)、炎性疾病、自身免疫疾病和/或代谢性病症。在一些实施方案中,说明包括例如在个体中、在组织样品中或在细胞中如何检测C1q的说明。试剂盒可以进一步包括根据对个体是否患有疾病以及疾病

的阶段的鉴别来选择适合于治疗的个体的说明。

[0285] 说明通常包括关于预期治疗的剂量、给药方案和给药途径的信息。容器可以是单位剂量、大包装(例如多剂量包装)或亚单位剂量。本公开的试剂盒中提供的说明通常是在标签或包装说明书上的书面说明(例如试剂盒中包括的纸页),但机器可读的说明(例如存储磁盘或光盘上携带的说明)也是可接受的。

[0286] 标签或包装说明书表明组合物用于治疗,例如神经退行性疾病。说明被提供以用于实施本文所述的任何方法。

[0287] 本公开的试剂盒在适当的包装中。适当的包装包括,但不限于,小瓶、瓶、广口瓶、软包装(例如密封的聚酯薄膜(Mylar)或塑料袋)等。还涉及与特定装置,例如吸入器、鼻施用装置(例如喷雾器)或输液装置例如微型泵组合使用的包装。试剂盒可以具有无菌的存取口(例如容器可以是静脉溶液袋或小瓶,其具有可以被皮下注射针头刺穿的塞子)。容器也可以具有无菌的存取口(例如容器可以是静脉溶液袋或小瓶,其具有可以被皮下注射针头刺穿的塞子)。组合物中的至少一种活性剂是经典补体途径的抑制剂。容器可以进一步包括第二种药物活性剂。

[0288] 试剂盒可以任选地提供其他组分例如缓冲液和说明信息。通常,试剂盒包括容器以及在容器上的或者与容器有关的标签或包装说明书。

[0289] 通过参照下述实施例将更完全地理解本公开。然而,它们不应当被解释为以任何方式限制本公开的任何方面或范围。本公开中所有的引用在此明确地通过引用的方式合并入本文。

## 实施例

[0290] 实施例1:人源化抗C1q抗体的产生

[0291] 简介

[0292] 本实施例描述了由鼠类杂交瘤细胞M1(表达小鼠抗人C1q抗体M1)产生完全人源化抗体。使用编码所选择的人序列片段组合的人工合成的寡核苷酸产生合成的人抗体可变区基因。之后,将其克隆到编码人IgG4(S241P L248E)重链和人Kappa轻链的载体上。人源化抗体在NS0(小鼠骨髓瘤细胞系)细胞中被稳定的表达,进行蛋白A纯化,并使用竞争ELISA测定测试其与生物酰化鼠类M1抗体竞争结合人C1q。被选定的抗体还使用竞争ELISA测定测试其与生物酰化嵌合抗体竞争结合小鼠C1q。

[0293] 结果

[0294] 抗人C1q V区序列测定

[0295] 使用RNAqueousR-4PCR试剂盒(Ambion cat.no.AM1914),RNA从表达M1抗体的杂交瘤细胞沉淀中被提取出来。最初,使用鼠类信号序列的简并引物池和IgG和Ig $\kappa$ 两者的恒定区引物一起进行RT-PCR。重链V区RNA使用一组六个简并引物池(HA到HF)被扩增,并且轻链V区mRNA使用针对 $\kappa$ 簇的一组七个简并引物池(KA到KG)被扩增。

[0296] 对于VH区,所期望长度的扩增产物在IgG引物池HB和HE中被发现。对于V $\kappa$ 区,所期望长度的扩增产物在kappa引物池KC,KE和KG中被发现。由每个成功的扩增获得的PCR产物被纯化,并克隆到‘TA’克隆载体(pGEM-T Easy,Promega cat.no.A1360)中并测序。总共14个VH克隆和24个V $\kappa$ 克隆被测序。

[0297] 单个功能化VH基因从来自IgG池HB和HE的14个克隆中被鉴别。单个功能化Vκ基因序列从来自引物池KC的9个克隆中被鉴别。从IgG引物池获得的位于可变区下游的3' 编码序列与IgG抗体同种型一致。

[0298] 除VH序列起始的5个氨基酸以及Vκ序列起始的两个氨基酸外,功能化VH和Vκ基因序列与杂交瘤细胞序列相同。上述不同最可能是由于测序方法,以及使用了与信号序列简并的引物而非与V区5' 末端简并的引物造成的。

[0299] 功能化VH的氨基酸序列:

[0300]

**QVQLQQPGAELVKPGASVKLSCKSSGYHF~~TSYWMHWVKQRPGQGLEWIGVIHPNSG~~**  
**SINYNEKFESKATLTVDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCAGERDSTEVLPMDYWGQG**  
**TSVTVSS (SEQ ID NO: 21)**。VH的高变区(HVRs)用粗体和下划线描述。

[0301] 功能化Vκ的氨基酸序列:

[0302]

**DVQITQSPSYLAASPGETITINCRASKSINKYLAWYQEKP~~PGKTNKLLIYSGSTLQSGIPS~~**  
**RFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAMYYCQ~~QHNEYPLTFGAGTKLELK~~ (SEQ ID NO: 22)**。

Vκ的高变区(HVRs)用粗体和下划线描述。

[0303] 嵌合抗体的构建

[0304] 鼠类M1抗体的VH和Vκ序列使用引物被PCR扩增,所述引物引入用于克隆到IgG4(S241P L248E)重链和kappa链表达载体(图1)的旁侧限制性酶切位点。为了克隆基因,BamHI、HindIII和SspI限制性位点被从Vκ序列上移除。VH区使用MluI和HindIII位点被克隆,并且Vκ区使用BssHII和BamHI限制性位点被克隆。两种构建都通过测序被确认。

[0305] 合成的人可变区序列的设计

[0306] 为了鉴定V区可能对于抗体结合特性必不可少的重要的“约束”氨基酸,鼠类M1抗体的V区的结构模型使用SwissPDB被生成并进行分析。HVRs内所包含的大多数残基(根据Kabat和Chothia两者的定义)和若干框架残基一起被认为是重要的。M1的VH和Vκ序列包含典型的框架残基,并且HVR1、2和3基序与许多鼠类抗体可以相类比。

[0307] 从上述分析,认为M1的合成人序列可以使用HVRs外部的广泛存在的可供选择的残基来产生,但是却只能利用HVR序列中有限的可能的残基产生。初步分析表明,来自一些人抗体的对应序列片段可以结合以产生与鼠类序列中的那些相似或者相同的HVRs。对于HVRs外部或者旁侧的区,多个可供选择的人序列区段被鉴别为新的人源化V区的可能组成。

[0308] CD4<sup>+</sup>T细胞表位回避

[0309] 基于结构分析,可用于产生M1人源化变体的序列区段的大量的初步的组被选取并使用iTope<sup>TM</sup>技术被分析,以用于肽与人MHC类II等位基因结合的计算机模拟分析(Perry, LCA et al. Drugs R D. 2008;9(6):385-96),和使用已知抗体序列相关T细胞表位的TCED<sup>TM</sup>T细胞表位数据库(Bryson, CJ et al. BioDrugs. 2010 Feb 1;24(1):1-8)的计算机模拟分析。被鉴别为对人MHC类II是显著非人种系结合物的序列区段或者被评分为显著冲撞TCED<sup>TM</sup>的序列区段被丢弃。这导致区段的减少的组,并且这些区段的组合被再次分析(如上文所述),以确保区段之间的连接不包含潜在的T细胞表位。被选定的序列区段被组装进缺乏显著的T细胞表位的完整V区序列中。四个重链序列(VH1-VH4)和四个轻链序列(Vκ1-

V<sub>κ</sub>4) 随后被选取用于基因合成,在哺乳动物细胞内的表达以及活性测试。

[0310] 人源化重链和轻链可变域的序列

[0311] 使用标准技术,编码重链可变域 (VH) 和kappa轻链可变域 (V<sub>κ</sub>) 变体的氨基酸和核酸序列被确定。

[0312] 重链可变域变体1 (VH1) 的氨基酸序列是:

[0313]

**QVQLVQSGAELKKPGASVKVSCCKSS****GYHF****TSYWMH**WVKQAPGQGLEWIG**VIHPNSG**  
**SIN****YNEKFES****KATITVDKSTSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCAG****ERDSTEVL****PMDYWGQG**  
TSVTVSS (SEQ ID NO: 1)。VH1 的高变区 (HVRs) 用粗体和下划线描述。

[0314] 重链可变域变体2 (VH2) 的氨基酸序列是:

[0315]

**QVQLVQSGAELKKPGASVKVSCCKSS****GYHF****TSYWMH**WVKQAPGQGLEWIG**VIHPNSG**  
**SIN****YNEKFES****RATITVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAG****ERDSTEVL****PMDYWGQG**  
TTVTVSS (SEQ ID NO: 2)。VH2 的高变区 (HVRs) 用粗体和下划线描述。

[0316] 重链可变域变体3 (VH3) 的氨基酸序列是:

[0317]

**QVQLVQSGAELKKPGASVKVSCCKSS****GYHF****TSYWMH**WVKQAPGQGLEWIG**VIHPNSG**  
**SIN****YNEKFES****RVTITVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAG****ERDSTEVL****PMDYWGQG**  
TTVTVSS (SEQ ID NO: 3)。VH3 的高变区 (HVRs) 用粗体和下划线描述。

[0318] 重链可变域变体4 (VH4) 的氨基酸序列是:

[0319]

**QVQLVQSGAELKKPGASVKVSCCKSS****GYHF****TSYWMH**WVRQAPGQGLEWIG**VIHPNSG**  
**SIN****YNEKFES****RVTITVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAG****ERDSTEVL****PMDYWGQG**  
TTVTVSS (SEQ ID NO: 4)。VH4 的高变区 (HVRs) 用粗体和下划线描述。

[0320] 在一些实施方案中,VH1、VH2、VH3或VH4中任意一个的HVR-H1具有序列GYHF**TSYWMH** (SEQ ID NO: 23), VH1、VH2、VH3或VH4中任意一个的HVR-H2具有序列**VIHPNSGSIN****YNEKFES** (SEQ ID NO: 24), 并且VH1、VH2、VH3或VH4中任意一个的HVR-H3具有序列**ERDSTEVL****PMDY** (SEQ ID NO: 25)。

[0321] 编码重链可变域变体1 (VH1) 的核酸序列是:

[0322]

CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCAGGGGCTGAGCTGAAGAAGCCTGGGGCTTCAGTGAAGGTTTCCTGCAAGTCTTCTGG  
CTACCATTTACCAGCTACTGGATGCACTGGGTGAAGCAGGCCCTGGACAAGGCCTTGAGTGGATTGGAGTGATTC  
ATCCTAATAGTGGTAGTATTAACAATGAGAAGTTCGAGAGCAAGGCCACAATTACTGTAGACAAATCCACCAGC  
ACAGCCTACATGCAACTCAGCAGCCTGACATCTGAGGACTCGGCGGTCTATTATTGTGCAGGAGAGAGAGATTCTAC  
GGAGGTTCTCCCTATGGACTACTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCA (SEQ ID NO: 26)。

[0323] 编码重链可变域变体2 (VH2) 的核酸序列是:

[0324]

CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCAGGGGCTGAGCTGAAGAAGCCTGGGGCTTCAGTGAAGGTTTCCTGCAAGTCTTCTGG  
CTACCATTTACCAGCTACTGGATGCACTGGGTGAAGCAGGCCCTGGACAAGGCCTTGAGTGGATTGGAGTGATTC  
ATCCTAATAGTGGTAGTATTAACAATGAGAAGTTCGAGAGCAGAGCCACAATTACTGTAGACAAATCCACCAGC

ACAGCCTACATGGAGCTCAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCGGTCTATTATTGTGCAGGAGAGAGATTCTAC  
GGAGGTTCTCCCTATGGACTACTGGGGTCAAGGAACCACGGTCACCGTCTCCTCA (SEQ ID NO: 27)。

[0325] 编码重链可变域变体3 (VH3) 的核酸序列是：

[0326]

CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCAGGGGCTGAGCTGAAGAAGCCTGGGGCTTCAGTGAAGGTTTCCTGCAAGTCTTCTGG  
CTACCATTTACCAGCTACTGGATGCACTGGGTGAAGCAGGCCCTGGACAAGGCCTTGAGTGGATTGGAGTGATTC  
ATCCTAATAGTGGTAGTATTAACAATGAGAAGTTCGAGAGCAGAGTCACAATTACTGTAGACAAATCCACCAGC  
ACAGCCTACATGGAGCTCAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCGGTCTATTATTGTGCAGGAGAGAGATTCTAC  
GGAGGTTCTCCCTATGGACTACTGGGGTCAAGGAACCACGGTCACCGTCTCCTCAG (SEQ ID NO: 28)。

[0327] 编码重链可变域变体4 (VH4) 的核酸序列是：

[0328]

CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCAGGGGCTGAGCTGAAGAAGCCTGGGGCTTCAGTGAAGGTTTCCTGCAAGTCTTCTGG  
CTACCATTTACCAGCTACTGGATGCACTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGCCTTGAGTGGATTGGAGTGATTC  
ATCCTAATAGTGGTAGTATTAACAATGAGAAGTTCGAGAGCAGAGTCACAATTACTGTAGACAAATCCACCAGC  
ACAGCCTACATGGAGCTCAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCGGTCTATTATTGTGCAGGAGAGAGATTCTAC  
GGAGGTTCTCCCTATGGACTACTGGGGTCAAGGAACCACGGTCACCGTCTCCTCA (SEQ ID NO: 29)。

[0329] Kappa轻链可变域变体1 (Vκ1) 的氨基酸序列是：

[0330]

DVQITQSPSYLAASLGERATINCR**RASKSINKYLA**WYQQKPGKTNKLLIY**SGSTLQSG**GIPA  
RFSGSGSGTDFLT**ISSLEPEDFAMYYCQQHNEYPLT**FGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 5)。

Vκ1 的高变区 (HVRs) 用粗体和下划线描述。

[0331] Kappa轻链可变域变体2 (Vκ2) 的氨基酸序列是：

[0332]

DVQITQSPSSLSASLGERATINCR**RASKSINKYLA**WYQQKPGKANKLLIY**SGSTLQSG**GIPA  
RFSGSGSGTDFLT**ISSLEPEDFAMYYCQQHNEYPLT**FGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 6)。

Vκ2 的高变区 (HVRs) 用粗体和下划线描述。

[0333] Kappa轻链可变域变体3 (Vκ3) 的氨基酸序列是：

[0334]

DVQITQSPSSLSASLGERATINCR**RASKSINKYLA**WYQQKPGKAPKLLIY**SGSTLQSG**GIPA  
RFSGSGSGTDFLT**ISSLEPEDFAMYYCQQHNEYPLT**FGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 7)。

Vκ3 的高变区 (HVRs) 用粗体和下划线描述。

[0335] Kappa轻链可变域变体4 (Vκ4) 的氨基酸序列是：

[0336]

DIQLTQSPSSLSASLGERATINCR**RASKSINKYLA**WYQQKPGKAPKLLIY**SGSTLQSG**GIPA  
RFSGSGSGTDFLT**ISSLEPEDFAMYYCQQHNEYPLT**FGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 8)。

Vκ4 的高变区 (HVRs) 用粗体和下划线描述。

[0337] 在一些实施方案中, Vκ1、Vκ2、Vκ3或Vκ4中任意一个的HVR-L1具有序列RASKSINKYLA (SEQ ID NO: 30), Vκ1、Vκ2、Vκ3或Vκ4中任意一个的HVR-L2具有序列SGSTLQS (SEQ ID NO: 31), 并且Vκ1、Vκ2、Vκ3或Vκ4中任意一个的HVR-L3具有序列QQHNEYPLT (SEQ ID NO: 32)。

[0338] 编码kappa轻链可变域变体1 (V $\kappa$ 1) 的核酸序列是:

[0339]

GATGTCCAGATCACACAGTCTCCATCTTATCTTGCTGCATCTCTCGGAGAAAGAGCTACTATTAATTGCAGGGCAAG  
TAAGAGCATTAAACAAATACTTAGCCTGGTATCAACAGAAACCTGGGAAAACATAAAGCTCCTTATCTACTCTGGCT  
CCACTTTGCAATCTGGAATTCAGCAAGGTTTCAGTGGCAGTGGATCTGGTACAGATTTCACTCTCACCATCAGTAGC  
CTGGAGCCTGAAGATTTTGCAATGTATTACTGTCAACAACATAATGAATACCCGCTCACGTTTCGGTCAGGGGACCAA  
GCTGGAGATCAAA (SEQ ID NO:33)。

[0340] 编码kappa轻链可变域变体2 (V $\kappa$ 2) 的核酸序列是:

[0341]

GATGTCCAGATCACACAGTCTCCATCTTCCCTTTCTGCATCTCTCGGAGAAAGAGCTACTATTAATTGCAGGGCAAG  
TAAGAGCATTAAACAAATACTTAGCCTGGTATCAACAGAAACCTGGGAAAGCTAATAAGCTCCTTATCTACTCTGGCT  
CCACTTTGCAATCTGGAATTCAGCAAGGTTTCAGTGGCAGTGGATCTGGTACAGATTTCACTCTCACCATCAGTAGC  
CTGGAGCCTGAAGATTTTGCAATGTATTACTGTCAACAACATAATGAATACCCGCTCACGTTTCGGTCAGGGGACCAA  
GCTGGAGATCAAA (SEQ ID NO:34)。

[0342] 编码kappa轻链可变域变体3 (V $\kappa$ 3) 的核酸序列是:

[0343]

GATGTCCAGATCACACAGTCTCCATCTTCCCTTTCTGCATCTCTCGGAGAAAGAGCTACTATTAATTGCAGGGCAAG  
TAAGAGCATTAAACAAATACTTAGCCTGGTATCAACAGAAACCTGGGAAAGCTCCTAAGCTCCTTATCTACTCTGGCT  
CCACTTTGCAATCTGGAATTCAGCAAGGTTTCAGTGGCAGTGGATCTGGTACAGATTTCACTCTCACCATCAGTAGC  
CTGGAGCCTGAAGATTTTGCAATGTATTACTGTCAACAACATAATGAATACCCGCTCACGTTTCGGTCAGGGGACCAA  
GCTGGAGATCAAA (SEQ ID NO:35)。

[0344] 编码kappa轻链可变域变体4 (V $\kappa$ 4) 的核酸序列是:

[0345]

GATATTCAGCTCACACAGTCTCCATCTTCCCTTTCTGCATCTCTCGGAGAAAGAGCTACTATTAATTGCAGGGCAAG  
TAAGAGCATTAAACAAATACTTAGCCTGGTATCAACAGAAACCTGGGAAAGCTCCTAAGCTCCTTATCTACTCTGGCT  
CCACTTTGCAATCTGGAATTCAGCAAGGTTTCAGTGGCAGTGGATCTGGTACAGATTTCACTCTCACCATCAGTAGC  
CTGGAGCCTGAAGATTTTGCAATGTATTACTGTCAACAACATAATGAATACCCGCTCACGTTTCGGTCAGGGGACCAA  
GCTGGAGATCAAA (SEQ ID NO:36)。

[0346] 人IgG4 (S241P L248E) 重链恒定域序列

[0347] 使用标准技术, 编码人IgG4 (S241P L248E) 重链恒定域 (即, CH1、CH2、CH3和铰链区) 的氨基酸和核酸序列被确定。

[0348] 人IgG4 (S241P L248E) 重链恒定域的氨基酸序列是:

[0349]

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS  
GLYSLSSVVTVPSSSLGKTYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPPCP**P**CPAPEF**E**GGPSV  
FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNS  
TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEE  
MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSR  
WQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK (SEQ ID NO: 37)。S241P 突变和 L248E  
突变用粗体和下划线描述。

[0350] 人IgG4 (S241P L248E) CH1的氨基酸序列是：

[0351]

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLG  
TKTYTCNVDPKPSNTKVDKRV (SEQ ID NO:38)。

[0352]

人IgG4 (S241P L248E) 较链区的氨基酸序列是：ESKYGPPCPPCP (SEQ ID NO: 39)。

S241P 突变用粗体和下划线描述。

[0353] 人IgG4 (S241P L248E) CH2的氨基酸序列是：

[0354]

APEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDPEVQFNWYVDGVEVHNAK  
TKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAK (SEQ ID  
NO: 40)。L248E 突变用粗体和下划线描述。

[0355] 人IgG4 (S241P L248E) CH3的氨基酸序列是：

[0356]

GQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRW  
QEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLK (SEQ ID NO:41)。

[0357] 编码人IgG4 (S241P L248E) 重链恒定域的核酸序列是：

[0358]

GTAAGCTTTCTGGGGCAGGCCGGCCTGACTTTGGCTGGGGGCAGGGAGGGGGCTAAGGTGACGCAGGTGGCGCCAG  
CCAGGTGCACACCCAATGCCCATGAGCCCAGACACTGGACCCTGCATGGACCATCGCGGATAGACAAGAACCGAGGG  
GCCTCTGCGCCCTGGGCCAGCTCTGTCCACACCCGCGGTACATGGCACCACCTCTCTTGCAGCTTCCACCAAGGG  
CCCATCCGTCTTCCCCCTGGCGCCCTGCTCCAGGAGCACCTCCGAGAGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGG  
ACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTC  
CTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACGAAGACCTACAC  
CTGCAATGTAGATACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGGTGAGAGGCCAGCACAGGGAGGGAGGG  
TGTCTGCTGGAAGCCAGGCTCAGCCCTCCTGCCTGGACGCACCCCGGCTGTGCAGCCCCAGCCCAGGGCAGCAAGGC  
AGGCCCATCTGTCTCCTCACCTGGAGGCTCTGACCACCCCACTCATGCTCAGGGAGAGGGTCTTCTGGATTTTTC  
CACCAGGCTCCGGGCAGCCACAGGCTGGATGCCCTACCCAGGCCCTGCGCATAACAGGGCAGGTGCTGCGCTCAG  
ACCTGCCAAGAGCCATATCCGGGAGGACCCTGCCCTGACCTAAGCCCACCCAAAGGCCAACTCTCCACTCCCTC  
AGCTCAGACACCTTCTCTCCTCCAGATCTGAGTAACTCCCAATCTTCTCTCTGCAGAGTCCAAATATGGTCCCCCA  
TGCCACCATGCCCAGGTAAGCCAACCCAGGCTCGCCCTCCAGCTCAAGGCGGACAGGTGCCCTAGAGTAGCCTG  
CATCCAGGGACAGGCCCCAGCCGGGTGCTGACGCATCCACCTCCATCTCTTCCCTCAGCACCTGAGTTCGAGGGGGGA  
CCATCAGTCTTCTGTTCCCCCAAAACCAAGGACACTCTCATGATCTCCCGACCCCTGAGGTACGTGCGTGGT  
GGTGGACGTGAGCCAGGAAGACCCCGAGGTCCAGTTCAACTGGTACGTGGATGGCGTGAGGTGCATAATGCCAAGA  
CAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTTCAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCCTCACCGTCTGCACCAGGACTGGCTG  
AACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGGCCTCCCGTCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGCCAA  
AGGTGGGACCCACGGGTGCGAGGGCCACATGGACAGAGGTGAGCTCGGCCACCCCTCTGCCCTGGGAGTGACCGCT  
GTGCCAACCTCTGTCCCTACAGGGCAGCCCCGAGAGCCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCCAGGAGGAGATGAC  
CAAGAACCAGGTGACCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTACCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATG



GGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTCCTCTACAGCAGGCTA  
ACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGGAGGGGAATGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTA  
CACACAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCTGGGTAAA (SEQ ID NO:42)。

[0359] 编码人IgG4 (S241P L248E) 重链CH1的核酸序列是：

[0360]

CTTCCACCAAGGGCCCATCCGTCTTCCCCCTGGCGCCCTGCTCCAGGAGCACCTCCGAGAGCACAGCCGCCCTGGGC  
TGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCGAACCGGTGACGGTGTGCTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACAC  
CTTCCCGGTGTCTTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCA  
CGAAGACCTACACCTGCAATGTAGATCACAAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTG (SEQ ID NO:  
43)。

[0361] 编码人IgG4 (S241P L248E) 重链铰链的核酸序列是：

[0362] AGTCCAAATATGGTCCCCCATGCCACCATGCCAG (SEQ ID NO:44)。

[0363] 编码人IgG4 (S241P L248E) 重链CH2的核酸序列是：

[0364]

CACCTGAGTTCGAGGGGGACCATCAGTCTTCTGTTCCTTCCCCAAAACCAAGGACACTCTCATGATCTCCCGGACC  
CCTGAGGTACGTGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCAGGAAGACCCCGAGGTCCAGTTCAACTGGTACGTGGATGGCGT  
GGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTTC AACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCG  
TCCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGGCCTCCCGTCTCCATCGAG  
AAAACCATCTCCAAAGCCAAAG (SEQ ID NO:45)。

[0365] 编码人IgG4 (S241P L248E) 重链CH3的核酸序列是：

[0366]

GGCAGCCCCGAGAGCCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCCAGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACC  
TGCCTGGTCAAAGGCTTCTACCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTAAA  
GACCACGCCTCCCGTGTGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAGGCTAACCGTGGACAAGAGCAGGTGGC  
AGGAGGGGAATGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACACAGAAGAGCCTCTCCCTG  
TCTCTGGGTAAA (SEQ ID NO:46)。

[0367] 图2示出M1的重链可变区 (VH) 的氨基酸序列和人源化VH变体VH1-VH4的氨基酸序  
列的序列对比,以及M1的kappa轻链可变域 (Vk) 氨基酸序列和人源化Vk变体Vk1-Vk4的氨  
基酸序列的序列对比。

[0368] 合成的人抗体变体的构建

[0369] 使用一系列重叠寡核苷酸合成M1所有变体VH和Vk区基因,所述重叠寡核苷酸经过  
退火、连接和PCR扩增,以获得移除任何限制性位点的全长合成V区。然后,组装的变体被直  
接克隆到IgG4 (S241P L248E) 重链和kappa轻链的pANT表达载体系统中 (图1)。VH区使用  
MluI和HindIII位点被克隆,并且Vk区使用BssHII和BamHI限制性位点被克隆。所有的构建  
都通过测序被确认。

[0370] 抗体的表达和纯化

[0371] 共计16个完全人源化抗体经由电穿孔被平稳地转染到NS0细胞中。此外,嵌合抗体  
M1和两个对照—具有变体Vk1的嵌合VH (ChVH) 以及具有嵌合Vk (ChVk) 的变体VH1,被包括。  
稳定转染子使用200nM的氨甲蝶呤 (Sigma Cat.No.M8407) 被筛选。对于每个构建的氨甲蝶

吟耐受的群落使用IgG4ELISA测定IgG表达水平,并且最好的表达系将被选取,扩大并冻存于液氮中。对于全部的16个人源化M1变体以及嵌合M1、ChVH/V $\kappa$ 1和VH1/ChV $\kappa$ 抗体,成功的转染和稳定的克隆选择都被实现。每个细胞系的鉴别都通过对来自基因组的DNA的可变域进行DNA测序而被确认。

[0372] 在蛋白A琼脂糖凝胶柱(GE Healthcare cat.co.110034-93)上,抗体纯化自细胞培养上清液,缓冲交换至PBS,pH 7.4,并且使用基于预测的氨基酸序列的消光系数,通过OD<sub>280nm</sub>定量。嵌合变体和人源化变体IgGs通过还原性SDS-PAGE而被分析。对应于VH和V $\kappa$ 链的预测大小的条带被观测到,没有任何聚集、降解或者其他不寻常特征迹象(图3)。

[0373] 针对人C1q抗原的竞争ELISA

[0374] 人源化M1变体与人C1q的结合通过竞争ELISA被分析。一系列三倍稀释的测试抗体(5 $\mu$ g/ml到0.002 $\mu$ g/ml)被预先与恒定浓度的生物酰化的小鼠M1抗体(最终浓度0.02 $\mu$ g/ml)混合,之后,在预先涂覆有1.0 $\mu$ g/ml的人C1q的平板上37 $^{\circ}$ C震荡孵育1小时。小鼠M1抗体的结合通过链霉亲和素-过氧化物酶共轭物(Sigma-Aldrich cat.no.S5512)和TMB(3,3',5,5'-四甲基联苯胺)底物(Thermo Scientific cat.no.34029)而被检测。反应在1M HCl下停止,吸光度在450nm从Dynex Technologies MRX TC II光吸收酶标仪读取,并且绘制结合曲线。

[0375] 图4示出产生的全部人源化M1变体对嵌合M1抗体具有相似的结合曲线图。结合曲线被用于计算每个抗体的以嵌合M1的IC<sub>50</sub>标准化后的IC<sub>50</sub>值(阻碍标记的竞争者结合达50%的测试抗体的浓度),并且由NS0转染子的抗体产率也被比较(表1)。

[0376] 表1:结合人C1q的相对IC<sub>50</sub>值和蛋白质的表达水平

[0377]

抗体	相对IC <sub>50</sub>	表达水平( $\mu$ g/ml)
嵌合M1	1.00	12.6
ChV1/V $\kappa$ 1	1.09	7.0
VH1/ChV $\kappa$	0.92	11.9
VH1/V $\kappa$ 1	0.90	14.0
VH1/V $\kappa$ 2	0.84	14.5
VH1/V $\kappa$ 3	0.91	28.9
VH1/V $\kappa$ 4	0.80	22.6
VH2/V $\kappa$ 1	1.15	1.4
VH2/V $\kappa$ 2	1.12	3.8
VH2/V $\kappa$ 3	0.75	21.3
VH2/V $\kappa$ 4	0.72	6.1
VH3/V $\kappa$ 1	0.65	16.9
VH3/V $\kappa$ 2	0.82	8.7
VH3/V $\kappa$ 3	0.63	19.8
VH3/V $\kappa$ 4	0.83	32.2
VH4/V $\kappa$ 1	1.03	8.5
VH4/V $\kappa$ 2	0.84	1.6
VH4/V $\kappa$ 3	0.77	18.3

VH4/V $\kappa$ 4	0.92	2.4
------------------	------	-----

[0378] 表1示出人源化M1变体与人C1q结合的计算相对IC<sub>50</sub>值以及对应的NS0细胞系的蛋白质表达水平。

[0379] 测试的全部变体的标准化IC<sub>50</sub>数据都在0.63到1.15的范围内,表明所有完全人源化的M1抗体对人C1q的结合效率与嵌合M1对人C1q的结合效率是相当的。此外,相比于嵌合抗体,大多数人源化变体在表达水平上取得了增加。

[0380] 针对小鼠C1q抗原的竞争ELISA

[0381] 人源化M1变体与小鼠C1q的结合通过对四个选取的抗体VH1/V $\kappa$ 1、VH3/V $\kappa$ 3、VH3/V $\kappa$ 4和VH4/V $\kappa$ 3进行竞争ELISA而被分析。不相关的IgG4 (S241P L248E) 抗体也被包含作为结合参照。一系列三倍稀释的测试抗体 (100 $\mu$ g/ml到0.046 $\mu$ g/ml) 被预先与恒定浓度的生物酰化的嵌合M1抗体 (最终浓度0.03 $\mu$ g/ml) 混合,之后,在预先涂覆有5.0 $\mu$ g/ml的小鼠C1q的平板上37 $^{\circ}$ C震荡孵育1小时。嵌合M1抗体的结合通过链霉亲和素-过氧化物酶共轭物 (Sigma-Aldrich cat.no.S5512) 和TMB底物 (Thermo Scientific cat.no.34029) 而被检测。反应在1M HCl下停止,吸光度在450nm从Dynex Technologies MRX TC II光吸收酶标仪读取,并且绘制结合曲线。

[0382] 图5示出产生的人源化M1变体对嵌合M1抗体具有相似的结合曲线图。结合曲线被用于计算每个抗体的以嵌合M1的IC<sub>50</sub>标准化后的IC<sub>50</sub>值 (表2)。

[0383] 表2:结合小鼠C1q的相对IC<sub>50</sub>值

[0384]

抗体	相对IC <sub>50</sub>
嵌合M1	1.00
VH1/V $\kappa$ 1	1.62
VH3/V $\kappa$ 3	1.50
VH3/V $\kappa$ 4	1.91
VH4/V $\kappa$ 3	1.84

[0385] 表2示出人源化M1变体与小鼠C1q结合的计算相对IC<sub>50</sub>值。

[0386] 结论

[0387] 来自鼠类抗体M1的V区基因被克隆到载体中,以产生包括与人IgG4 (S241P L248E) 重链恒定区和 $\kappa$ 轻链恒定区结合的鼠类V区的嵌合抗体。此外,IgG4 (S241P L248E) 的一系列的四个人源化VH区和四个人源化V $\kappa$ 区被设计和构建。

[0388] 嵌合抗体和人源化V区基因的组合 (共计16个抗体) 在NS0细胞中被表达,被纯化,并在竞争ELISA测定中被测试与人C1q的结合。结合数据 (表1) 被用于在与嵌合M1抗体比较时,对人源化M1变体进行排序。通过SDS-PAGE并未检测到重链和轻链条带的质量存在显著的不同。

[0389] 实施例2:人源化抗C1q抗体VH3/V $\kappa$ 3的动力学表征

[0390] 简介

[0391] 能实时测量抗原抗体复合物结合和解离的免疫学生物传感器,例如Biacore<sup>TM</sup>表面等离子共振 (SPR) 仪,使得阐明结合的动力学可以实现。解离的速率以及其后续的优化对生物制药抗体的发展是特别重要的。

[0392] 所述生物传感器使用SPR实时监测表面束缚的分子“配体”和其溶液中的结合配偶体“分析物”之间的相互作用。SPR是电子电荷密度波现象,在全内放射的条件下当光在金属层反射时,则在金属层表面发生SPR。产生的表面等离子对于位于反射光的金属层的相对侧的介质的折射率的任何变化都敏感。发生在表面的蛋白质-蛋白质相互作用影响介质的折射率,因而可以被检测到。分子与配体修饰的传感器表面结合产生一个与结合的质量成比例的响应,从而使结合的分析物的数量的微小变化被检测到(下至皮克级)。该技术可被用于测量 $10^{-6}\text{M}$ 到 $10^{-12}\text{M}$ 范围内的亲和力常数( $K_D$ ),  $10^3\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ 到 $10^7\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ 之间的结合速率常数( $k_a$ )和 $10^{-1}\text{s}^{-1}$ 到 $10^{-6}\text{s}^{-1}$ 之间的解离速率常数( $k_d$ )。

[0393] 该技术只需要少量的材料,并且相互作用的生物分子两者都可以以无标记形式使用。然而实验设计是重要的,因为技术的一些特征,和蛋白质中的一种必须被表面连接这一事实,可以导致误导的结果(Huber and Mueller, Curr Pharm Des. 2006;12(31):3999-4021;和Lakey and Raggett, Curr Opin Struct Biol., 1998.8(1):p.119-123)。

[0394] 本实施例描述了利用高分辨率的Biacore T200表面等离子共振仪进行人源化抗C1q抗体VH3/V $\kappa$ 3 (Fab片段和全长IgG两者)和C1q蛋白之间的相互作用的动力学表征。

[0395] 材料和方法

[0396] 样品

[0397] 本实施例使用的试剂在表3中列出。

[0398] 表3:样品

[0399]

样品	体积及浓度 (mg/ml)
IgG-VH3/V $\kappa$ 3	400 $\mu$ l, 1.2mg/ml
Fab-VH3/V $\kappa$ 3	450 $\mu$ l, 0.3mg/ml
小鼠C1q	4 x 50 $\mu$ l, 1.0mg/ml
人C1q	10 x 50 $\mu$ l, 1.0mg/ml

[0400] 小鼠和人C1q在 $-80^\circ\text{C}$ 储存,一旦解冻后在 $+4^\circ\text{C}$ 储存。Fab和IgG VH3/V $\kappa$ 3在 $+4^\circ\text{C}$ 储存。一旦稀释后,C1q溶液在冰上保存,并在24小时内使用。

[0401] 仪器设备

[0402] 使用运行Biacore T200评估软件V1.1(Uppsala, Sweden)的Biacore T200仪器(SN:CN 12231)。

[0403] 材料

[0404] 下列材料从Biacore获得,如下所示:

Biacore Preventative Maintenance 试剂盒 2: BR-1006-51, Lot No. 164110

Series S CM5 传感器芯片: BR-1006-68, Lot No. 10102398

[0405] 氨基偶联试剂盒: BR-1000-50, Lot No. 2027942/41

10 mM 乙酸盐 pH 5.0: BR-1003-51, Lot No. 21702813

HBS-EP 电泳缓冲液: BR-1006-69, Lot No. 2027942/59

[0406] BSA从Sigma (A3294) 获得。

[0407] 流程

[0408] 所有的实验都通过Biacore “wizard” 软件而实施。下列Biacore方法被使用:

[0409] 固定

[0410] 动力学/亲和力

[0411] 解除吸附和清洁

[0412] 结果

[0413] VH3/Vκ3 Fab制备

[0414] 抗C1q人源化抗体VH3/Vκ3的Fab片段是根据生产商的流程使用Fab微制备试剂盒制备。全长IgG VH3/Vκ3的起始浓度是1.88mg/ml。为了获得足够量的Fab片段,6个反应的每个225μg的全长IgG被酶切、合并和纯化。纯化的Fab和全长IgG通过使用Superdex 200 Increase 10/300GL柱(GE Healthcare Cat.No.28-9909-44)及1x PBS运行缓冲液的体积排阻色谱被进一步纯化。使用基于预测的氨基酸序列的消光系数( $E_{C(0.1\%)}$ ) (对于IgG VH3/Vκ3,  $E_{C(0.1\%)} = 1.45$ , 对于Fab VH3/Vκ3,  $E_{C(0.1\%)} = 1.4$ ), 样品通过OD<sub>280nm</sub>被定量。两个样品都通过非还原和还原SDS-PAGE进行分析(图6)。图6描绘凝胶过滤纯化抗体的考马斯亮蓝染色的SDS-PAGE胶图。1μg的每个样品被加载到NuPage 4-12% Bis-Tris凝胶(Invitrogen Cat.No.NP0322BOX)中并在200V电压下运行35min。尺寸标记(M)是标准Fermentas PageRuler Plus预染蛋白(Cat.No.SM1811)。通路1示出还原的VH3/Vκ3Fab;通路2示出非还原的VH3/Vκ3 Fab;通路3示出还原的VH3/Vκ3 IgG;通路4示出非还原的VH3/Vκ3 IgG。

[0415] 抗原制备

[0416] 小鼠C1q(mC1q)和人C1q(hC1q)抗原的样品在-80℃储存,并且在最初解冻时,分装成多个小份,重新冻藏于-80℃。分析物被进一步稀释于HBS-EP(10mM HEPES pH 7.4和150mM NaCl,3mM EDTA和0.05%(v/v)P20)用于进行动力学运行。

[0417] 仪器准备

[0418] 在本研究中,系统检查(Biacore Preventative Maintenance试剂盒2)会在运行任何样品之前进行。所有检测的系统都通过检查(药剂泵、折光计、注射器、噪声、混合和缓冲液转换器)表明生产商对仪器进行了标准设置。

[0419] 系统准备

[0420] 当插入CM5芯片,系统做好准备,然后用BIA标准化溶液(Biacore Preventative Maintenance试剂盒2)进行标准化。所有的样品用样品架上在10℃孵育,在25℃运行。芯片被加入具有作为运行缓冲液的HBS-Ep的系统中;在固定之前,芯片表面用50mM NaOH两次注射,以做好准备

[0421] 固定条件

[0422] 由于担心稳定性,两个芯片被制备;一个芯片以hC1q和mC1q(芯片A11)作为配体,一个芯片以IgG和Fab(芯片A13)作为配体。对m/hC1q的固定,在pH5.5的10mM的醋酸盐缓冲液中,蛋白质浓度为5μg/ml下进行的,而IgG和Fab的固定在pH5.0的10mM的醋酸盐缓冲液中,在蛋白质浓度为0.5-2μg/ml下进行的,两者都在CM5 Series S传感器芯片(Biacore)上进行。用于动力学分析的对芯片A11和A13的最终响应水平如表4所示。

[0423] 表4:最终响应水平(RU)

	F <sub>c1</sub>	F <sub>c2</sub>	F <sub>c3</sub>	F <sub>c4</sub>
[0424] A11	空白	hC1q 808.3	mC1q 801.3	mC1q 824.1
A13	空白	Fab 10.4	IgG 12.8	IgG 51.9

[0425] 表4描述了对于每个流通池(F<sub>c</sub>),由芯片A11和A13所获得的最终固化水平。

[0426] 对于动力学实验,固化的/捕捉的配体的数量需要被限制,以避免芯片表面的质量传递效应,并且表面应该理想地具有100-150效应单位(RUs)的分析物最大结合响应(R<sub>max</sub>)。因而,固化的配体的数量可使用等式1计算:

$$[0427] \text{分析物结合能力(RU)} = \frac{\text{分析物}M_w}{\text{配体}M_w} \times \text{固化的配体(RU)} \times S_m$$

[0428] 采用的mC1q和hC1q两者的平均MW是410kDa(文献和试剂制造商),采用的IgG是150kDa(对抗体的估计值),采用的Fab是50kDa(估计值)。为了R<sub>max</sub>是100RU以及化学计量(S<sub>m</sub>)是1的目标,C1q固定的理想目标量将是约820RUs。由于担心Fab和IgG固化表面的亲和力,固化配体的量保持尽可能低(在Biacore固化软件中为10RUs的限定)。

[0429] 非特异性结合控制

[0430] 非特异性结合可能是由于分析物或者分析物中的杂质,与配体(非特异性且难以检测)、捕获蛋白或感应器芯片表面的相互作用。在相对高浓度(500nM)的mC1q和hC1q两者注射300秒后,分析空白F<sub>c1</sub>表面时,会观测到显著的非特异性结合(NSB)。因而,附加的50μg/ml BSA(10mM醋酸盐,pH4.25)的后配体固化的阻断步骤也被包括(Moore et al., MAbs. 2010Mar-Apr; 2(2):181-9)。BSA阻断步骤也在参照通道F<sub>c1</sub>中重复进行;对于两者,固化水平在~8000RU。使用500nM的Fab或者IgG,在CM5表面未观察到NSB,并且在动力学运行使用的浓度下,BSA阻断表面未看到NSB。

[0431] 再生侦察

[0432] 当需要时,单次注射或者两次连续的30秒注射1M NaCl/50mM NaOH被用于再生全部的表面。在最后一次再生注射后,引入180秒的等待步骤,使表面在下一个结合循环开始前稳定。

[0433] 表面性能

[0434] 表面性能通过在动力学运行的起始、中间以及结束时,分析仪的重复控制注射而分析。在动力学运行全程中,典型地观察到稳定的结合,强调系统对动力学分析适应性。

[0435] 质量转移控制

[0436] 当结合速率包含与向芯片表面和从芯片表面转运分析物的速率有关的重要部分时,质量转运极限产生。当质量转移被发现很显著时,所获得的动力学分析可能会不准确。降低固定的配体的密度,或者增加流体速率可以减少质量转运极限。根据之前的使用低密度表面和相似的MW的抗原的经验,本研究选取了40μL/min的流体速率。

[0437] 连接反应控制

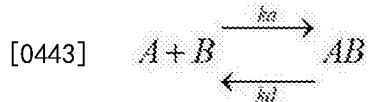
[0438] 连接反应控制实验被用来评估配体-分析物相互作用以检测从1对1结合模型的偏差。分析物以不同的时间段(接触时间)被注射到表面,并且解离速率被分析以确定其是否随接触时间而变化。如果观察到这样的关系,则表明在初始结合事件发生后,第二相互作用事件发生,从而导致在表面的稳定的复合体。

[0439] 如果抗体被用作配体,与单个hC1q结合两个抗体相关的亲和力可以被预料到。因而,连接反应控制被实施以向更复杂的数据分析模型提供支持证据。

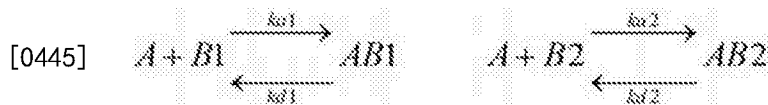
[0440] 动力学分析

[0441] 1:1结合的模型最初被假定用于全部的配体/复合物相互作用(参见等式2)。由于配体活性和基线的漂移(BSA阻断的表面),参数 $R_{max}$ 被设定为局域的,以区别于对选定的动力学分析的全局分析。如果需要,另外的模型,例如非均相配体(参见等式3)和二价结合(参见等式4),也被用于合适的评估。

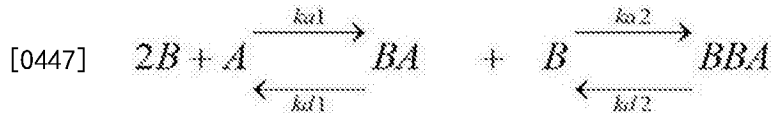
[0442] 等式2:1对1结合



[0444] 等式3:非均相配体



[0446] 等式4:二价(亲和力)



[0448] 抗体表征

[0449] 基于对亲和力的考虑(即两种固定的抗体结合C1q),两种C1q复合物都被固定,并且使用mC1q观测到很高水平的NSB,对CM5表面较小程度的hC1q(电荷介导的估计的C1q:pI 8-9)。由于C1q复合物稳定性和再生条件的不确定性,单循环动力学(SCK)最初被用来获得预测的动力学常数。完整的动力学分析在SCK后进行。在动力学运行期间,配体稳定控制注射的实施表明以下两种情况中的一种:使用的再生条件钝化配体,或者在动力学分析所需的48小时内,配体自身在25℃是不稳定的。mC1q对Fab显示出的低亲和力使得动力学分析能够在没有表面再生的情况下实施。

[0450] 由于稳定性问题,Fab和IgG两者都被用作动力学分析的配体,其中配体的量被最小化以避免潜在亲和力。

[0451] 动力学数据在流体速率40 $\mu$ L/min获得,以最小化任何潜在的质量转移效应。两个重复的空白样品(不含抗原)和单个浓度的分析物被编程到动力学运行中,以检测动力学循环中表面和分析物二者的稳定性。对于初始动力学运行,3.33倍稀释的分析物被运行。2倍稀释的范围被选定用于动力学分析以及后续的运行。

[0452] 结合阶段被监测500秒,以允许一些更高浓度的分析物达到稳定状态。为了在动力学循环的解离阶段观测到足够的信号减小( $\geq 10\%$ ),解离被测量长达10800秒,从而使足够的解离发生,以用于准确评估动力学。来自参照通道Fc1的信号被从Fc2、Fc3和Fc4的信号中减去。

[0453] 对于mC1q和VH3/VK3的Fab片段的相互作用的动力学参数的多种测定形式在表5中显示。对于mC1q,当用作分析物时的 $K_D$ 值是123nM,当用作配体时的 $K_D$ 值是677nM。报道的 $K_D$ 值的差别可能是由于相互作用的模式或者化学耦合多亚基mC1q到表面上,从而导致蛋白质二

级或三级结构改变的影响。

[0454] 表5:小鼠C1q的动力学分析

[0455]

配体	分析物	$k_a$ (1/Ms)	SE ( $k_a$ )	$k_d$ (1/S)	SE ( $k_d$ )	$R_{max}$ (RU)	SE ( $R_{max}$ )	$\chi^2$ (RU <sup>2</sup> )	$K_D$ (nM)
mC1q	Fab	6.23x10 <sup>3</sup>	1.4X10 <sup>2</sup>	4.6x10 <sup>-3</sup>	1.7x10 <sup>-5</sup>	37.0	0.6	0.8	747.9
	VH3/Vκ3	6.9x10 <sup>3</sup>	2.4X10 <sup>2</sup>	4.1x10 <sup>-3</sup>	1.0x10 <sup>-4</sup>	33.4	0.5	0.9	606.6
	平均值	<b>6.5x10<sup>3</sup></b>		<b>4.3x10<sup>-3</sup></b>		<b>35.2</b>			<b>677.3</b>
	Std	<b>5.0x10<sup>2</sup></b>		<b>3.1x10<sup>-4</sup></b>		<b>2.6</b>			<b>99.9</b>
Fab VH3/Vκ3	mC1q	4.5x10 <sup>5</sup>	2.6X10 <sup>4</sup>	5.6x10 <sup>-2</sup>	3.4x10 <sup>-3</sup>	88.6	0.6	1.9	125.6
		1.7x10 <sup>5</sup>	1.8X10 <sup>3</sup>	9.1x10 <sup>-3</sup>	5.4x10 <sup>-5</sup>	50.0	0.3	5.6	121.2
	平均值	<b>3.1x10<sup>5</sup></b>		<b>3.2x10<sup>-2</sup></b>		<b>69.3</b>			<b>123.4</b>
	Std	<b>2.0x10<sup>5</sup></b>		<b>3.3x10<sup>-2</sup></b>		<b>27.3</b>			<b>3.1</b>

[0456] 表5描述了使用Biacore T200测定的mC1q和Fab的1对1相互作用的动力学参数。 $\chi^2$ 值表示结合和解离数据与推荐的结合模型的符合程度。数值越低,符合程度越好。与速率常数相关的SE值代表数据拟合所描述的模型相关的不确定性,不代表真实动力学值的总不确定性。平均响应数据代表平均动力学值和来自于2个独立分析的相关SD。

[0457] IgG和Fab两者与hC1q的相互作用的动力学参数在低至皮摩尔的范围(表6对应于1对1模型,表7对应于非均相模型)。为了避免亲和力,hC1q最初被用作配体,然而,这限制了单循环动力学分析以及更复杂模型,例如非均相配体结合模型(等式3),的应用,更复杂的模型可以代表与化学耦合多亚基蛋白质到表面相关的不同形式的hC1q结构。当hC1q被用作分析物,IgG和Fab两者以可能避免亲和力的最低浓度被固定。使用1对1模型和更复杂的二价分析物模型(等式4)分析数据。复杂模型的拟合并未显著提高拟合度量标准,并且连接反应控制并未显示时间依赖的解离阶段。结果表明,在低配体密度下,结合不是主要由于亲和力。hC1q作为分析物使用,全长VH3/Vκ3 IgG的KD值是5.8pM,VH3/Vκ3 Fab的KD值是8.6。需要指出的是,解离速率太慢以至于无法用本技术精确测量。更长解离时间受到系统稳定性的限制(BSA组断层),并且低水平的结合习惯于避免亲和力。这些结果与hC1q作为配体所获得的结果很好地关联。

[0458] 表6:人C1q的动力学分析

[0459]

配体	分析物	$k_a$ (1/Ms)	SE ( $k_a$ )	$k_d$ (1/S)	SE ( $k_d$ )	$R_{max}$ (RU)	SE ( $R_{max}$ )	$\chi^2$ (RU <sup>2</sup> )	$K_D$ (pM)
hC1q	Fab VH3/Vκ3	5.2x10 <sup>4</sup>	82	4.6x10 <sup>-8</sup>	1.3x10 <sup>-7</sup>	154.9	0.033	14.8	0.87
	IgG VH3/Vκ3	3.9x10 <sup>4</sup>	96	3.1x10 <sup>-7</sup>	5.3x10 <sup>-8</sup>	387.9	0.11	206	7.9
Fab VH3/Vκ3	hC1q	1.1x10 <sup>6</sup>	190	9.1x10 <sup>-6</sup>	1.4x10 <sup>-8</sup>	13.5	0.0015	0.0773	<b>8.6</b>
IgG VH3/Vκ3	hC1q	9.6x10 <sup>5</sup>	360	6.4x10 <sup>-6</sup>	2.9x10 <sup>-8</sup>	6.5	1.5x10 <sup>-3</sup>	0.076	6.7
		1.1x10 <sup>6</sup>	190	5.1x10 <sup>-6</sup>	1.4x10 <sup>-8</sup>	17.4	0.002	0.143	4.9
	平均值	<b>1.0x10<sup>6</sup></b>		<b>5.8x10<sup>-6</sup></b>					<b>5.8</b>
	Std	<b>6.2x10<sup>4</sup></b>		<b>9.1x10<sup>-7</sup></b>					<b>1.3</b>

[0460] 表6描述使用Biacore T200测定的hC1q与Fab或者IgG的1对1相互作用的动力学参数。图例参照表5。用红色突出显示的数据表明低拟合标准,因而这些数据组使用更复杂的



模型被分析(表7)。

[0461] 表7:非均相配体相互作用动力学分析

[0462]

配体	分析物	$k_{a1}$ (1/Ms)	$k_{d1}$ (1/S)	$k_{a2}$ (1/Ms)	$k_{d2}$ (1/S)	$R_{max1}$ (RU)	$R_{max2}$ (RU)	$Chi^2$ (RU <sup>2</sup> )	$K_D1$ (nM)	$K_D2$ (nM)
hC1q	Fab VH3/Vκ3	$1.3 \times 10^5$	$2.3 \times 10^{-5}$	$1.8 \times 10^4$	$6.3 \times 10^{-3}$	80.3	78.7	0.1	175.0	3.4
	IgG VH3/Vκ3	$2.0 \times 10^5$	$4.6 \times 10^{-6}$	$1.6 \times 10^4$	$1.1 \times 10^{-7}$	152.6	247.1	2.41	22.7	7.3

[0463] 表7描述使用Biacore T200测定的hC1q与Fab或者IgG非均相配体相互作用的动力学参数。图例参照表5。拟合到非均相配体模型的数据代表固定多亚基蛋白质到表面上所预期的非均相性。

[0464] 结论

[0465] 使用两个种类作为配体,分析hC1q和mC1q与全长IgG和VH3/Vκ3的Fab片段的相互作用。稳定性问题以及C1q复合物化学耦合CM5右旋糖酐表面的问题要求开发IgG和Fab表面;结果表明,与此表面观测到的结合模式主要是1对1,即动力学曲线图并未示出亲和力的迹象。全长IgG和VH3/Vκ3的Fab片段两者在低至皮摩尔范围对hC1q显示出紧密结合(分别为5.8pM和8.6pM),然而对于mC1q与VH3/Vκ3的Fab片段的结合,观测到较低的亲和力(123nM)。

[0466] 实施例3:人源化抗C1q抗体抑制补体介导的溶血

[0467] 在人和啮齿动物溶血性测定(CH50)中,人源化抗C1q抗体被检测,以确定其中和C1q以及阻断C1q激活下游补体级联的能力。

[0468] 本实施例所使用的人源化抗C1q抗体是根据实施例1的描述生产的。下列来自于实施例1的人源化抗体被使用:抗体VH1/Vκ1(2B12)、抗体VH3/Vκ3(5H7)、抗体VH3/Vκ4(3F1)和抗体VH4/Vκ3(1D3)。小鼠单克隆抗体M1(ANN-005)和嵌合M1抗体(3E2)也被用作对照。

[0469] CH50测定基本上按照Current Protocols in Immunology(1994) Supplement 9 Unit 13.1中所述进行。简单地说,将5微升( $\mu$ l)人血清(Cedarlane, Burlington, NC)或0.625 $\mu$ l威斯塔鼠血清稀释到50 $\mu$ l的GVB缓冲液(Cedarlane, Burlington, NC)中,并向其中加入50 $\mu$ l的稀释于GVB缓冲液中的人源化抗体(1 $\mu$ g)。抗体:血清混合物在冰上预孵育30分钟,然后将其加入到100 $\mu$ l的EA细胞( $2 \times 10^8$ /ml)中,用于大鼠和人测定。EA细胞是严格按照实验室指南(Current Protocols)中的说明,使用阿氏液中的绵羊血(Cedarlane Cat# CL2581)和溶血素(Cedarlane Cat#CL9000)产生的。EA细胞、血清和抗体混合物在37 $^{\circ}$ C孵育30分钟,并放置在冰上。接下来,将1.2ml的0.15M的NaCl加入到混合物中,在分光光度计上读取样品的OD<sub>412</sub>,以确定细胞裂解的量。测试抗体的抑制百分比是与对照小鼠IgG1抗体(Abcam ab18447)相比而确定。

[0470] 四个C1q结合抗体(2B12、5H7、3F1和1D3)以剂量响应方式被测试,以确定在人CH50溶血测定中其C1q中和活性(图7A)。每种抗体都以3.9ng、15.9ng、62.5ng和260ng的剂量进行测试,上述剂量对应于使抗C1q抗体以从大约10:1到大约1:1的化学计量范围与C1q结合的有效剂量范围。鼠类抗C1q抗体M1(ANN-005)和嵌合M1抗体(3E2)被用作参照。VH3/Vκ3抗体(5H7)以剂量依赖的方式抑制CH50溶血,所达到的程度与鼠类M1抗体和嵌合M1抗体两者相当(图7A)。此外,需要大约60ng的VH3/Vκ3抗体(5H7)、VH4/Vκ3抗体(1D3)和VH1/Vκ1抗体

(2B12)以抑制50%的观测到的溶血(图7A)。需要大约250ng的VH3/V $\kappa$ 4抗体(3F1)以抑制大约95%的观测到的溶血(图7A)。

[0471] 四个C1q结合抗体(2B12、5H7、3F1和1D3)还被测试,以确定在大鼠CH50测定中其C1q中和活性(图7B)。每种抗体都以3.9ng、15.9ng、62.5ng和260ng的剂量进行测试,上述剂量对应于使抗C1q抗体以从大约10:1到大约1:1的化学计量范围与C1q结合的有效剂量范围。测试以剂量响应的方式进行。鼠类抗C1q抗体M1(ANN-005)和嵌合M1抗体(3E2)被用作参照。VH1/V $\kappa$ 1抗体(2B12)以剂量依赖的方式抑制CH50溶血,所达到的程度与鼠类M1抗体和嵌合M1抗体两者相当(图7B)。此外,需要大约60ng的VH1/V $\kappa$ 1抗体(2B12)、VH3/V $\kappa$ 4抗体(3F1)、VH3/V $\kappa$ 3抗体(5H7)和VH4/V $\kappa$ 3抗体(1D3)以抑制大约50%到大约80%的观测到的溶血(图7B)。

[0472] 虽然为了清楚理解,上述发明以通过举例说明和实施例被详细描述了,但是说明书和实施例不应当被理解为限制本发明的范围。本文引用的所有专利和科技文献的公开内容都明确通过引用将其全文合并入本文。

[0473] 实施例4:猴体内静脉剂量研究,以评估人源化抗C1q抗体的药物动力学、对血清C1q水平的药效影响以及活体外补体介导溶血

[0474] 经由单次静脉快速浓注(I.V.),向食蟹猴施用15和100mg/Kg剂量(N=2每剂量,每剂量一只公猴一只母猴)人源化抗C1q抗体VH3/V $\kappa$ 3(5H7)。

[0475] 血液样品在下列时间点收集:第1天:研究前以及施用后0.5h、2h、4h、8h、12h、24h、72h、96h和120h,并且在第7、9、12、15、18和21天。血液样品可以凝结,通过离心分离血清,并随后冷冻贮存于-80°C直至分析。

[0476] 来自猴样品的VH3/V $\kappa$ 3(5H7)的血清水平的确定:血清抗C1q抗体水平是以hC1q作为捕获分析物,使用直接ELISA测量的,接着进行人5H7抗体探测。Black 96孔ELISA平板(Corning,Cat#3925)被涂覆了2 $\mu$ g/ml的人C1q(补体技术A099)。经4°C过夜孵育后,平板经Dulbecco磷酸盐缓冲盐水(DPBS,Thermo Scientific28372)清洗3次,并用含有3%BSA的DPBS 4°C阻断过夜。第二天,阻断溶液被移除,5H7标准血清样品或在2000到2000000倍稀释范围的个体血清样品以50 $\mu$ l每个样品被加到所述平板上,所述样品在含有0.3%BSA和0.1%吐温(KPL Inc.51-12-10)的DPBS测试缓冲液中。样品在室温下以300rpm震荡孵育1小时。然后,向测试缓冲液中加入50 $\mu$ l浓度为0.5 $\mu$ g/ml的与碱性磷酸酶共轭的山羊抗-人FC抗体(Jackson Immuno research,109-055-098)。经室温孵育1小时后,用含有0.05%吐温的DPBS清洗平板3次。每次清洗都在平板振动器以300rpm的震荡持续10分钟。平板随后轻敲干燥,用碱性磷酸酶底物孵育20分钟(Life Technologies,#T2214)。发光计的读数可以从Perkin Elmer Evision读出器读取。标准曲线使用4PL逻辑拟合进行拟合,未知信号计数被转换成 $\mu$ g/ml浓度,并用Graphpad Prism绘制曲线。

[0477] 来自猴样品的血清C1q水平的确定:C1q的血清水平是使用两种有区别的hC1q特异性ELISA测定来确定的。在两种ELISA测定中,与C1q的胶原蛋白尾部结合的抗体JL1被用作捕获抗体(Abcam ab71940)。在第一次测定中,与5H7结合相同位点的鼠类版本的VH3/V $\kappa$ 3(5H7)或M1被用作探测抗体,去分离自由C1q水平。在第二次测定中,JL1被用作探测抗体以测量在血清样品中自由C1q和与ANX结合的C1q两者。

[0478] Black 96孔ELISA平板(Corning,Cat#3925)被涂覆了1 $\mu$ g/ml的JL1。经4°C过夜孵

育后,平板用Dulbecco磷酸盐缓冲盐水(DPBS,Thermo Scientific28372)清洗3次,并用含有3%BSA的DPBS4℃阻断过夜。第二天,阻断溶液被移除,C1q标准血清样品或个体血清样品在1000到10000倍范围稀释,以50 $\mu$ l每个样品,在含有0.3%BSA和0.1%吐温的DPBS测试缓冲液中运行。接下来在室温下孵育1小时,向测试缓冲液中加入50 $\mu$ l分别与碱性磷酸酶共轭的抗体M1或JL1,到达最终浓度200-400ng/ml。样品在4℃震荡过夜孵育。第二天,用含有0.05%吐温的DPBS清洗平板3次。每次清洗都在平板振动器以300rpm的平板持续10分钟。平板随后轻敲干燥,用碱性磷酸酶底物孵育20分钟。发光计的读数可以从Perkin Elmer Evision读出器读取。标准曲线通过4PL逻辑拟合进行拟合,未知信号计数被转换成浓度,稀释校正并随后用Graphpad Prism绘制曲线。

[0479] 猴血清样品中活体外溶血活性的确定:溶血测定与实施例3中的相似,但是做了下列修改。来自研究的猴血清样品以1:50稀释到GVB++缓冲液(Complement Technology Cat# B100)中,并与相同体积的对17百万细胞/mL的绵羊红细胞敏感的抗体(Complement Technology Cat#B201)混合。样品在37℃孵育1小时。对照孔被建立以确定基线(不含任何血清的缓冲液)和100%溶血(使用去离子水)。然后样品被离心,上清液被转移到空白的ELISA平板上,在415nm读取吸光度。所有样品的吸光度都扣除了基线并且标准化到100%溶血(去离子水)。在1:50稀释时,血清样品显示出水中观测到的溶血的50-70%。对于每个个体猴,%溶血都绘制曲线并经基线标准化。

[0480] 依照IV施用,观察到血清5H7水平剂量依赖型增加,在15mg/Kg剂量下的~250 $\mu$ g/ml和在100mg/Kg剂量下的~2000 $\mu$ g/ml的最大化体现。超过20天在100mg/Kg剂量下取样,5H7的持续血清水平是明显的,然而在15mg/Kg剂量下,血清5H7水平在4天后降低到低于检测极限(图8)。在15mg/Kg剂量下,血清C1q水平(JL1-M1测定)超过5天后降低>90%,并在开始施用后5-11天之间恢复到基线值(图9A)。相反,100mg/Kg的剂量导致在开始施用后,血清C1q水平持续降低长达20天(图9A)。血清C1q的JL1-JL1测定也观测到相似模式的降低和时间进程(图9B)。在两个独立的ELISA测定中对血清C1q的强烈的降低和持续的降低的观测(一个具有和5H7在C1q的相同位点结合的探测抗体,另一个具有结合C1q上的独立位点的检测抗体)暗示着在用5H7治疗后,血清C1q水平被清除。与血清C1q水平降低一致,在100mg/Kg剂量下,开始施用后,活体外溶血也观测到长达20天的持续降低(图10)。在15mg/Kg剂量的ANX下,开始施用后溶血降低>90%超过5天,并在5-11天之间恢复到基线值(图10)。

[0481] 这些结果证明,在食蟹猴体内,抗C1q抗体VH3/V $\kappa$ 3(5H7)展示出强烈的药物动力学体现,并且血清C1q水平和溶血随时间进程持续降低。

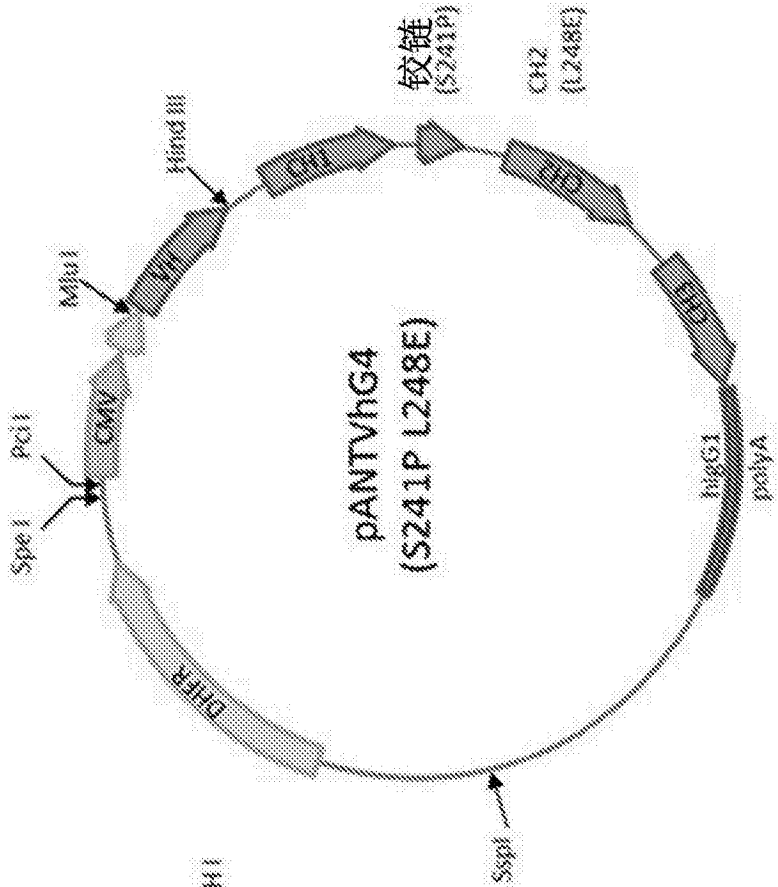


图 1B

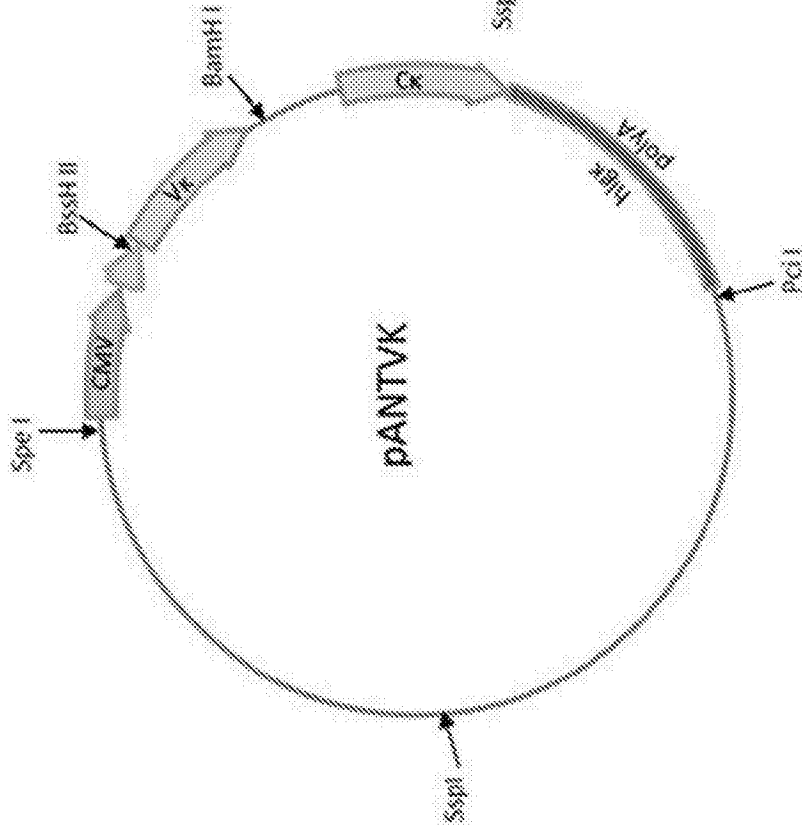


图 1A

M1抗C1q的重链可变区 (VH) 的氨基酸序列和人源化VH变体1-2的氨基酸序列的对比

VH变体1:

M1_VH	3	QVQLDQPGAEIYVRFQASVFLSCKESGCHFFTSYMMHWVQRFQGLLEWIVV	50
		..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....	
VH1	3	QVQLVCSGAELEKRFQASVAVVSCYSSGCHFFTSYMMHWVQRFQGLLEWIVV	50
		..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....	
M1_VH	51	IHPNCSINYNKFTESKATLVVHKSSSTAYMGLSLSLTSEDSAVYCAQEK	100
		..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....	
VH1	51	IHPNCSINYNKFTESKATLVVHKSSSTAYMGLSLSLTSEDSAVYCAQEK	100
		..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....	
M1_VH	101	DSTEVLRMDYWGQGTSTVTVSS	121
		..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....	
VH1	101	DSTEVLRMDYWGQGTSTVTVSS	121
		..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....	

M1\_VH代表M1抗体的VH，并且VH1代表VH变体1。3个CDR序列用粗体表示。

VH变体2:

M1_VH	3	QVQLDQPGAEIYVRFQASVFLSCKESGCHFFTSYMMHWVQRFQGLLEWIVV	50
		..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....	
VH2	3	QVQLVCSGAELEKRFQASVAVVSCYSSGCHFFTSYMMHWVQRFQGLLEWIVV	50
		..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....	
M1_VH	51	IHPNCSINYNKFTESKATLVVHKSSSTAYMGLSLSLTSEDSAVYCAQEK	100
		..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....	
VH2	51	IHPNCSINYNKFTESKATLVVHKSSSTAYMGLSLSLTSEDSAVYCAQEK	100
		..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....	
M1_VH	101	DSTEVLRMDYWGQGTSTVTVSS	121
		..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....	
VH2	101	DSTEVLRMDYWGQGTSTVTVSS	121
		..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....	

M1\_VH代表M1抗体的VH，并且VH2代表VH变体2。3个CDR序列用粗体表示。

图2A



MI抗Clq的kappa轻链可变区 (V<sub>K</sub>) 的氨基酸序列和人源化V<sub>K</sub> 变体1-2的氨基酸序列的对比

V<sub>K</sub> 变体1:

```

MI_VK      1  DWQITQSPFSLAASPCGKTTIMKASKSINKYLAHWYQKPKTWEILLIYS      50
            ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
VK1         1  DWQITQSPFSLAASPCGKTTIMKASKSINKYLAHWYQKPKTWEILLIYS      50

MI_VK      51  GSTLQSGIIFSRFSGGSGSTFTLTLSLSLSEFDFAMFYCCQHNHYPLTFCG    100
            ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
VK1         51  GSTLQSGIIFSRFSGGSGSTFTLTLSLSLSEFDFAMFYCCQHNHYPLTFCG    100

MI_VK      101  GTRLELK      107
            ||| ||| ||
VK1         101  GTRLELK      107
  
```

MI\_VK代表MI抗体的V<sub>K</sub>，并且VK1代表V<sub>K</sub> 变体1。3个CDR序列用粗体表示。

V<sub>K</sub> 变体2:

```

MI_VK      1  DWQITQSPFSLAASPCGKTTIMKASKSINKYLAHWYQKPKTWEILLIYS      50
            ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
VK2         1  DWQITQSPFSLAASPCGKTTIMKASKSINKYLAHWYQKPKTWEILLIYS      50

MI_VK      51  GSTLQSGIIFSRFSGGSGSTFTLTLSLSLSEFDFAMFYCCQHNHYPLTFCG    100
            ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
VK2         51  GSTLQSGIIFSRFSGGSGSTFTLTLSLSLSEFDFAMFYCCQHNHYPLTFCG    100

MI_VK      101  GTRLELK      107
            ||| ||| ||
VK2         101  GTRLELK      107
  
```

MI\_VK代表MI抗体的V<sub>K</sub>，并且VK2代表V<sub>K</sub> 变体2。3个CDR序列用粗体表示。

图2C

MI抗Clq的kappa轻链可变区 (Vκ) 的氨基酸序列和人源化Vκ 变体3-4的氨基酸序列的对比

Vκ 变体3:

MI_VK	1	DVQITQSPFSLAASPGSTTTTMC	<b>RASRSIENNYLA</b>	YQEKPGTMALEIYS	50
VK3	1	DVQITQSPFSLAASPGSTTTTMC	<b>RASRSIENNYLA</b>	YQEKPGTMALEIYS	50
MI_VK	51	<b>GSTLQSG</b>	LPSPFGSGSTDTFTITISSELPEDPAMYY	<b>QQNNHYFF</b> PFQA	100
VK3	51	<b>GSTLQSG</b>	LPSPFGSGSTDTFTITISSELPEDPAMYY	<b>QQNNHYFF</b> PFQA	100
MI_VK	101	CTKLEIK			107
VK3	101	CTKLEIK			107

MI\_VK代表MI抗体的Vκ，并且VK3代表Vκ 变体3。3个CDR序列用粗体表示。

Vκ 变体4:

MI_VK	1	DVQITQSPFSLAASPGSTTTTMC	<b>RASRSIENNYLA</b>	YQEKPGTMALEIYS	50
VK4	1	DVQITQSPFSLAASPGSTTTTMC	<b>RASRSIENNYLA</b>	YQEKPGTMALEIYS	50
MI_VK	51	<b>GSTLQSG</b>	LPSPFGSGSTDTFTITISSELPEDPAMYY	<b>QQNNHYFF</b> PFQA	100
VK4	51	<b>GSTLQSG</b>	LPSPFGSGSTDTFTITISSELPEDPAMYY	<b>QQNNHYFF</b> PFQA	100
MI_VK	101	CTKLEIK			107
VK4	101	CTKLEIK			107

MI\_VK代表MI抗体的Vκ，并且VK4代表Vκ 变体4。3个CDR序列用粗体表示。

图2D



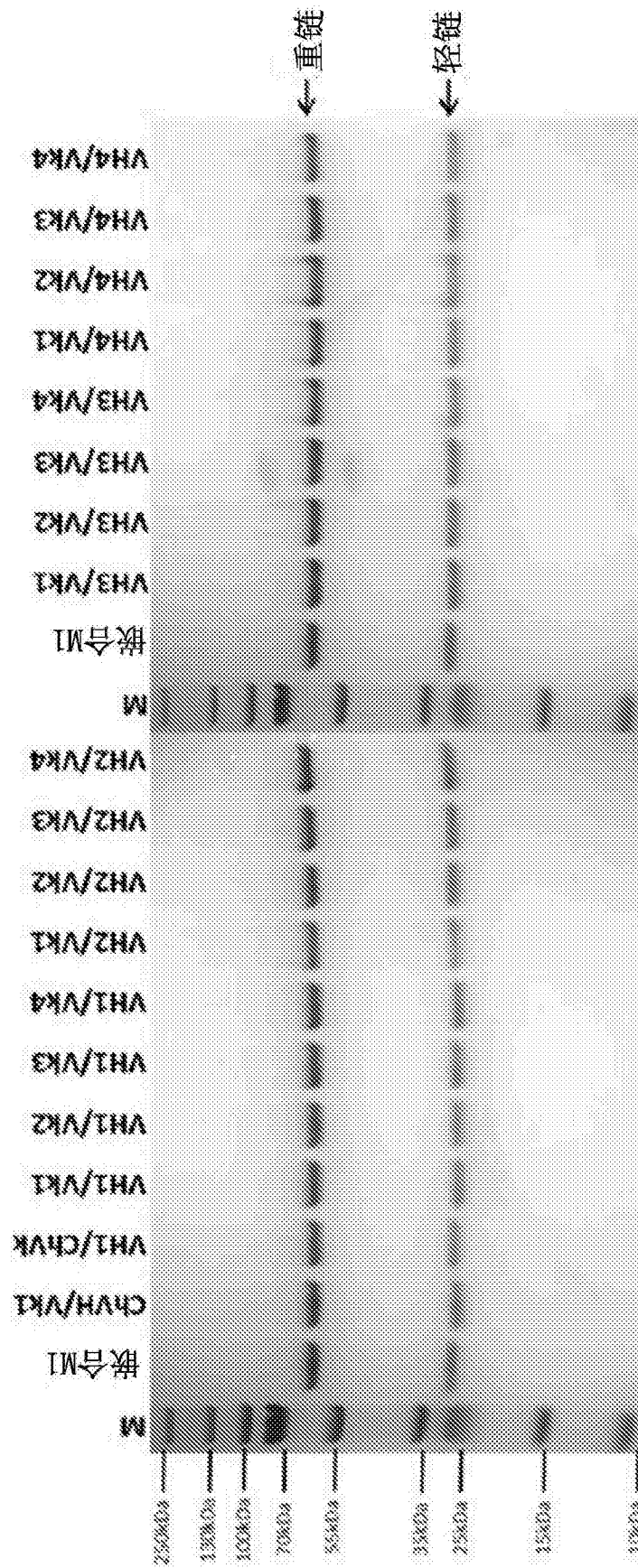


图3

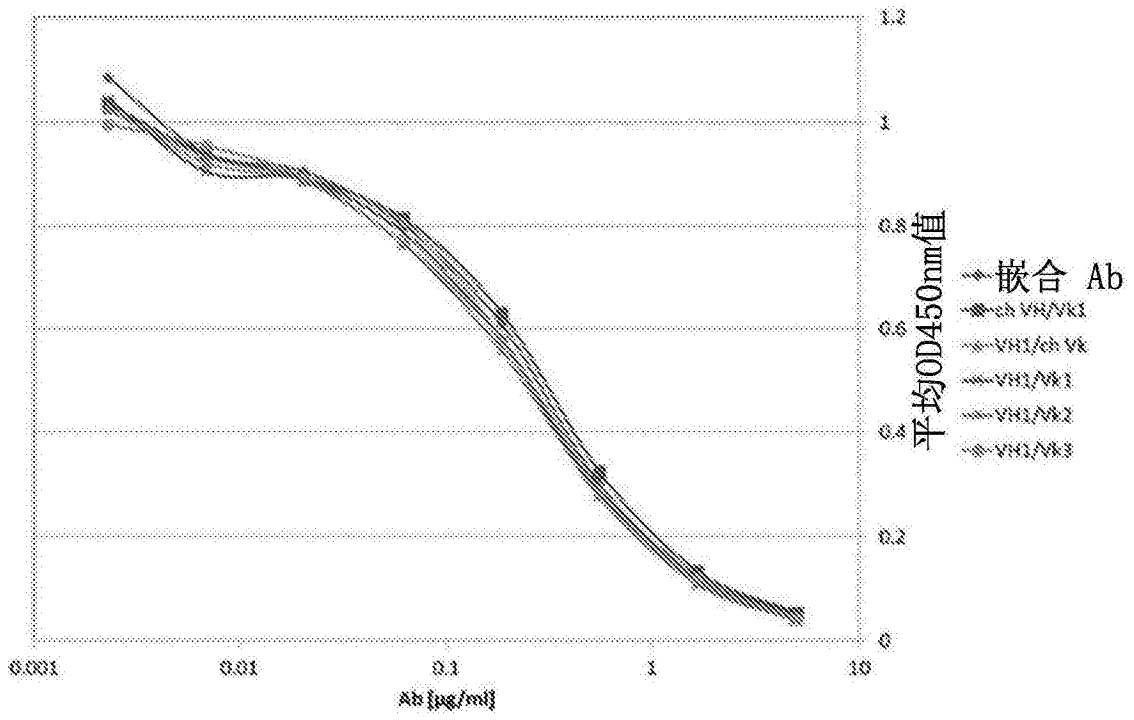


图4A

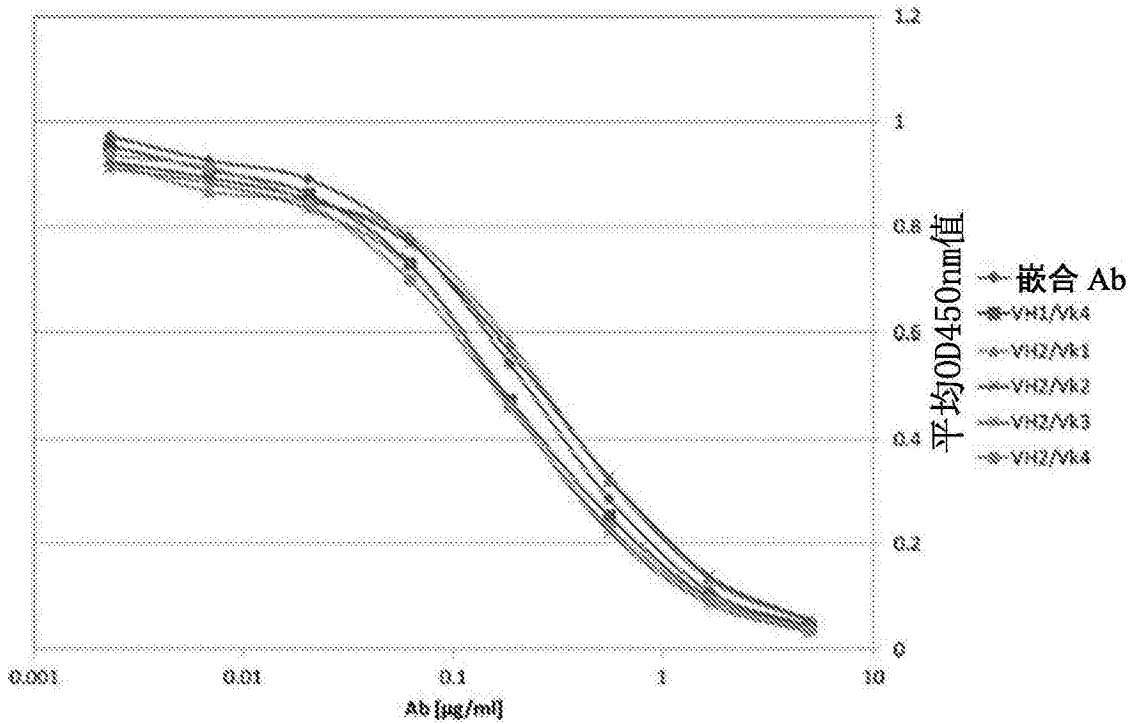


图4B

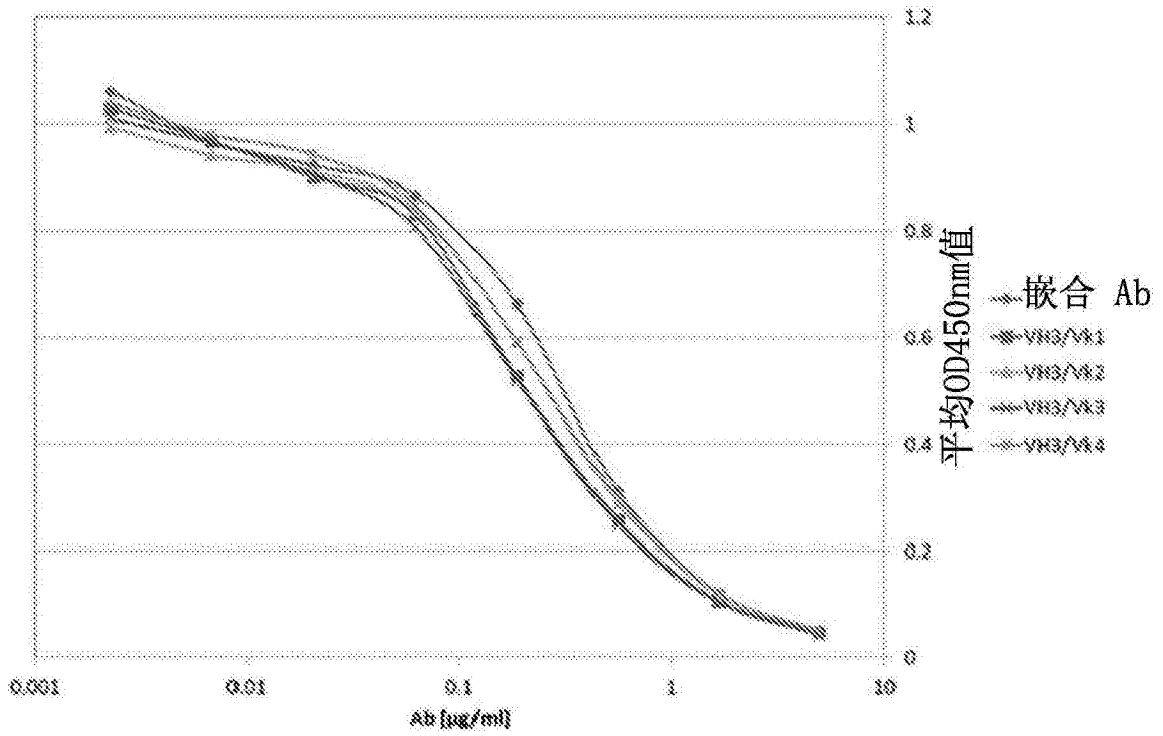


图4C

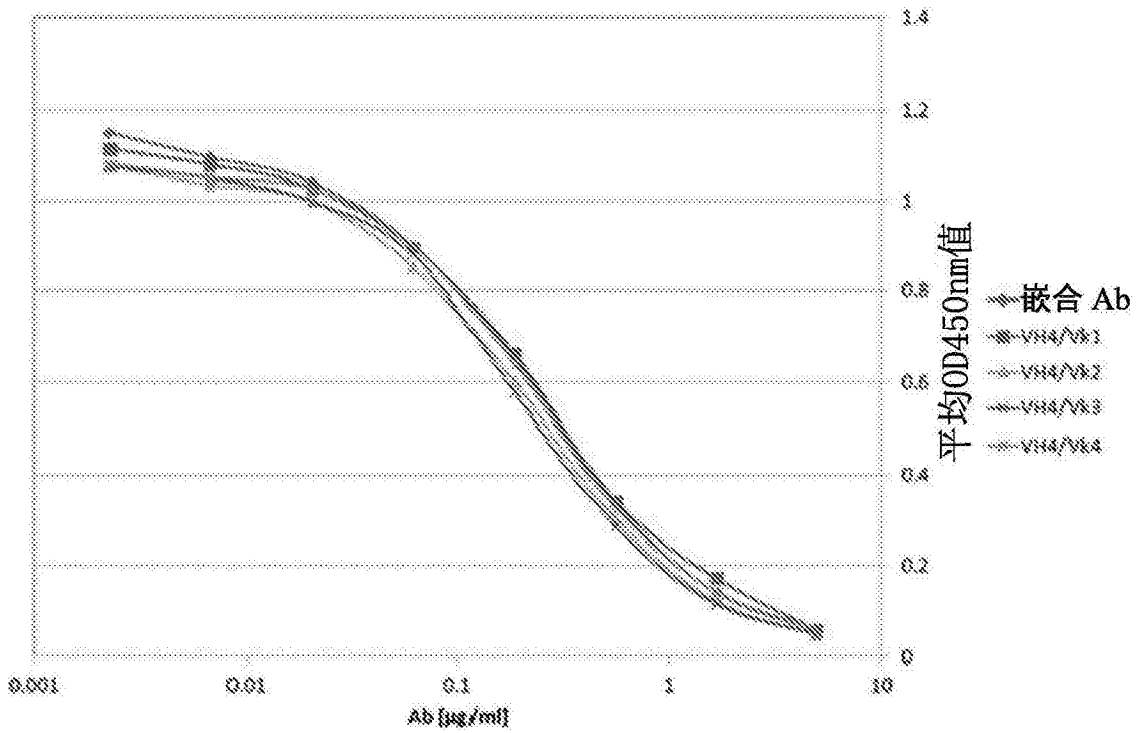


图4D

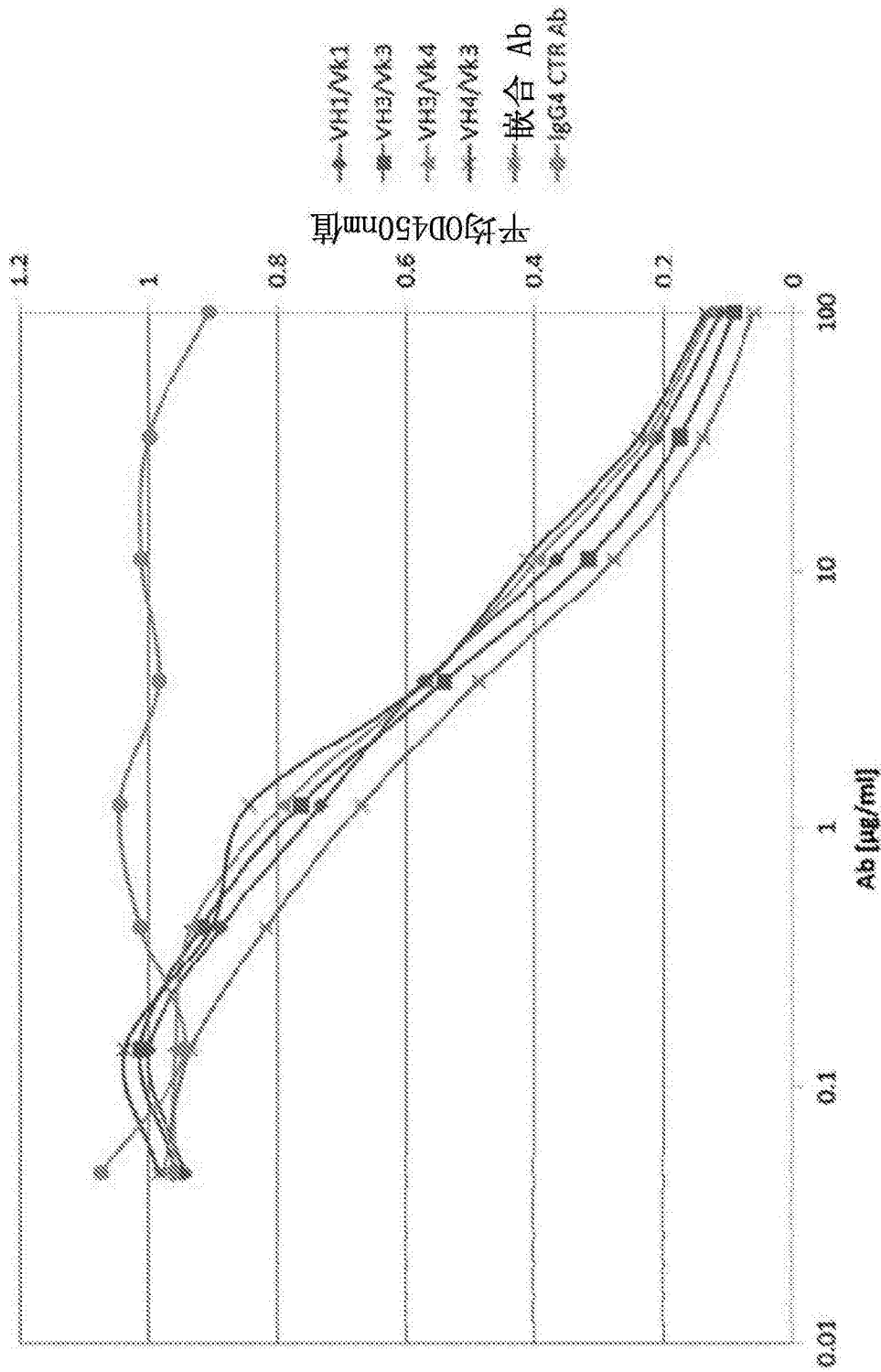


图5

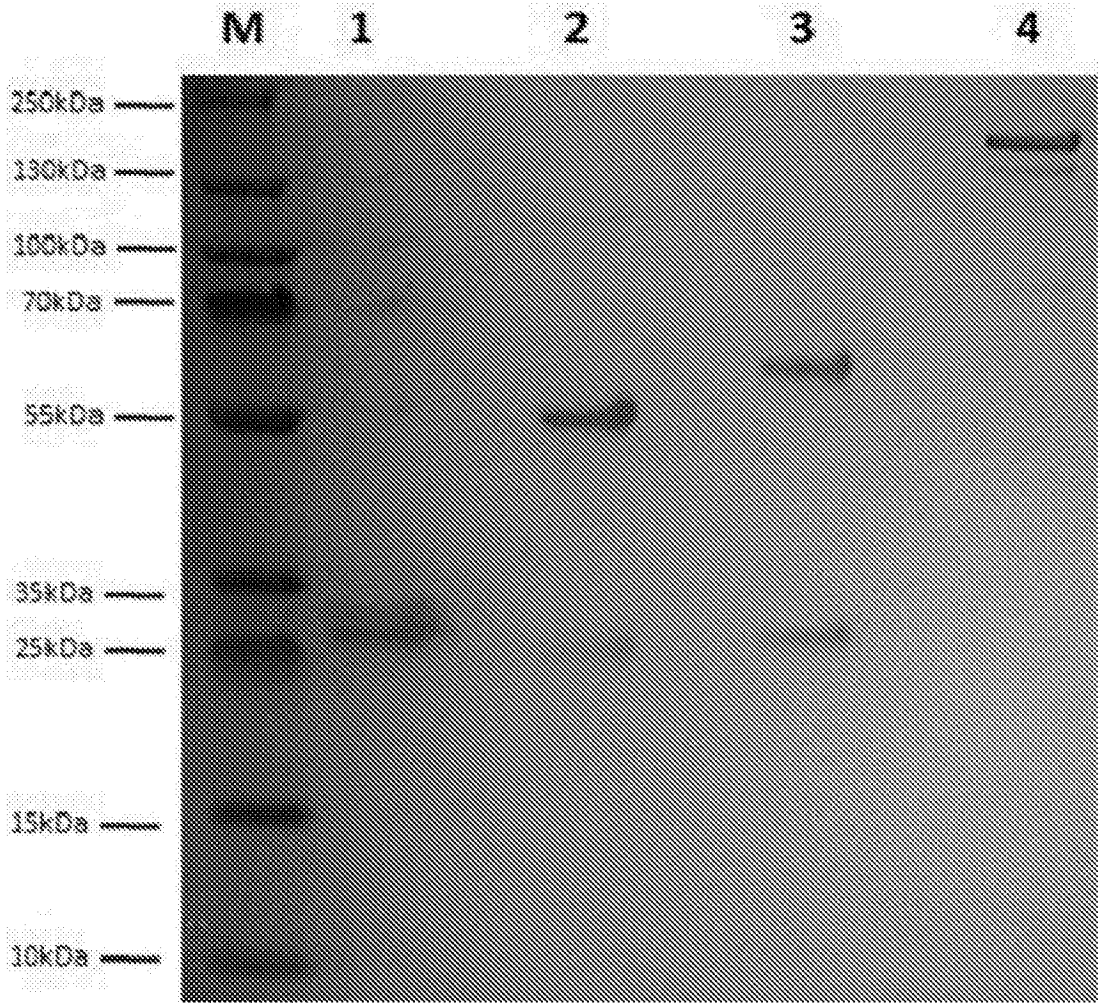


图6

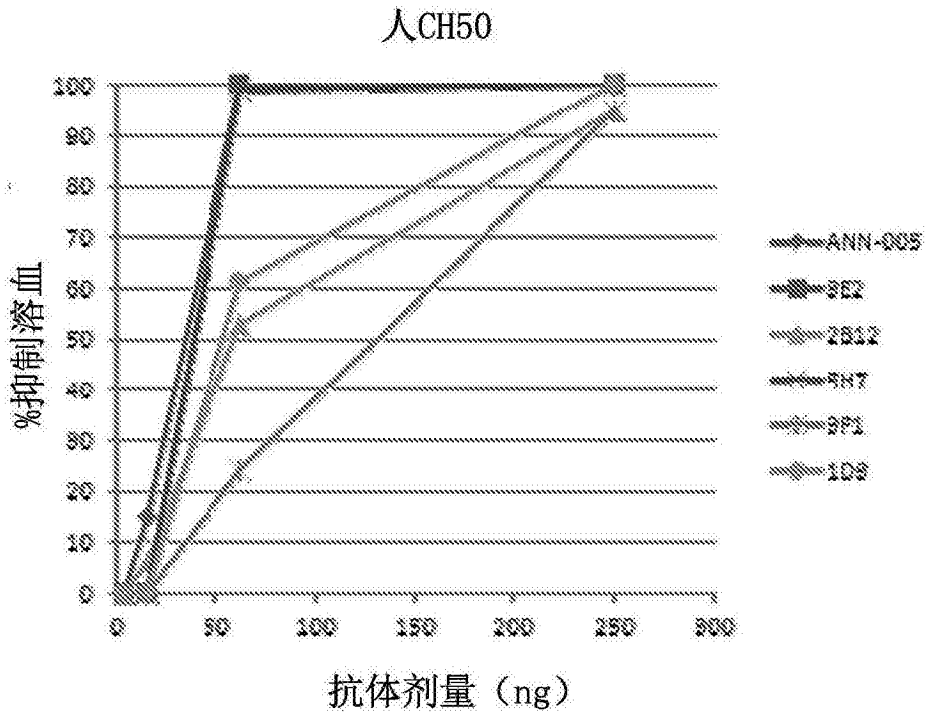


图7A

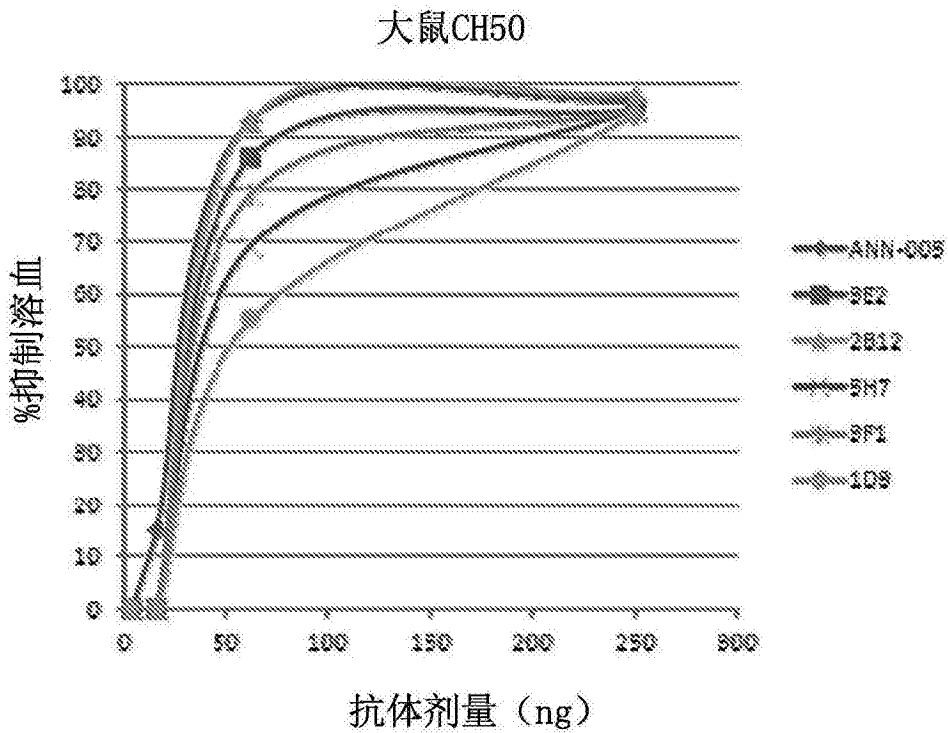


图7B

血清5H7时间进程

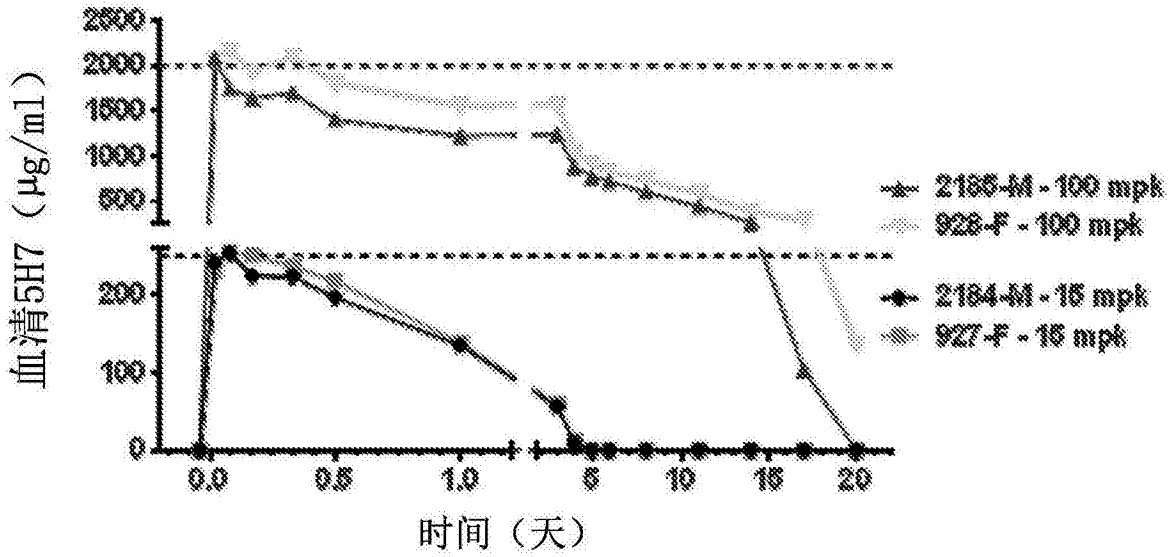


图8

血清Clq时间进程JL1-M1

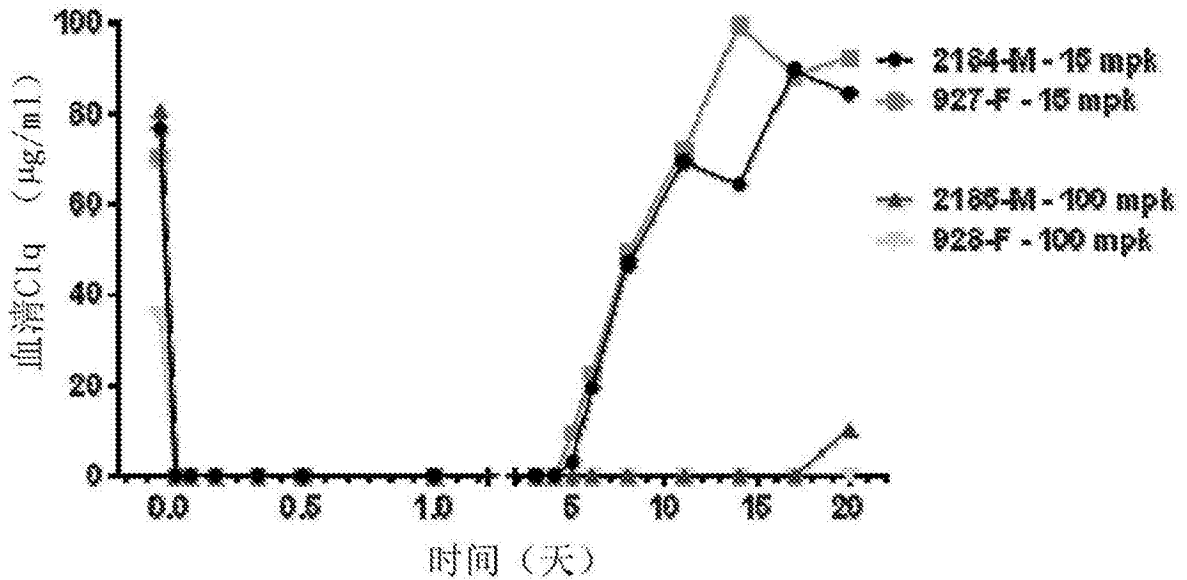


图9A

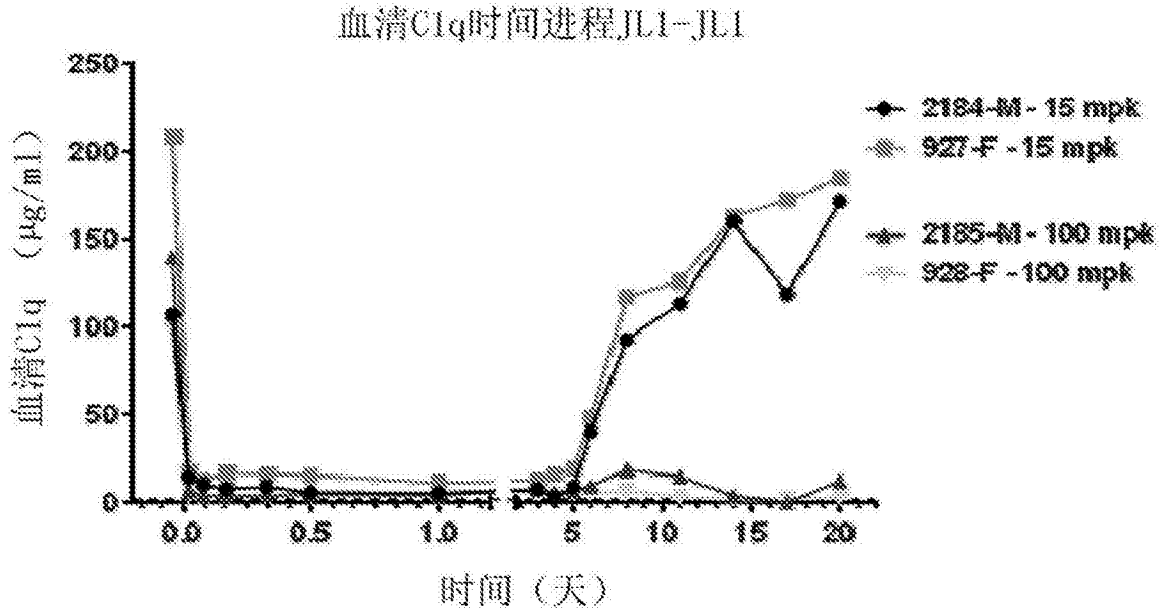


图9B

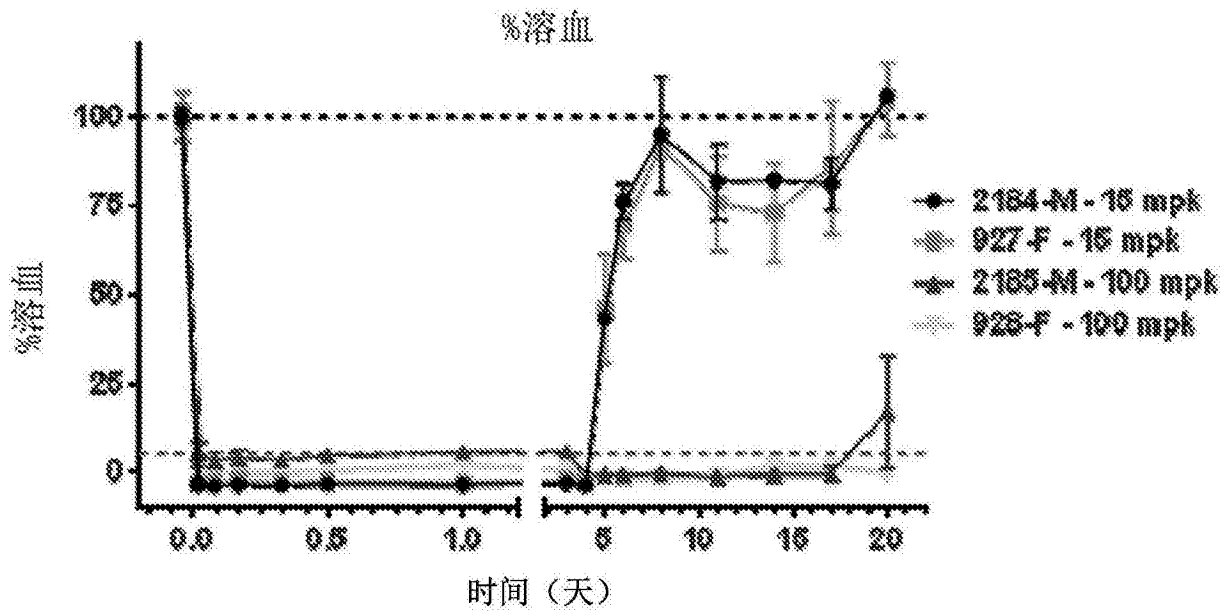


图10