(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108779171 A
(43)申请公布日 2018.11.09

(21)申请号 201680079670.4

(22)申请日 2016.11.23

(30)优先权数据
62/259,227 2015.11.24 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2018.07.20

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2016/063587 2016.11.23

(87)PCT国际申请的公布数据
WO2017/091719 EN 2017.06.01

(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 T·耶德诺克 S·桑卡拉纳拉亚南
A·罗森塔尔 M·莱维坦

(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.
C07K 16/18(2006.01)
A61K 39/395(2006.01)
G01N 33/53(2006.01)
G01N 33/534(2006.01)
A61K 49/16(2006.01)
C12N 15/13(2006.01)
A61P 25/28(2006.01)
A61P 25/00(2006.01)
A61P 27/02(2006.01)
A61P 37/00(2006.01)

权利要求书4页 说明书38页 附图2页

(54)发明名称

抗补体因子C1Q的FAB片段及其应用

(57)摘要

本公开大体上涉及抗-C1q抗体Fab片段及使用抗-C1q抗体Fab片段的方法。

CN 108779171 A

1.一种与C1q结合的抗体Fab片段。

2.如权利要求1所述的抗体Fab片段,所述抗体Fab片段包括重链可变域和轻链可变域,其中所述重链可变域包括SEQ ID NO:1并且所述轻链可变域包括SEQ ID NO:3。

3.一种抗体Fab,其中抗体Fab片段包括重链和轻链的互补决定区(CDR),并且其中

重链CDR1序列包括SEQ ID NO:1的氨基酸残基26-35,重链CDR2序列包括SEQ ID NO:1的氨基酸残基50-66,并且重链CDR3序列包括SEQ ID NO:1的氨基酸残基99-110,并且

轻链CDR1序列包括SEQ ID NO:3的氨基酸残基24-34,轻链CDR2序列包括SEQ ID NO:3的氨基酸残基50-56,并且轻链CDR3序列包括SEQ ID NO:3的氨基酸残基89-97。

4.一种与补体级联中的蛋白质结合的抗体Fab片段,其中重链可变域包括选自SEQ ID NO:5-8的氨基酸序列,或具有与来自SEQ ID NO:5-8的所述氨基酸序列至少95%同源性的氨基酸序列。

5.如权利要求4所述的抗体Fab片段,其中轻链可变域包括选自SEQ ID NO:9-12的氨基酸序列,或具有与来自SEQ ID NO:9-12的所述氨基酸序列至少90%同源性的氨基酸序列。

6.一种与C1q蛋白特异性结合的抗体Fab片段,所述抗体Fab片段包括:

a)重链可变域,所述重链可变域包括选自SEQ ID NO:5-8的氨基酸序列,或具有与来自SEQ ID NO:5-8的所述氨基酸序列至少95%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 NO:9-12的氨基酸序列,或具有与来自SEQ ID NO:9-12的所述氨基酸序列至少90%同源性的氨基酸序列。

7.如任意前述权利要求所述的抗体Fab片段,其中所述抗体Fab片段与抗体M1结合相同的C1q表位,所述抗体M1通过具有ATCC登录号PTA-120399的杂交瘤细胞系产生。

8.如权利要求1-7所述的抗体Fab片段,其中所述抗体Fab片段抑制单克隆抗体M1与人C1q或与小鼠C1q的结合,所述单克隆抗体M1通过具有ATCC登录号PTA-120399的杂交瘤细胞系产生。

9.如权利要求1-7所述的抗体Fab片段,其中所述抗体Fab片段与人C1q和小鼠C1q两者特异性结合。

10.如权利要求1-7所述的抗体Fab片段,其中所述抗体Fab片段与大鼠C1q、狗C1q、恒河猴C1q或食蟹猴C1q,或其组合结合。

11.如权利要求1-7所述的抗体Fab片段,其中所述抗体Fab片段结合人C1q、小鼠C1q和/或大鼠C1q,以及下列中的至少一个:狗C1q、恒河猴C1q和食蟹猴C1q。

12.如任意前述权利要求所述的抗体Fab片段,其中所述抗体Fab片段属于IgG类。

13.如权利要求12所述的抗体Fab片段,其中所述IgG类是IgG1。

14.如任意前述权利要求所述的抗体Fab片段,其中所述抗体Fab片段已经被工程化以增加脑穿透性。

15.如任意前述权利要求所述的抗体Fab片段,其中所述抗体Fab片段对人C1q具有从10pM到20pM,或1pM到小于10pM的范围的解离常数(K_D)。

16.如权利要求1-15中任一项所述的抗体Fab片段,其中所述抗体Fab片段对小鼠C1q具有从1pM到200pM的范围的解离常数(K_D)。

17.如权利要求1-14中任一项所述的抗体Fab片段,其中所述抗体Fab片段与C1q特异性结合并且中和C1q的生物活性。

18.如权利要求17所述的抗体Fab片段，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与正五聚蛋白-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，(10)C1q与钙网蛋白结合，(11)C1q与凋亡细胞结合，或(12)C1q与神经细胞膜组分结合。

19.如权利要求17或18所述的抗体Fab片段，其中所述生物活性是(1)经典补体激活途径的激活，(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)小神经胶质细胞激活，(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。

20.如权利要求19所述的抗体Fab片段，其中CH50溶血包括人CH50溶血、小鼠CH50溶血、大鼠CH50溶血、狗CH50溶血、恒河猴CH50溶血、和/或食蟹猴CH50溶血。

21.如权利要求19或权利要求20所述的抗体Fab片段，其中所述抗体Fab片段能够中和从至少约50％到至少约90％的CH50溶血。

22.如权利要求19-21所述的抗体Fab片段，其中所述抗体Fab片段能够以小于150ng、小于100ng、小于50ng、或小于20ng的剂量中和至少50％的CH50溶血。

23.如权利要求19-22中任一项所述的抗体Fab片段，其中所述抗体Fab片段结合C1q并且以从小于6:1至1:1，或小于2:1至1:1的范围的结合化学计量抑制生物功能。

24.如任意前述权利要求所述的抗体Fab片段，其中所述抗体Fab片段是人源化的。

25.一种表达任意前述权利要求所述的抗体Fab片段的宿主细胞。

26.一种编码来自权利要求1-24中任一项的抗体Fab片段的重链区和/或轻链区的分离的DNA序列。

27.一种包括一个或更多个权利要求26所述的DNA序列的克隆或表达载体。

28.如权利要求25所述的宿主细胞，所述宿主细胞包括一个或更多个权利要求26所述的克隆或表达载体。

29.一种包括编码权利要求1-24中任一项所述的抗体Fab片段的核酸序列的分离的多核苷酸。

30.一种用于生产权利要求1-24所述的抗体Fab片段的方法，所述方法包括培养权利要求30所述的宿主细胞以及分离所述抗体Fab片段。

31.一种药物组合物，所述药物组合物包括权利要求1-24中任一项所述的抗体Fab片段和药学上可接受的载体。

32.一种抑制突触丢失的方法，所述方法包括向患有不利的突触丢失的患者施用选自权利要求1-24中任一项的抗体Fab片段。

33.如权利要求32所述的方法，其中作为神经退行性疾病、中枢神经系统紊乱或外周神经系统紊乱的结果，所述患者已经患有突触丢失。

34.如权利要求33所述的方法，其中所述神经退行性疾病是阿尔茨海默病。

35.如权利要求32所述的方法，所述方法还包括神经祖细胞或神经发生增强剂的施用。

36.如权利要求32所述的方法，其中所述抗体Fab片段与C1q结合并且抑制补体激活。

37.一种在需要这样的治疗的个体中治疗或预防与补体激活有关的疾病的方法，所述

方法包括施用权利要求31所述的抗体Fab片段。

38.如权利要求37所述的方法，其中所述与补体激活有关的疾病是神经退行性疾病。

39.如权利要求38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。

40.如权利要求38或权利要求39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。

41.如权利要求38-40中任一项所述的方法，其中所述神经退行性疾病与病理活性依赖性突触修剪有关。

42.如权利要求38-41中任一项所述的方法，其中所述神经退行性疾病与通过小神经胶质细胞的突触吞噬作用有关。

43.如权利要求38-42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、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、唐氏综合征、帕金森病或亨廷顿病。

44.如权利要求38所述的方法，其中所述与补体激活有关的疾病是炎性疾病、自身免疫疾病、补体相关的眼病、或代谢紊乱。

45.如权利要求44所述的方法，其中所述炎性疾病、自身免疫疾病、补体相关的眼病、或代谢紊乱选自糖尿病、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、心肺分流手术期间的补体激活、皮肌炎、天疱疮、狼疮性肾炎及导致的肾小球肾炎和血管炎、心肺分流、心脏停搏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、抗磷脂综合征、慢性开角型青光眼、急性闭角型青光眼、黄斑变性疾病、老年性黄斑变性(AMD)、脉络膜新生血管(CNV)、葡萄膜炎、糖尿病视网膜病变、缺血相关性视网膜病变、眼内炎、眼内新生血管疾病、糖尿病黄斑水肿、病理性近视、希佩尔-林道病、眼组织胞浆菌病、视神经脊髓炎(NMO)、视网膜中央静脉阻塞(CRVO)、角膜新生血管、视网膜新生血管、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、斯耶格伦干眼病、干性AMD、结节病、颞动脉炎、结节性多动脉炎、多发性硬化、异体移植、超急性排斥、血液透析、慢性阻塞性肺窘迫综合征(COPD)、哮喘、吸入性肺炎、多发性硬化、格林-巴利综合征、重症肌无力、大疱性类天疱疮或肌炎。

46.如权利要求38所述的方法，其中所述与补体激活有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、桥本甲状腺炎、阿狄森氏病、乳糜泻、克罗恩氏病、恶性贫血、寻常型天疱疮、白癜风、自身免疫性溶血性贫血、副肿瘤综合征、血管炎疾病、低补体血症荨麻疹性血管炎(HUV)、风湿性多肌痛、颞动脉炎、韦格纳肉芽肿病、多发性硬化、格林-巴利综合征、重症肌无力、大疱性类天疱疮或肌炎。

47.一种试剂盒，所述试剂盒包括权利要求1-24中任一项所述的抗体Fab片段以及包装说明书，所述包装说明书包括使用所述抗体Fab片段以在需要这样的治疗的个体中治疗或预防与补体激活有关的疾病的说明。

48.一种确定受试者的发展与补体激活有关的疾病的风险的方法，所述方法包括：

(a)向所述受试者施用抗-C1q抗体片段，其中所述抗体片段偶联至可检测标记物；

(b)检测所述可检测标记物以测量受试者中C1q的量或位置；以及

(c)将所述C1q的量或位置与参照比较,其中基于与所述参照相比的所述C1q的量的比较表征所述发展与补体激活有关的疾病的风险。

49.如权利要求48所述的方法,其中所述可检测标记物包括核酸、寡核苷酸、酶、放射性同位素、生物素或荧光标记物。

50.如权利要求49所述的方法,其中使用用于X射线、CT、MRI、超声、PET和SPECT的显像剂检测所述可检测标记物。

51.如权利要求49所述的方法,其中所述荧光标记物选自荧光素、罗丹明、花青染料或BODIPY。

52.一种降低受试者的发展与补体激活有关的疾病的风险的方法,所述方法包括施用抗-C1q抗体片段,其中所述抗-C1q抗体片段预防或降低所述发展与补体激活有关的疾病的风险,从而预防或降低与补体激活有关的未来的疾病的风险。

53.如任意前述权利要求所述的抗体Fab片段,其中所述抗体Fab片段与其对应的全长抗体相比具有较短的半衰期。

抗补体因子C1Q的FAB片段及其应用

[0001] 对相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求于2015年11月24提交的美国临时申请序列号62/259,227的优先权权益,其特此通过引用被整体并入。

[0003] 背景

[0004] 急性或慢性炎症是许多临床紊乱的常见的组成部分,并且补体系统已经与越来越多的包含退行性疾病、癌症和移植排斥的炎性病况有关。补体系统充当病原体的感测器,识别病变的和受损的宿主细胞,并且与其他免疫系统和防御系统紧密地协作以消除潜在的危险。然而,不足的、过度的或控制不良的补体激活可以使健康和疾病之间的平衡倾斜,并且导致对宿主细胞的自我攻击。这样的免疫失衡可以刺激在补体、炎性细胞以及组织损伤之间的循环,所述循环再生炎性刺激因子而非消除它们和使临床并发症恶化。补体的不适当的激活已经与许多自身免疫疾病、炎性疾病和神经退行性疾病,以及缺血再灌注损伤和癌症联系起来。因此,补体活性的治疗性调控作为用于炎性过程的上游抑制的有吸引力的靶标出而现。

[0005] 概述

[0006] 本公开大体上针对抗-C1q的Fab片段及其应用。

[0007] 补体是先天性免疫系统的主要组成部分,特别是因为其与炎症和身体对入侵生物体的防御相关。补体也涉及自身抗原和凋亡细胞的清除,形成向适应性免疫的桥梁,以及还在组织再生和肿瘤生长中发挥重要作用。为了实行这些功能,补体系统依赖于可溶性蛋白和细胞表面结合蛋白的相互作用,所述可溶性蛋白和细胞表面结合蛋白与病原体细胞表面相互作用以标记它们用于通过吞噬细胞的摧毁。补体系统由主要通过肝脏生产的大量不同的血浆蛋白组成。这些蛋白中的一些是一类被称为酶原的蛋白酶,所述蛋白酶自身通过蛋白水解裂解被激活。这些酶原可以广泛地分布而无需处于活性直到检测到局部病原体。因此,补体系统通过触发的酶级联反应被激活。

[0008] 补体激活通过三个途径被引发:经典途径、旁路途径和凝集素途径。全部三个途径是基于通过模式识别蛋白的表面结构的检测。此外,全部三个途径通过共同的交集(补体C3)汇合。C3是急性期反应物。尽管少量也通过激活的单核细胞和巨噬细胞产生,但是肝脏是主要的合成位点。细胞内发现大约200kD的单链前体(pro-C3);cDNA显示其包括1663个氨基酸。这是通过蛋白水解裂解被加工成α亚基和β亚基,在成熟蛋白质中,所述α亚基和所述β亚基通过二硫键连接。Pro-C3含有22个氨基酸残基的信号肽,β链(645个残基)和α链(992个残基)。2个链通过4个精氨酸残基(不存在于成熟蛋白质中)连接。

[0009] 经典途径通过补体蛋白C1q与表面结合抗体(IgM和IgG)的斑的直接结合,以及与凋亡细胞或微生物细胞的表面上的C-反应性蛋白、血清淀粉样蛋白P、正五聚蛋白3和其他配体的结合被激活。

[0010] C1q是460kDa的大型多聚体蛋白,由18个多肽链(6个C1q A链,6个C1q B链和6个C1q C链)组成。C1r和C1s补体蛋白与C1q尾区结合以形成C1q复合物。C1q复合物与细胞的表面或与抗体Fc区的补体结合域的结合诱导C1q中的构象改变,所述构象改变导致C1r中的自

催化酶活性的激活，然后其切割C1s以生成活性丝氨酸蛋白酶。一旦激活，C1s切割C4等，导致补体级联序列。最终该途径导致裂解和杀死感染的细胞的膜攻击复合物的形成。

[0011] 由于补体可以攻击外来入侵者和宿主细胞两者，补体是非特异性的。在正常条件下，通过各种流动相和膜结合补体调节蛋白(如C1抑制剂(C1-Inh))保护宿主细胞(包含神经元)免受潜在的补体介导的损坏。C1-INH使C1r和C1s从活性C1复合物解离，保护宿主细胞免受来自膜攻击复合物的裂解或损坏。保护免受潜在的补体介导的损坏的其他蛋白质包含C4b结合蛋白(C4BP)、因子H(FH)、补体受体1(CR1;CD35)、补体受体Ig(CRIg)、衰变加速因子(DAF;CD55)、膜辅因子蛋白(MCP;CD46)和CD59。然而，这些组成部分的缺乏或者响应于某些病理状态的补体的过度激活可以挫败该保护机制。这样的失衡的激活已与越来越多的疾病和病理紊乱有关。

[0012] 例如，各种各样补体组成部分通过神经元和神经胶质细胞在体外和在体内被表达。虽然它们在脑中的功能是未知的，但是在脑损伤之后或在神经退行性疾病病理过程期间，这些补体蛋白中的许多的表达通过血清或炎性细胞因子被上调。培养基中的星形细胞已经被报道表达C1q、C1r、C1s、C4、C2和C3，以及更多的末端蛋白。神经元已经被报道表达C4和C3。C1q被证明在神经元突触中被表达，并且标记这些突触用于清除。参见，例如，美国专利公布号2012/0195880和2012/328601。虽然选择性突触丢失是正常脑发育的必要的方面(“突触修剪”)，但过度的突触丢失，特别是在成熟的或老化的脑中，造成神经变性和认知减退。升高的突触补体表达被发现有助于在正常的老化中和神经退行性疾病的进展中的突触丢失。相反，降低神经元补体表达被发现是神经保护性的。受突触丢失影响的神经元可以是中枢神经系统神经元，或外周系统神经元。基于这些发现，中和补体因子(如C1q)的活性被认为是有前景的预防突触丢失和减缓神经退行性疾病的进展以及正常老化中的认知减退的治疗策略。涉及突触丢失并被认为经受得住以补体因子(如C1q)的中和为目标的治疗的神经退行性疾病包含阿尔茨海默病、肌萎缩性侧索硬化、多发性硬化、青光眼、肌强直性营养不良、唐氏综合征、帕金森病、亨廷顿病等。

[0013] 此外，过敏毒素C5a已经被证明有助于小鼠中的肿瘤生长。在其中补体具有有毒作用的这些情况下，通过使用适当的补体抑制剂调控补体的激活是期望的。目前，大部分补体抑制剂是免疫原性的蛋白质药物并且具有差的组织穿透性。例如，抗-C5mAb培塞利珠单抗(pexelizumab)(Alexion Pharmaceuticals)用于治疗急性心肌梗死的失败可能部分由其差的组织穿透性引起。与蛋白质抑制剂不同，数种低分子量药物(低于2kDa)已经被用作补体抑制剂，并且不具有与蛋白抑制剂相同的缺点。然而，已经被报道的低分子量药物和其他小分子抑制剂中的许多(如双酚焦硫酸盐，类固醇和三萜系化合物)通常具有对抗补体的低效能。此外，低分子量和小分子补体抑制剂具有其他问题，包含差的选择性和高的毒性。对于低分子量和小分子补体抑制剂的另一挑战是由于补体级联依赖于大量蛋白-蛋白相互作用，因此相比于例如酶的口袋，相互作用表面通常大得多，并且涉及这样的相互作用的氨基酸残基通常不是邻近的。此外，接触表面通常是浅的并且缺乏使小的化合物能够紧密结合的任何沟槽。因此，其说明全部的生理学补体调节剂(包含蛋白酶抑制剂C1-Inh)是相对大的蛋白质。尽管存在上述蛋白质-药物、低分子量和小分子补体抑制剂的挑战，针对补体级联的不同组成部分的抑制的抗体片段(Fab)对于预防性、诊断性和治疗性临床应用可以是有利的。在需要快速清除、较高的组织穿透能力、缺乏Fc-介导的效应子功能(如CDC、ADCC和

吞噬作用)以及较低的免疫原性的情况下,这样的Fab分子是期望的。此外,Fab分子不形成可以触发过敏反应的交联的免疫复合物。

[0014] 在某些方面,本公开提供与补体级联中的蛋白质结合的抗体Fab片段。在一些实施方案中,抗体Fab片段与C1q蛋白结合。在一些实施方案中,抗体Fab片段包括重链和轻链,其中重链在第一重链域之后被截短。

[0015] 在优选的实施方案中,抗体Fab片段是抗-C1q抗体Fab片段。

[0016] 在一些实施方案中,抗体Fab片段可以通过本领域已知的任何适合的方法被制备。例如,可以使用任何适合的酶裂解和/或酶消化技术从任何全抗体(特别地全单克隆抗体)获得抗体Fab片段,如用半胱氨酸蛋白酶木瓜蛋白酶处理以产生抗体Fab片段。

[0017] 在一个实施方案中,通过使用涉及编码抗体可变区和恒定区的DNA的操作和再表达的重组DNA技术制备本发明的抗体Fab片段。标准分子生物学技术可以被用于按照所期望的修饰、添加或缺失另外的氨基酸或域。对可变区或恒定区的任何改变仍然被本文所使用的术语"可变"区和"恒定"区所包括。优选地,PCR被用于紧跟着编码C_H1的链间半胱氨酸的密码子引入终止密码子,使得C_H1域的翻译在链间半胱氨酸处终止。用于设计适合的PCR引物的方法是本领域公知的,并且抗体C_H1域的序列是容易获得的。在一些实施方案中,可以使用定点诱变技术引入终止密码子。

[0018] 在一些情况下,本发明的抗体Fab片段起始材料可以源自任何抗体同种型("类")(包含例如IgG、IgM、IgA、IgD和IgE)和其子类(包含例如IgG1、IgG2、IgG3和IgG4)。优选地,本发明的抗体Fab片段源自IgG1。

[0019] 在一些实施方案中,可以从任何物种(包含例如小鼠、大鼠、兔、猪、仓鼠、骆驼、美洲驼、山羊或人)获得抗体Fab片段起始材料。在优选的实施方案中,抗体Fab片段的重链和轻链来自鼠科IgG1。抗体Fab片段的部分可以从多于一个物种获得。例如,抗体片段可以是嵌合的或人源化的。在一个实例中,恒定区来自一个物种,并且可变区来自另一个物种。在另一个实例中,抗体Fab片段是人源化的。

[0020] 抗体片段起始材料也可以被修饰。在一个实例中,已经使用重组DNA工程技术产生了抗体片段的可变区。这样的工程化版本包含例如通过对天然抗体的氨基酸序列的插入、缺失或改变从天然抗体可变区产生的那些。该类型的具体实例包含含有来自一个抗体的至少一个CDR和可选的一个或更多个骨架氨基酸以及来自第二抗体的可变区域的残余部分的那些工程化的可变区域。

[0021] 在一些实施方案中,抗体Fab片段包括SEQ ID NO:1中提供的氨基酸序列的重链和SEQ ID NO:2中提供的氨基酸序列的轻链。在一些实施方案中,提供编码SEQ ID NO 1和2的氨基酸的DNA序列。在一个实施方案中,编码SEQ ID NO:1的核酸序列是SEQ ID NO:3。在另一个实施方案中,编码SEQ ID NO:2的核酸序列是SEQ ID NO:4。

[0022] 还公开了抗体Fab片段,其中重链和轻链包括分别与SEQ ID NO:1和SEQ ID NO:2的序列具有至少90%的一致性或相似性的序列。优选地,抗体Fab片段包括与SEQ ID NO:1具有至少90%、95%或98%的一致性或相似性的重链序列和与SEQ ID NO:2具有至少90%、95%或98%的一致性或相似性的轻链序列。

[0023] 在一些实施方案中,抗体Fab片段与人C1q、小鼠C1q、狗C1q、恒河猴C1q、食蟹猴C1q或大鼠C1q特异性结合。在一些实施方案中,抗体Fab片段与人C1q和小鼠C1q两者特异性结

合。在一些实施方案中，抗体Fab片段与人C1q和大鼠C1q两者特异性结合。在一些实施方案中，抗体Fab片段与人C1q和狗C1q两者特异性结合。在一些实施方案中，抗体Fab片段与人C1q和恒河猴C1q两者特异性结合。在一些实施方案中，抗体Fab片段与人C1q和食蟹猴C1q两者特异性结合。在一些实施方案中，抗体Fab片段与小鼠C1q和大鼠C1q两者特异性结合。在一些实施方案中，抗体Fab片段与小鼠C1q和狗C1q两者特异性结合。在一些实施方案中，抗体Fab片段与小鼠C1q和恒河猴C1q两者特异性结合。在一些实施方案中，抗体Fab片段与小鼠C1q和食蟹猴C1q两者特异性结合。在一些实施方案中，抗体Fab片段与大鼠C1q和狗C1q两者特异性结合。在一些实施方案中，抗体Fab片段与大鼠C1q和恒河猴C1q两者特异性结合。在一些实施方案中，抗体Fab片段与大鼠C1q和食蟹猴C1q两者特异性结合。在一些实施方案中，抗体Fab片段与狗C1q和恒河猴C1q两者特异性结合。在一些实施方案中，抗体Fab片段与狗C1q和食蟹猴C1q两者特异性结合。在一些实施方案中，抗体Fab片段与恒河猴狗C1q和食蟹猴C1q特异性结合。在一些实施方案中，抗体Fab片段与人C1q、小鼠C1q和/或大鼠C1q，以及下列中的至少一个结合：狗C1q、恒河猴C1q和食蟹猴C1q。

[0024] 在一些实施方案中，抗体Fab片段与人C1q和小鼠C1q两者结合。在其他实施方案中，抗体Fab片段与人C1q、小鼠C1q、大鼠C1q、狗C1q、恒河猴C1q和食蟹猴C1q结合。

[0025] 在一些实施方案中，抗体Fab片段与通过具有ATCC登录号PTA-120399的杂交瘤细胞系产生的抗体M1结合基本上相同的C1q表位。在一些情况下，抗体Fab片段抑制通过具有ATCC登录号PTA-120399的杂交瘤细胞系产生的单克隆抗体M1与人C1q或与小鼠C1q的结合。

[0026] 在一些实施方案中，本文提供与C1q的表位结合的人源化抗-C1q抗体Fab片段，所述C1q的表位与被本公开的另一个抗体结合的C1q表位相同或重叠。在某些实施方案中，与C1q的表位结合的人源化抗-C1q抗体Fab片段与被通过具有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Fab片段和本公开的另一个抗体竞争与C1q结合。在某些实施方案中，抗-C1q抗体Fab片段与通过具有ATCC登录号PTA-120399的杂交瘤细胞系产生的抗-C1q抗体M1或其抗-C1q结合片段竞争。

[0027] 由于本领域周知，抗体重链和轻链CDR3域在抗体对抗原的结合特异性/亲和力中发挥特别重要的作用，因此本公开的抗体Fab片段可以包括通过具有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CDR3。在一些实施方案中，抗体Fab片段还包括单克隆抗体M1的可变区的CDR2。在一些实施方案中，抗体Fab片段还包括单克隆抗体M1的可变区的CDR。在一些实施方案中，抗体Fab片段还可以包括CDR的任何组合。

[0028] 在一些实施方案中，抗体Fab片段已经被工程化以增加脑穿透性。在一些情况下，相比于对应的全长抗体，抗体Fab片段具有较好的脑穿透性。

[0029] 在一些实施方案中，抗体Fab片段仅具有一个结合位点。在一些实施方案中，抗体Fab片段与全C1q抗体(通过引用从美国专利号62/075793并入本文)对C1q具有相同的亲和力。在一些实施方案中，抗体Fab片段抑制补体级联的蛋白质，例如，C1q、C4、C2、C3转化酶、C3a、C5、C3b、C5b、C6、C7、C8和/或C9。

[0030] 在一些实施方案中，相比于抗体片段的对应的全长抗体，抗体片段在人体循环中具有较短的半衰期。

[0031] 在一些实施方案中，抗体Fab片段被直接注射进眼中。在一些实施方案中，抗体Fab片段被注射进眼中用于眼部疾病或病况的预防或治疗，并且通常可以通过眼部注射、眼内注射和/或玻璃体内注射被施用。其他施用方法也被使用，所述施用方法包含(但不限于)局部、肠胃外、皮下、腹膜内、肺内、鼻内和病灶内施用。肠胃外输注包含肌内、静脉内、动脉内、腹膜内或皮下施用。

[0032] 本发明的抗体Fab片段对于补体相关眼部病况(病理学涉及补体(包含经典途径和旁路途径)的全部眼部病况和疾病)(如，例如，黄斑变性疾病，如慢性开角型青光眼，急性闭角型青光眼，老年性黄斑变性(AMD)的全部阶段(包含干性和湿性(非渗出性和渗出性)形式(AMD-湿性))、地图状萎缩、脉络膜新生血管(CNV)、葡萄膜炎、糖尿病和其他缺血相关性视网膜病变、眼内炎和其他眼内新生血管疾病，如糖尿病黄斑水肿、病理性近视、希佩尔-林道病、眼组织胞浆菌病、视网膜中央静脉阻塞(CRVO)、角膜新生血管、视网膜新生血管、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、斯耶格伦干眼病、干性AMD、结节病、颞动脉炎、结节性多动脉炎以及多发性硬化)的预防和治疗是有用的。

[0033] 补体相关眼部病况的优选的组包含老年性黄斑变性(AMD)(包含非渗出性(湿性)和渗出性(干性或萎缩性)AMD)、脉络膜新生血管(CNV)、糖尿病视网膜病变(DR)和眼内炎。

[0034] 在一些实施方案中，抗体Fab片段对人C1q具有从10pM到20pM，或1pM到小于10pM的范围的解离常数(K_D)。在一些实施方案中，抗体Fab片段对小鼠C1q具有从1pM到200pM的范围的解离常数(K_D)。在一些实施方案中，抗体Fab片段与C1q特异性结合并且抑制C1q的生物活性。在一些实施方案中，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与正五聚蛋白-3结合，(6)C1q与C-反应性蛋白(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，(10)C1q与钙网蛋白结合，(11)C1q与凋亡细胞结合，或(12)C1q与神经细胞膜的组分结合。

[0035] 在一些实施方案中，生物活性是(1)经典补体激活途径的激活，(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)小神经胶质细胞激活，(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。

[0036] 在一些实施方案中，CH50溶血包括人CH50溶血、小鼠CH50溶血和/或大鼠CH50溶血。在一些实施方案中，抗体Fab片段能够中和从至少约50％到至少约95％的CH50溶血。在一些实施方案中，抗体Fab片段能够以少于150ng、少于100ng、少于50ng或少于20ng的剂量中和至少50％的CH50溶血。在一些实施方案中，抗体Fab片段结合C1q并且以从小于6:1至1:1或小于2:1至1:1的范围的结合化学计量抑制生物功能。

[0037] 在一些实施方案中，抗体Fab片段是人源化的。

[0038] 在其他实施方案中，本公开提供包括任何前述实施方案的核酸序列的分离的宿主细胞。在一些实施方案中，宿主包括克隆或表达载体(vector)，所述克隆或表达载体(vector)包括抗体Fab片段的核酸序列。在一些实施方案中，在适合于抗体Fab片段的表达的条件下培养含有表达载体(vector)和核酸的宿主细胞。在一些实施方案中，随后从宿主细胞(或宿主细胞培养基)回收抗体Fab片段。此外，提供含有与药学上可接受的载体

(carrier)组合的抗-C1q抗体Fab片段的药物组合物。本公开也提供了用于在本文所描述的任何方法中使用的含有抗-C1q抗体Fab片段的试剂盒。

[0039] 在一些情况下,本公开提供在需要这样的治疗的个体中治疗或预防与补体激活有关的疾病的方法,方法包括施用抗-C1q抗体Fab片段。

[0040] 在一些实施方案中,与补体激活有关的疾病是神经退行性疾病。在一些实施方案中,神经退行性疾病与突触或神经连接的丢失(如依赖于补体受体3(CR3)/C3或补体受体CR1的突触丢失)有关。在一些实施方案中,神经退行性疾病与病理活性依赖性突触修剪、通过小神经胶质细胞的突触吞噬作用有关。在一些实施方案中,神经退行性疾病与阿尔茨海默病、肌萎缩性侧索硬化、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、唐氏综合征、帕金森病和亨廷顿病有关。

[0041] 在一些实施方案中,与补体激活有关的疾病是炎性疾病、自身免疫疾病或代谢紊乱,所述炎性疾病、自身免疫疾病或代谢紊乱选自糖尿病、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、心肺分流手术期间的补体激活、皮肌炎、天疱疮、狼疮性肾炎及导致的肾小球肾炎和血管炎、心肺分流、心脏停搏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、抗磷脂综合征、慢性开角型青光眼、急性闭角型青光眼、黄斑变性疾病、老年性黄斑变性(AMD)、(AMD-湿性)、地图状萎缩脉络膜新生血管(CNV)、葡萄膜炎、糖尿病视网膜病变、缺血相关性视网膜病变、眼内炎、眼内新生血管疾病、糖尿病黄斑水肿、病理性近视、希佩尔-林道病、眼组织胞浆菌病、视神经脊髓炎(NMO)、视网膜中央静脉阻塞(CRVO)、角膜新生血管、视网膜新生血管、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、斯耶格伦干眼病、干性AMD、结节病、颞动脉炎、结节性多动脉炎、多发性硬化、异体移植、超急性排斥、血液透析、慢性阻塞性肺窘迫综合征(COPD)、哮喘、吸入性肺炎、多发性硬化、格林-巴利综合征、重症肌无力、大疱性类天疱疮或肌炎。

[0042] 在一些实施方案中,与补体激活有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、桥本甲状腺炎、阿狄森氏病、乳糜泻、克罗恩氏病、恶性贫血、寻常型天疱疮、白癜风、自身免疫性溶血性贫血、副肿瘤综合征、血管炎疾病、低补体血症荨麻疹性血管炎(HUV)、风湿性多肌痛、颞动脉炎、韦格纳肉芽肿病、多发性硬化、格林-巴利综合征、重症肌无力、大疱性类天疱疮或肌炎。

[0043] 在一些实施方案中,本公开提供了检测个体中的突触的方法,所述方法通过a)向个体施用抗-C1q抗体Fab片段,和b)检测与突触结合的抗体Fab片段,从而检测个体中的突触。在一些实施方案中,使用选自下列的成像技术检测与突触结合的抗体Fab片段:正电子发射断层扫描(PET)、X射线计算机断层扫描、单光子发射计算机断层扫描(SPECT)、计算机断层扫描(CT)和计算机轴向断层扫描(CAT)。在一些实施方案中,与突触结合的抗体Fab片段的检测提供个体中突触数量的定量测量,使得个体中突触的数量在一段时间段内被重复测量,并且个体中突触的丢失随着时间被检测,并且随着时间突触的丢失是神经退行性疾病或自身免疫疾病的治疗疗效的量度。

[0044] 在一些实施方案中,本公开提供检测生物样品中的突触的方法,所述方法通过a)

使生物样品与人源化抗-C1q抗体Fab片段接触，和b)检测与突触结合的抗体Fab片段，从而检测个体中的突触。在一些实施方案中，方法还包括在步骤a)之前的从个体获得生物样品的步骤。在一些实施方案中，生物样品包括活检标本、组织或细胞。在一些实施方案中，通过免疫荧光显微术、免疫细胞化学、免疫组织化学、ELISA、FACS分析、免疫沉淀反应或微型正电子发射断层扫描检测抗体Fab片段。

[0045] 如本文所使用的，“一致性”表示在对齐的序列中的任何特定位置，氨基酸残基在序列间是相同的。如本文所使用的，“相似性”表示在对齐的序列中的任何特定位置，氨基酸残基在序列间属于相似的类型。例如，亮氨酸可以置换异亮氨酸或缬氨酸。可以通常彼此置换的其他氨基酸包含，但不限于：

[0046] -苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸(具有芳族侧链的氨基酸)；

[0047] -赖氨酸、精氨酸和组氨酸(具有碱性侧链的氨基酸)；

[0048] -天门冬氨酸和谷氨酸(具有酸性侧链的氨基酸)；

[0049] -天门冬酰胺和谷氨酰胺(具有酰胺侧链的氨基酸)；以及

[0050] -半胱氨酸和甲硫氨酸(具有含硫侧链的氨基酸)。

[0051] 一致性和相似性程度可以被容易地计算(Computational Molecular Biology,Lesk,A.M.,ed.,Oxford University Press,New York,1988;Biocomputing.Informatics and Genome Projects,Smith,D.W.,ed.,Academic Press,New York,1993;Computer Analysis of Sequence Data,Part1,Griffin,A.M.,and Griffin,H.G.,eds.,Humana Press,New Jersey,1994;Sequence Analysis in Molecular Biology,von Heinje,G.,Academic Press,1987;和Sequence Analysis Primer,Gribskov,M.and Devereux,J.,eds.,M Stockton Press,New York,1991)。

[0052] 在一些实施方案中，抗体Fab片段在许多疾病或紊乱(如神经退行性疾病，如神经退行性疾病(如阿尔茨海默病、肌萎缩性侧索硬化、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、唐氏综合征、帕金森病和亨廷顿病))的检测或治疗中可以是有用的。在一些实施方案中，抗体Fab片段在炎性疾病、自身免疫疾病或代谢紊乱(如糖尿病、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、心肺分流手术期间的补体激活、皮肌炎、天疱疮、狼疮性肾炎及导致的肾小球肾炎和血管炎、心肺分流、心脏停搏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、抗磷脂综合征、慢性开角型青光眼、急性闭角型青光眼、黄斑变性疾病、老年性黄斑变性(AMD)、(AMD-湿性)、地图状萎缩脉络膜新生血管(CNV)、葡萄膜炎、糖尿病视网膜病变、缺血相关性视网膜病变、眼内炎、眼内新生血管疾病、糖尿病黄斑水肿、病理性近视、希佩尔-林道病、眼组织胞浆菌病、视神经脊髓炎(NMO)、视网膜中央静脉阻塞(CRVO)、角膜新生血管、视网膜新生血管、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、斯耶格伦干眼病、干性AMD、结节病、颞动脉炎、结节性多动脉炎、多发性硬化、异体移植、超急性排斥、血液透析、慢性阻塞性肺窘迫综合征(COPD)、哮喘、吸入性肺炎、重症肌无力、1型糖尿病、桥本甲状腺炎、阿狄森氏病、乳糜泻、克罗恩氏病、恶性贫血、寻常型天疱疮、白癜风、自身免疫性溶血性贫血、副肿瘤综合征、血管炎疾病、低补体血症荨麻疹性血管炎(HUV)、风湿性多肌痛、颞动脉炎、韦格纳肉芽肿病或多

发性硬化、格林-巴利综合征、重症肌无力、大疱性类天疱疮或肌炎)的检测或治疗中可以是有用的。

[0053] 在一些实施方案中,提供用于保护或治疗遭受突触丢失的不利影响的个体的方法。这些发现对于各种各样的临床病况(包含涉及突触丢失的神经退行性病况)具有广泛的意义,其中病况可以包含阿尔茨海默病;肌萎缩性侧索硬化;多发性硬化、青光眼、肌强直性营养不良、唐氏综合征;帕金森病、亨廷顿病等。通过使神经元与阻断补体的药剂(包含特定的组分,如C1q)接触来抑制突触的丢失。

[0054] 在一些实施方案中,提供确定受试者的发展与补体激活有关的疾病的风险的方法,所述方法包括:(a)向受试者施用抗-C1q抗体片段,其中抗体片段与可检测标记物偶联;(b)检测可检测标记物以测量受试者中C1q的量或位置;以及(c)将C1q的量或位置与参照比较,其中基于与参照相比的C1q的量的比较,表征发展与补体激活有关的疾病的风险。

[0055] 在一些实施方案中,可检测标记物包括核酸、寡核苷酸、酶、放射性同位素、生物素或荧光标记物。在一些实施方案中,使用生物素酰基化方法用辅酶(如生物素)标记抗体。当生物素被用作标记物时,通过添加蛋白质(如抗生物素蛋白或其细菌对应物抗生蛋白链菌素,其中两者中的任何一个可以与可检测标记(如上文提及的染料、荧光标记物(如荧光素)、放射性同位素或酶(如过氧化酶))结合)完成抗体的检测。

[0056] 在一些实施方案中,使用用于X射线、CT、MRI、超声、PET和SPECT的显像剂检测可检测标记物。

[0057] 在一些实施方案中,荧光标记物选自荧光素、罗丹明、花青染料或BODIPY。

[0058] 在一些实施方案中,提供降低受试者的发展与补体激活有关的疾病的风险的方法,所述方法包括施用抗-C1q抗体片段,其中抗-C1q抗体片段预防或降低发展与补体激活有关的疾病的风险,从而预防或降低与补体激活有关的未来的疾病的风险。

[0059] 在一些实施方案中,相比于抗体Fab片段对应的全长抗体,抗体Fab片段具有较短的半衰期。

[0060] 附图的简要说明

[0061] 图1包括两幅图片(A)和(B)。图1示出M1Fab具有与M1全抗体相同的结合亲和力。图1A示出与C1q结合的抗体的ELISA测量(抗-κ轻链检测)。图1B是示出M1全抗体(二价)和M1Fab(单价)的图像。

[0062] 图2示出M1Fab具有与M1全抗体相同的功能效能。图2示出RBC裂解的C1q活性抑制的标准功能测量。

[0063] 详细描述

[0064] 多克隆抗体和单克隆抗体在免疫系统对病原体的响应中被天然生成为免疫球蛋白(Ig)分子。在人血清中具有8mg/ml的浓度的主要形式,~150-kDa的IgG1分子由两个相同的~50-kDa的重链和两个相同的~25-kDa的轻链组成。

[0065] 在重组DNA技术出现之前,切割多肽序列的蛋白水解酶(蛋白酶)已经被用于分割抗体分子的结构以及确定分子的哪部分负责其各种功能。蛋白酶木瓜蛋白酶的限制性消化将抗体分子切割成三个片段。两个片段(被称为Fab片段)是相同的并且含有抗原结合活性。Fab片段对应于抗体分子的两个相同的臂,其中的每个包括与重链的V_H和C_H1域配对的完整的轻链。其他片段不含有抗原结合活性,但是最初观察到容易结晶,并且由于此原因,被命

名为Fc片段(可结晶片段)。当将Fab分子与IgG分子比较时,发现由于其较高的移动性和组织穿透能力、其减小的循环半衰期、其单价结合抗原而不介导抗体效应子功能的能力以及其较低的免疫原性,对于某些在体内的应用,Fab优于IgG。

[0066] Fab分子是具有通过恒定域C_H2和C_H3被缩短的重链的Ig分子的人造的～50-kDa的片段。两个异嗜性(V_L-V_H和C_L-C_H1)域相互作用构成Fab分子的两链结构的基础,所述两链结构通过C_L和C_H1之间的二硫桥被进一步稳定。Fab和IgG具有相同的抗原结合位点,所述抗原结合位点通过六个互补决定区(CDR)(来自V_L和V_H各三个(LCDR1、LCDR2、LCDR3和HCDR1、HCDR2、HCDR3))形成。CDR限定抗体的高变抗原结合位点。在LCDR3和HCDR3中发现了最高序列变异,在天然免疫系统中,LCDR3和HCDR3分别通过V_L和J_L基因或V_H、D_H和J_H基因的重排生成。LCDR3和HCDR3通常形成抗原结合位点的核心。连接并且显示六个CDR的保守区被称为骨架区。在可变域的三维结构中,骨架区形成通过外侧的高变CDR环以及通过内侧的保守的二硫桥连接的两个相对的反向平行的β-折叠的夹层(sandwich)。Fab和IgG的抗原结合位点的稳定性和多功能性的此独特的结合构成其在用于疾病的诊断、监测、预防和治疗的临床实践中成功的基础。

[0067] 在某些实施方案中,本公开提供抗-C1q抗体Fab片段,所述抗-C1q抗体Fab片段与包括重链(V_H/C_H1)和轻链(V_L/C_L)的C1q蛋白结合,其中抗-C1q抗体Fab片段具有六个互补决定区(CDR),来自V_L和V_H各三个(HCDR1、HCDR2、HCDR3和LCDR1、LCDR2、LCDR3)。抗体Fab片段的重链在IgG1的第一重链域(SEQ ID NO:1)之后被截短,并且包括下列氨基酸序列:

[0068]

QVQLVQSGAELKKPGASVKVSCKSS**GYHFTSYWMH**WVKQAPGQGLEWIG**VIHPN**
SGSINYNEKFESRVTITVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAG**ERDSTEVLPMDY**
WGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL
TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCD
KTHT。

[0069] SEQ ID NO:1的互补决定区(CDR)以加粗的以及加下划线的文本描述。

[0070] 与SEQ ID NO:1对应的核苷酸序列是SEQ ID NO:3:

[0071]

CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCAGGGGCTGAGCTGAAGAAGCCTGGGGCTTCAGTG
AAGGTTTCCTGCAAGTCTTCT**GGCTACCATTTCACCAGCTACTGGATGCAC**TG
GGTGAAGCAGGCCCCTGGACAAGGCCTTGAGTGGATTGGA**GTGATTCATCCTAA**
TAGTGGTAGTATTAACTACAATGAGAAGTTCGAGAGCAGAGTCACAATTACT
GTAGACAAATCCACCAGCACAGCCTACATGGAGCTCAGCAGCCTGAGATCTGAG
GACACGGCGGTCTATTATTGTGCAG**GAGAGAGAGATTCTACGGAGGTTCTCCC**
TATGGACTACTGGGGTCAAGGAACCACGGTCACCGTCTCCTCAGCGTCCACCAA
AGGCCCGTCCGTGTTTCCGCTGGCGCCGTCCTCCAAATCCACCTCCGGCGGCACC
GCGGCGCTGGGCTGCCTGGTGAAAGATTATTTTCCGGAACCGGTGACCGTGTCCT
GGAATTCCGGCGCGCTGACCTCCGGCGTGCATACCTTTCCGGCGGTGCTGCAGTC
CTCCGGCCTGTATTCCCTGTCCTCCGTGGTGACCGTGCCGTCCTCCTCCCTGGGCA
CCCAGACCTATATTTGCAATGTGAATCATAAACCGTCCAATACCAAAGTGGATAA
AAAAGTGGAACCGAAATCCTGCGATAAAACCCATACC。

[0072] SEQ ID NO:3的互补决定区(CDR)以加粗的以及加下划线的文本描述。

[0073] 抗体Fab片段的轻链域包括下列氨基酸序列(SEQ ID NO:2):

[0074]

DVQITQSPSSLSASLGERATINC**RASKSINKYLA**WYQQKPGKAPKLLIY**SGSTLQS**GI
PARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAMYYC**QQHNEYPLT**FGQGTKLEIKRTVAAPSVF
IFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTY
SLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC。

[0075] SEQ ID NO:2的互补决定区(CDR)以加粗的以及加下划线的文本描述。

[0076] 与SEQ ID NO:2对应的核苷酸序列是SEQ ID NO:4：

[0077]

GATGTCCAGATCACACAGTCTCCATCTTCCCTTTCTGCATCTCTCGGAGAAAGAG
CTACTATTAATTGC**AGGGCAAGTAAGAGCATTAACAAATACTTAGCC**TGGTAT
CAACAGAAACCTGGGAAAGCTCCTAAGCTCCTTATCTAC**TCTGGCTCCACTTTG**
CAATCTGGAATTCCAGCAAGGTTCAGTGGCAGTGGATCTGGTACAGATTTCACTC
TCACCATCAGTAGCCTGGAGCCTGAAGATTTTGCAATGTATTACTGT**CAACAACA**
TAATGAATACCCGCTCACGTTCGGTCAGGGGACCAAGCTGGAGATCAAACGAA
CTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCT
GGAACTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAG
TACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTCA
CAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCTGACGCTGA
GCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGG
GCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTTAG。

[0078] SEQ ID NO:4的互补决定区(CDR)以加粗的以及加下划线的文本描述。

[0079] 与SEQ ID NO:5对应的氨基酸序列是：

[0080]

QVQLVQSGAELKKPGASVKVSCKSS**GYHFTSYWMH**WVKQAPGQGLEWIG**VIHPN**
SGSINYNEKFESKATITVDKSTSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCAG**ERDSTEVLPMDY**

[0081] WGQGTSVTVSS（SEQ ID NO:5）。SEQ ID NO:5的互补决定区(CDR)以加粗的以及加下划线的文本描述。

[0082] 与SEQ ID NO:6对应的氨基酸序列是：

[0083]

QVQLVQSGAELKKPGASVKVSCKSS**GYHFTSYWMH**WVKQAPGQGLEWIG**VIHPN**
SGSINYNEKFESRATITVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAG**ERDSTEVLPMDY**

[0084] WGQGTTVTVSS（SEQ ID NO:6）。SEQ ID NO:6的互补决定区(CDR)以加粗的以及加下划线的文本描述。

[0085] 与SEQ ID NO:7对应的氨基酸序列是：

[0086]

QVQLVQSGAELKKPGASVKVSCKSS**GYHFTSYWMH**WVKQAPGQGLEWIG**VIHPN**
SGSINYNEKFESRVTITVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAG**ERDSTEVLPMDY**

[0087] WGQGTTVTVSS（SEQ ID NO:7）。SEQ ID NO:7的互补决定区(CDR)以加粗的以及加下划线的文本描述。

[0088] 与SEQ ID NO:8对应的氨基酸序列是：

[0089]

QVQLVQSGAELKKPGASVKVSCKSS**GYHFTSYWMH**WVRQAPGQGLEWIG**VIHPN**
SGSINYNEKFESRVTITVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAG**ERDSTEVLPMDY**

[0090] WGQGTTVTVSS（SEQ ID NO: 8）。SEQ ID NO:8的互补决定区(CDR)以加粗的以及加下划线的文本描述。

[0091] 与SEQ ID NO:9对应的氨基酸序列是：

[0092]

DVQITQSPSYLAASLGERATINC**RASKSINKYLA**WYQQKPGKTNKLLIY**SGSTLQS**GIPA
RFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAMYYC**QQHNEYPLT**FGQGTKLEIK（SEQ ID NO: 9）。

[0093] SEQ ID NO:9的互补决定区(CDR)以加粗的以及加下划线的文本描述。

[0094] 与SEQ ID NO:10对应的氨基酸序列是：

[0095]

DVQITQSPSSLSASLGERATINC**RASKSINKYLA**WYQQKPGKANKLLIY**SGSTLQS**GIPA
RFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAMYYC**QQHNEYPLT**FGQGTKLEIK（SEQ ID NO: 10）。

[0096] SEQ ID NO:10的互补决定区(CDR)以加粗的以及加下划线的文本描述。

[0097] 与SEQ ID NO:11对应的氨基酸序列是：

[0098]

DVQITQSPSSLSASLGERATINC**RASKSINKYLA**WYQQKPGKAPKLLIY**SGSTLQS**GIPA
RFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAMYYC**QQHNEYPLT**FGQGTKLEIK（SEQ ID NO: 11）。

[0099] SEQ ID NO:11的互补决定区(CDR)以加粗的以及加下划线的文本描述。

[0100] 与SEQ ID NO:12对应的氨基酸序列是：

[0101]

DIQLTQSPSSLSASLGERATINC**RASKSINKYLA**WYQQKPGKAPKLLIY**SGSTLQS**GIPA
RFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAMYYC**QQHNEYPLT**FGQGTKLEIK（SEQ ID NO: 12）。

[0102] SEQ ID NO:12的互补决定区(CDR)以加粗的以及加下划线的文本描述。

[0103] 提供用于保护或治疗遭受突触丢失的不利影响的个体的方法。在本文中证明，正常发育中的未成熟的星形细胞产生诱导神经元表达特定补体蛋白的信号，从而开启发育窗口，在发育窗口期间发生突触清除。发育中的这些蛋白的表达反映了发育性突触发生的时期，其在胚胎脑和成人脑中处于关闭，但在出生后脑中处于高水平。

[0104] 这些发现对于各种各样临床病况(特别是其中涉及突触丢失的神经退行性病况)具有广泛的意义。通过使神经元与补体途径的抑制剂或拮抗剂接触抑制突触丢失。例如，抑制剂可以阻断补体级联的激活，可以阻断神经元中特定补体蛋白的表达，可以干扰诱导补体激活的信号分子，可以上调神经元中补体抑制剂的表达，并且以其他的方式干扰突触丢失中补体的作用。防止突触丢失(例如，在成人脑中)的能力对于在各种各样的神经退行性病况中维持正常的神经元功能具有重要的意义。

[0105] 定义

[0106] 如本文说明书中所使用的，“一(a)”或“一(an)”可以意为一个(种)或更多个(种)。如本文的一条或多条权利要求中所使用的，当与词语“包括”共同使用时，词语“一(a)”或“一(an)”可以意为一个(种)或超过一个(种)。例如，对“抗体”的提及是对从一种到多种抗

体的提及，并且包含本领域技术人员已知的其的等同物等。如本文所使用的，“另一个(种)”可以意为至少第二个(种)或更多个(种)。

[0107] 术语“预防”是本领域公认的，并且当与病况(如癫痫病)关联使用时，在本领域中被很好地理解，并且包含组合物的施用，相对于未接受组合物的受试者，所述组合物的施用减少受试者中的医学病况的一种或更多种症状的频率或严重程度，或延迟受试者中的医学病况的一种或更多种症状的发作。因此，癫痫病的进展的预防包含，例如，相对于未接受治疗的对照群体，减缓或停止接受治疗的患者群体中神经变性的平均量，例如，按统计学和/或临床显著的量。类似地，神经退行性疾病的进展的预防包含相对于未接受治疗的患者，降低接受治疗的患者将发展伤病(如认知减退和/或记忆丧失)的可能性，或延迟伤病的发作。

[0108] 如本文所使用的，术语“受试者”指活的哺乳动物，并且可以与术语“患者”可互换地使用。哺乳动物的实例包含，但不限于，哺乳动物类的任何成员：人，非人灵长类动物(如黑猩猩以及其他类人猿和猴类)；家畜(如牛、马、绵羊、山羊、猪)；家养动物(如兔、狗和猫)；实验室动物(包含啮齿动物，如大鼠、小鼠和豚鼠)等。该术语不指示特定的年龄或性别。

[0109] 如本文所使用的，术语“治疗(treating)”或“治疗(treatment)”包含减少、阻止或逆转病况的症状、临床病征或潜在的病理以稳定或改善受试者的病况，或以减少受试者的病况将恶化到就好像受试者未接受治疗的可能性。

[0110] 针对主题治疗方法，术语化合物的“治疗有效的量”指制剂中的一种或多种化合物的量，当制剂作为期望的给药方案的一部分被施用(至哺乳动物(优选地人))时，其根据用于待治疗的紊乱或病况的临床可接受的标准或美容目的，例如，以适用于任何医学治疗的合理的利益/风险比，缓和症状、减轻病况或减缓疾病病况的发作。本文的治疗有效的量可以根据因素(如患者的疾病状况、年龄、性别和体重，以及抗体在个体中引起期望的响应的能力)变化。

[0111] 如本文所使用的，在本文所述的治疗方法之前，“具有”发展特定疾病、紊乱或病况的“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，并且可以已经表现出或可以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”指示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、紊乱或病况的发展相关联的可测量的参数。相比于没有这些风险因素中的一种或更多种的个体，具有这些风险因素中的一种或更多种的个体具有更高的发展特定疾病、紊乱或病况的可能性。

[0112] “慢性”施用指以连续模式而不是急性模式施用一种或多种药品，以便在延长的时间段内维持最初的治疗效果(活性)。“间歇”施用指不是连续施用而没有间断，而是实质上是循环的/周期性的治疗。

[0113] 如本文所使用的，与另一种化合物或组合物“联合”施用包含同时施用和/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，包含以不同的给药频率或间隔，以及使用相同的施用途径或不同的施用途径。

[0114] 突触丢失。突触是在两个神经元之间或在神经元和肌肉细胞之间的神经肌肉接点(NMJ)处形成的非对称的通讯连接。化学性突触经由神经递质的分泌实现细胞与细胞的通讯，而在电性突触中，信号通过缝隙连接(允许离子电流流动的特化的细胞间通道)传递。除了离子之外，调控突触功能的其他分子(如ATP和第二信使分子)可以通过缝隙连接孔扩散。在成熟的NMJ处，突触前膜和突触后膜通过含有形成基膜的胞外蛋白的突触间隙被分开。突

触小泡在突触前释放位点被聚集，递质受体在突触后膜处的连接褶中被聚集，并且神经胶质突起围绕神经末梢。

[0115] 突触发生是动态的过程。在发育期间，建立了比最终将要保留的突触更多的突触。因此，过量的突触输入的清除是突触回路成熟中的关键步骤。突触清除是涉及突触前伴侣和突触后伴侣之间的相互作用的竞争性过程。在CNS中，与NMJ一样，通过可以涉及共活性输入(coactive input)的选择性稳定和具有无关活性的输入的清除的过程，突触回路的发育的活性依赖重构发生。通过涉及突触的快速清除的动态过程，突触回路的解剖细化在个体轴突和树突层面上发生。随着轴突分支和重构，突触形成并且利用快速发生的突触清除剥离。

[0116] 除了正常的发育丢失之外，突触丢失是许多神经退行性疾病常见的早期病理学事件，并且与认知障碍最相关。在患有临床前期阿尔茨海默病(AD)的患者的脑中，和在转基因动物模型中的研究已经证明，突触损坏发生在疾病进展早期。脑中该突触连接的早期破坏造成神经元功能障碍，神经元功能障碍转而导致在数种神经退行性疾病中观察到的痴呆和/或运动障碍的典型症状。

[0117] 涉及AD和其他神经退行性疾病的数种分子在突触功能中发挥重要的作用。例如，AβPP在中枢和外周突触点具有优先的定位。在转基因小鼠中，AβPP的突变形式的异常表达不仅造成淀粉样蛋白沉积，而且造成广泛的突触损坏。该突触病理发生在早期，并且与可溶性Aβ1-42的水平而非与斑块形成有关。其中基因产物已经被证明与突触复合体密切有关的其他神经退行性疾病包含亨廷顿病(HD)和肌强直性营养不良(DM)。亨廷顿蛋白(Huntingtin)是具有与突触小泡蛋白突触素的分布非常类似的分布的膜结合蛋白。人脑中的研究在一些神经元的核周体、神经毡、膨体(varicosity)以及依据点状染色可能是神经末梢中检测到htt。丝氨酸/苏氨酸激酶(DMK)是DM基因的基因产物，其已经被发现定位在骨骼肌的神经肌肉接点的突触后以及心脏组织的闰盘的突触后。也在小脑、海马体、中脑和髓质中的突触点发现了DMK。

[0118] 抑制突触丢失造成突触的维持或降低的丢失，但是减少将会以另外的方式发生。如本文所使用的，通过突触丢失的“调控”，其意为按照具体情形中所需要的，丢失的突触数量被增强或被抑制。如本文所使用的，术语“突触丢失的调控剂”指能够改变突触丢失的药剂。调控剂包含，但不限于，“激活剂”和“抑制剂”两者。“激活剂”或“激动剂”是增强突触丢失的物质。相反地，“抑制剂”或“拮抗剂”减少突触丢失。降低可以是完全的或部分的。如本文所使用的，调控剂包含(不限于)C1q拮抗剂和激动剂。

[0119] 激动剂和拮抗剂可以包含蛋白质、核酸、碳水化合物、抗体或减少蛋白质的作用的任何其他分子。术语“类似物”在本文中被使用以指结构上类似感兴趣的分子但是已经通过用供替换的取代基替代参照分子的特定取代基，以靶向和受控的方式被修饰的分子。相比于起始分子，类似物可以展现相同、相似或改进的效用。合成和筛选类似物以鉴别具有改进的特性(如对特定的受体类型的较高的效能，或对靶向受体类型的较高的选择性和对其他受体类型的较低的活性水平)的已知化合物的变体是药物化学中众所周知的方法。

[0120] 补体。补体是与病原体或细胞的细胞表面相互作用以标记它们用于通过吞噬细胞的破坏的血浆蛋白的系统。补体系统由主要通过肝脏产生的大量不同的血浆蛋白组成。这些蛋白中的一些是蛋白酶的一类，称作酶原，其自身通过蛋白水解裂解被激活。因此，这些

酶原可以广泛地分布而不处于活性，直到被局部的病原体激活。因此补体系统通过触发的酶级联反应被激活。

[0121] 经典途径通过补体蛋白C1q与细胞表面或与结合到细胞表面的抗体直接结合被激活。C1q是460kDa的大型多聚体蛋白，由18个多肽链(6个C1q A链，6个C1q B链和6个C1q C链)组成。C1r和C1s补体蛋白与C1q尾区结合以形成C1复合物。C1q复合物与细胞的表面或与抗体Fe区的补体结合域的结合诱导C1q中的构象改变，所述构象改变导致C1r中的自催化酶活性的激活，然后其切割C1s以生成活性丝氨酸蛋白酶。一旦激活，C1s切割C4等，导致补体级联序列。最终该途径导致裂解和杀死感染的细胞的膜攻击复合物的形成。正常细胞(包含神经元)表达分子如CD59(其保护正常细胞免受来自膜攻击复合物的裂解或损坏)和C1抑制剂(CI-INH)(其使C1r和C1s从活性C1复合物解离)。

[0122] 各种补体蛋白通过神经元和神经胶质细胞在体外和在体内被表达。它们在脑中的功能是未知的。这些补体蛋白中的许多的表达通过血清或炎性细胞因子或在脑损伤之后被上调。培养基中的星形细胞已经被报道表达C1q、C1r、C1s、C4、C2和C3，以及更多的末端蛋白。神经元已经被报道表达C4和C3，但仅在脑损伤之后表达C1q。

[0123] 已经阐明通过三种途径可以引发补体级联：经典途径、旁路途径和凝集素途径。全部三种途径通过共同的交集(补体C3)汇合。C3是急性期反应物。尽管少量也通过激活的单核细胞和巨噬细胞产生，但是肝脏是主要的合成位点。细胞内发现大约200kD的单链前体(pro-C3)；eDNA显示其包括1663个氨基酸。这是通过蛋白水解裂解被加工成α亚基和β亚基，在成熟蛋白质中，所述α亚基和所述β亚基通过二硫键连接。Pro-C3含有22个氨基酸残基的信号肽，β链(645个残基)和α链(992个残基)。2个链通过4个精氨酸残基(不存在于成熟蛋白质中)连接。在旁路途径中，补体C3经历自发裂解，造成补体B与C3b结合。Ba亚基的扩散造成活性旁路途径C3转化酶(C3bBb)。C3bBb通过与备解素在汇合之前结合而被稳定。

[0124] 补体的抑制。已知许多分子抑制补体的活性。除了已知的化合物外，适合的抑制剂可以通过本文所描述的方法被筛选。如上文所描述的，正常细胞可以产生阻断补体活性的蛋白质，例如，CD59、C1抑制剂等。在本发明的一些实施方案中，通过上调编码这样的多肽的基因的表达抑制补体。

[0125] 阻断补体激活的分子的修饰也是本领域已知的。这样的分子包含(不限于)经修饰的补体受体，如可溶性CR1。CR1的最常见的同种异型的成熟蛋白质含有1998个氨基酸残基：1930个残基的胞外域，25个残基的跨膜区和43个残基的胞浆域。整个胞外域由被称作短一致性重复序列(SCR)或补体控制蛋白重复序列(CCPR)的30个重复单元组成，每个重复单元由60个至70个氨基酸残基组成。近期的数据表明C1q与人CR1特异性结合。因此，CR1识别全部三种补体调理素，即C3b、C4b和C1q。缺少跨膜域与和胞浆域的重组人CR1的可溶性形式(sCR1)已经被产生并且被证明保留了天然CR1的全部已知的功能。在缺血/再灌注损伤的动物模型中sCR1的心脏保护作用已经被证实。已经描述了人C1q受体(C1qR)的数个类型。这些包含普遍分布的60kDa至67kDa的受体，因为其结合C1q的胶原样(collagen-like)域而被称作cC1qR。该C1qR变体被证明是钙网蛋白；一种调控单核细胞吞噬作用的126kDa的受体。gC1qR不是膜结合分子，而是对C1q的球形区具有亲和力的分泌的可溶性蛋白，并且可以作为补体激活的液相调节剂。

[0126] 衰变加速因子(DAF)(CD55)由四个SCR加上能够进行大量的O-连接糖基化的丝氨

酸/苏氨酸富集域组成。OAF通过糖基磷脂酰肌醇(GPI)锚附连至细胞膜，并且通过OAF结合C4b和C3b的能力，其通过解离C3和C5转化酶起作用。OAF的可溶性形式(sDAF)已经被证明抑制补体激活。

[0127] C1抑制剂(丝氨酸蛋白酶抑制剂的“丝氨酸蛋白酶抑制蛋白(serpin)”家族的成员)是阻止液相C1激活的高度糖基化的血浆蛋白。C1抑制剂通过阻断C1r和C1s的活性位点并且使其从C1q解离来调节补体激活的经典途径。

[0128] 补体激活的肽抑制剂包含C5a(van Oostrum等，1996)；C5a C末端八肽(Kawai等，1992)；C5a His67修饰的C末端八肽类似物(Or等，1992)；C089(C5a六肽，Konteatis等，1994)；C3a C末端(Kretzschmar等，1992)；因子B相关六肽(Lesavre等，1982)；C1q B链螺旋区(Fryer等，1997)；DFP(氟代磷酸二异丙酯，Cole等，1997)；BCX-14 70(K-76类似物，Kaufman等，1995)；TKIX(K-76衍生物)，Sindelar等，1996)；K-76衍生物，Tanaka 1996)；FUT-175(甲磺酸萘莫司他，Inose等，1997)。

[0129] 其他抑制性分子包含脱氧半乳聚糖(Fucan)(Charreau等，1997)；补体抑素(Complestatin)(Momota等，1991)；核心蛋白聚糖(Decorin)(Krumdieck等，1992)；肝素(te Velthuis等，1996)；LU 1198(Gralinski等，1997)；CSPG(Kirschfink等，1997)；L-156,602(Tsuji等，1992)；CVFb(Jungi和McGregor，1979)；M5(Chen和Rael，1997)。

[0130] 术语“补体相关眼部病况”以最广泛的意义使用，并且包含病理学涉及补体(包含补体的经典途径和旁路途径，并且特别是旁路途径)的全部眼部病况。补体相关眼部病况包含(不限于)慢性开角型青光眼、急性闭角型青光眼、黄斑变性疾病(如老年性黄斑变性(AMD)的全部阶段(包含干性和湿性(非渗出性和渗出性)形式))、脉络膜新生血管(CNV)、葡萄膜炎、糖尿病和其他缺血相关性视网膜病变、以及其他眼内新生血管疾病(如糖尿病黄斑水肿、病理性近视、希佩尔-林道病、眼组织胞浆菌病、视网膜中央静脉阻塞(CRVO)、角膜新生血管、视网膜新生血管)、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、斯耶格伦干眼病、干性AMD、结节病、颞动脉炎、结节性多动脉炎和多发性硬化。

[0131] 补体相关眼部病况的优选的组包含老年性黄斑变性(AMD)(包含非渗出性(湿性)和渗出性(干性或萎缩性)AMD)、脉络膜新生血管(CNV)、糖尿病视网膜病变(DR)和眼内炎。

[0132] 术语“免疫球蛋白”(Ig)在本文中与“抗体”可互换地使用。本文的术语“抗体”以最广泛的意义使用，并且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(只要其展现期望的生物活性)。

[0133] 基本的4-链抗体单元是由两个相同的轻(L)链和两个相同的重(H)链组成的异四聚体糖蛋白。V_H和V_L配对在一起形成单个抗原结合位点。对于抗体的不同类的结构和性质，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 71and Chapter 6。

[0134] 来自任何脊椎动物物种的L链基于其恒定域的氨基酸序列可以被分配为两种明显不同的类型(称为kappa(“κ”)和lambda(“λ”))中的一种。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配为不同的类或同种型。存在五类免疫球蛋白：IgA、IgD、IgE、IgG和IgM，分别具有被命名为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类被进一步分为亚类(同种型)，

例如，人表达下列亚类：IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1和IgA2。免疫球蛋白的不同类的亚单元结构和三维构型是众所周知的，并且在例如Abbas et al.,Cellular and Molecular Immunology,4th ed.(W.B.Saunders Co.,2000)中被大体上描述。

[0135] “天然抗体”通常是约150000道尔顿的异四聚体糖蛋白，由两个相同的轻(L)链和两个相同的重(H)链组成。每个轻链通过一个共价二硫键与一个重链连接，而不同的免疫球蛋白同种型的重链中的二硫键的数量不同。每个重链和轻链还具有规则间隔排列的链内二硫桥。每个重链在一端具有可变域(V_H)，后面接着是多个恒定域。每个轻链在一端具有可变域(V_L)，在其的另一端具有恒定域；轻链的恒定域与重链的第一恒定域对齐，并且轻链可变域与重链的可变域对齐。特定氨基酸残基被认为在轻链可变域和重链可变域之间形成交界面。

[0136] “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被分离的分子或细胞，所述“分离的”分子或细胞通常在其被产生的环境中与所述至少一种污染分子或细胞缔合。优选地，分离的分子或细胞不和与产生环境相关的全部组分缔合。分离的分子或细胞所处的形式不同于其在自然界中被发现时所处的形式或状态。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Fab片段。在其他实施方案中，分离的细胞是产生本公开的抗-C1q抗体Fab片段的宿主细胞或杂交瘤细胞。

[0137] “分离的”抗体是已被鉴别、分离和/或从其产生环境的组分中被回收(例如，天然的或重组的)的抗体。优选地，分离的多肽不与来自其产生环境的全部其它污染组分缔合。来自其产生环境的污染组分，如重组转染细胞所导致的污染组分，是通常将干扰抗体的研究、诊断或治疗应用的材料，且其可以包含酶、激素、和其他蛋白质溶质或非蛋白质溶质。在优选的实施方案中，多肽将被纯化：(1)至按抗体重量计大于95％(如由例如Lowry法测定)，并且在一些实施方案中，至按重量计大于99％；(2)达到通过使用转杯式测序仪(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)达到同质性(在非还原或还原条件下通过SDS-PAGE使用考马斯亮蓝，或优选地银染色)。分离的抗体包含重组T-细胞内的原位抗体，因为抗体天然环境的至少一种组分将不存在。然而，分离的多肽或抗体通常将通过包含至少一个纯化步骤的方法被制备。

[0138] 抗体的“可变区”或“可变域”指抗体重链或轻链的氨基末端域。重链和轻链的可变域可以分别被称为“V_H”和“V_L”。这些域通常是抗体的最可变的部分(相对于同类的其他抗体)并且含有抗原结合位点。

[0139] 术语“可变”指抗体之间可变域的某些区段在序列上广泛地不同的事实。V域介导抗原结合，并且定义特定抗体对其特定抗原的特异性。然而，可变性不是均匀分布在可变域的整个跨度内。相反，在轻链可变域和重链可变域两者中，可变性集中在三个被称为高变区(HVR)的区段内。可变域的更高度保守的部分被称为骨架区(FR)。天然重链和轻链的可变域每个包括四个FR区，其主要采用β-折叠构型，通过形成环状连接的三个HVR连接，并且在一些情况下形成β-折叠结构的一部分。每个链中的HVR通过FR区保持相互靠近，并且与来自其他链的HVR一起促使形成抗体的抗原结合位点(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，但是展现出各种效应子功能，如抗体依赖

细胞毒性中抗体的参与。

[0140] 如本文所使用的，术语“CDR”或“互补决定区”旨在意为重链多肽和轻链多肽两者的可变区内发现的非连续的抗原结合位点。CDR已经由Kabat et al.,J.Biol.Chem.252:6609-6616(1977);Kabat et al.,U.S.Dept.of Health and Human Services,“Sequences of proteins of immunological interest”(1991)(本文中也称为Kabat 1991);由Chothia et al.,J.Mol.Biol.196:901-917(1987)(本文中也称为Chothia 1987);和MacCallum et al.,J.Mol.Biol.262:732-745(1996)描述，其中当彼此比较时，定义包含氨基酸残基的重叠和子集。不过，指代抗体或移植抗体或其变体的CDR的任一定义的应用旨在在本文所定义和使用的术语的范围内。包括如上文引用的参考文献中的每个所定义的CDR的氨基酸残基作为对照在下文表(X)中列出。表(X)中列出的CDR根据Kabat 1991被定义。

[0141] 如本文所使用的，术语“CDR-L1”、“CDR-L2”和“CDR-L3”分别指轻链可变区中的第一CDR、第二CDR和第三CDR。如本文所使用的，术语“CDR-H1”、“CDR-H2”和“CDR-H3”分别指重链可变区中的第一CDR、第二CDR和第三CDR。如本文所使用的，术语“CDR-1”、“CDR-2”和“CDR-3”分别指任一链的可变区的第一CDR、第二CDR和第三CDR。

[0142] 如本文所使用的，术语“单克隆抗体”指从基本上同质的抗体群体获得的抗体，即，该群体的单个抗体是相同的，除了可以少量存在的可能天然存在的突变和/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，其针对单一抗原位点。与通常包含针对不同决定簇(表位)的不同抗体的多克隆抗体制剂不同，每个单克隆抗体针对抗原上的单一决定簇。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被合成，不被其他免疫球蛋白污染。修饰语“单克隆”表示抗体的特征是从基本上同质的抗体群体获得的，而不被解读为需要通过任何特定的方法产生抗体。例如，有待根据本发明被使用的单克隆抗体可以通过多种技术被制造，包含，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，美国专利号4,816,567)、噬菌体展示技术(参见，例如，Clackson 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))和用于在具有编码人免疫球蛋白序列的部分或全部的人免疫球蛋白基因座或基因的动物中产生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);美国专利号5,545,807、5,545,806、5,569,825、5,625,126、5,633,425和5,661,016;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))。

[0143] 术语“全长抗体”、“完整抗体”或“全抗体”被可互换地使用来指处于其基本上完整的形式，与抗体片段不同的抗体。特别地，全抗体包含具有包含Fc区的重链和轻链的那些。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，完整抗体可以具有一种或更多种效应子功能。

[0144] “抗体片段”包括完整抗体的一部分，优选地，完整抗体的抗原结合区和/或可变区。抗体片段的实例包含Fab、Fab’、F(ab’)$_2$和Fv片段；双体；线性抗体(参见美国专利5,641,870，

[0145] 实施例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。

[0146] 抗体的木瓜蛋白酶消化产生两个相同的抗原结合片段(称为“Fab”片段)和剩余的“Fc”片段，命名反映了易于结晶的能力。Fab片段由整个L链和H链的可变区域(V_H)，以及一个重链的第一恒定域(C_H1)一起组成。对于抗原结合，每个Fab片段都是单价的，即其具有单个抗原结合位点。胃蛋白酶处理抗体产生单个大的F(ab’)$_2$片段，其大致对应于具有不同抗原结合活性的两个二硫键连接的Fab片段并且仍然能够交联抗原。Fab’片段不同于Fab片段之处在于C_H1域的羧基末端处具有少量附加的残基，其包含来自抗体铰链区的一个或更多个半胱氨酸。Fab’-SH是本文中对其中恒定域的一个或多个半胱氨酸残基携带游离的巯基的Fab’的命名。F(ab’)$_2$抗体片段最初作为Fab’片段对被产生，所述Fab’片段对之间具有铰链半胱氨酸。抗体片段的其他化学偶联也是已知的。

[0147] Fc片段包括通过二硫键结合在一起的两个H链的羧基末端部分。抗体的效应子功能由Fc区中的序列决定，该区还被在某些类型的细胞上发现的Fc受体(FcR)识别。

[0148] 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(包含天然序列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处的氨基酸残基，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期间，或通过重组工程化编码抗体的重链的核酸。相应地，完整抗体的组成可以包括移除全部K447残基的抗体群体、未移除K447残基的抗体群体和具有K447残基和不具有K447残基的抗体的混合物的抗体群体。用于本发明抗体中的适合的天然序列Fc区包含人IgG1、IgG2、IgG3和IgG4。

[0149] “天然序列Fc区”包括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区包含天然序列人IgG1Fc区(非A和A同种异型)；天然序列人IgG2Fc区；天然序列人IgG3Fc区；和天然序列人IgG4Fc区以及其天然存在的变体。

[0150] “变体Fc区”包括凭借至少一个氨基酸修饰(优选地一个或更多个氨基酸置换)与天然序列Fc区的氨基酸序列不同的氨基酸序列。优选地，相比于天然序列Fc区或母体多肽的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区或在母体多肽的Fc区中从约一个到约十个氨基酸置换，并且优选地从约一个至约五个氨基酸置换。本文的变体Fc区将优选地与天然序列Fc区和/或与母体多肽的Fc区具备至少约80％的同源性，并且最优选地与其具备至少约90％的同源性，更优选地与其具备至少约95％的同源性。

[0151] “Fc受体”或“FcR”描述与抗体的Fc区结合的受体。优选的FcR是天然序列人FcR。此外，优选的FcR是结合IgG抗体的受体(γ受体)，并且包含FcγRI、FcγRII和FcγRIII亚类的受体(包含这些受体的等位变体和选择性剪接形式)，FcγRII受体包含FcγRIIA(“激活

受体”)和FcγRIIB(“抑制受体”),FcγRIIA和FcγRIIB具有相似的氨基酸序列(主要在其胞浆域中不同)。激活受体FcγRIIA在其胞浆域中含有基于免疫受体酪氨酸的激活基序(“ITAM”)。抑制受体FcγRIIB在其胞浆域中含有基于免疫受体酪氨酸的抑制基序(“ITIM”)。(参见,例如,M. Daëron, Annu.Rev.Immunol.15:203-234(1997))。Ravetch and Kinet,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FcR进行了综述。其他FcR(包含将在未来被鉴别的那些)被本文的术语“FcR”所包括。FcR也可以增加抗体的血清半衰期。

[0152] 可以测定人FcRn高亲和力结合多肽在体内与FcRn的结合和血清半衰期,例如,在表达人FcRn的转基因小鼠或转染的人细胞系中,或在被施用了具有变体Fc区的多肽的灵长类动物中。WO 2004/42072(Presta)描述了具有与FcR增强或减弱的结合的抗体变体。还参见,例如,Shields et al.,J.Biol.Chem.9(2):6591-6604(2001)。

[0153] “Fv”是含有完整抗原识别和抗原结合位点的最小抗体片段。该片段由处于紧密、非共价方式缔合的一个重链可变区域和一个轻链可变区域的二聚体组成。从这两个域的折叠发散出六个高变环(3个环来自H链,3个环来自L链),六个高变环提供抗原结合的氨基酸残基,并赋予抗体以抗原结合特异性。然而,即使单个可变域(或Fv的一半,其只包括三个对抗原特异性的HVR)也具有识别和结合抗原的能力(虽然与整个结合位点相比,亲和力较低)。

[0154] “单链Fv”也简称为“sFv”或“scFv”,是包括VH和VL抗体域的抗体片段,所述VH和VL抗体域连接到单个多肽链上。优选地,sFv多肽还包括V_H域和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期望的结构。对于sFv的综述,参见Plückthun in The Pharmacology of Monoclonal Antibodies,vol.113,Rosenburg and Moore eds.,Springer-Verlag,New York,pp.269-315(1994)。

[0155] 抗体的“功能片段”包括完整抗体的一部分,其通常包含完整抗体的抗原结合区或可变区,或抗体的F区,所述F区保留或具有修饰的FcR结合能力。抗体片段的实例包含线性抗体、单链抗体分子和由抗体片段形成的多特异性抗体。

[0156] 术语“双体(diabodies)”指小抗体片段,其制备是通过用V_H域和V_L域之间的短接头(约5-10个残基)构建sFv片段(参见前述段落),使得实现V域的链间而不是链内配对,从而产生双价片段,即,具有两个抗原结合位点的片段。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域和V_L域存在于不同的多肽链上。双体在例如EP 404,097;WO 93/11161;Hollinger et al.,Proc.Nat'l Acad.Sci.USA 90:6444-48(1993)中被更详细地描述。

[0157] 如本文所使用的,“嵌合抗体”指这样的抗体(免疫球蛋白),其中重链和/或轻链的一部分与源自特定物种或属于特定抗体类或亚类的抗体中的对应序列相同或同源,而一个或多个链的残余部分与源自另一个物种或属于另一个抗体类或亚类的抗体中的对应序列以及这样的抗体的片段相同或同源,只要它们展现出期望的生物学活性(美国专利号4,816,567;Morrison et al.,Proc.Nat'l Acad.Sci.USA,81:6851-55(1984))。本文感兴趣的嵌合抗体包含PRIMATIZED®抗体,其中抗体的抗原结合区源自通过例如用感兴趣的抗原免疫猕猴产生的抗体。如本文所使用的,“人源化抗体”是“嵌合抗体”的子集。

[0158] 非人(例如,鼠科)抗体的“人源化”形式是含有源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),其中来自受者的HVR的残基被具有期望的特异性、亲和力和/或容量的来自非人物种(如小鼠、大鼠、兔或非人灵长类动物)的HVR(供者抗体)的残基替代。在一些情况下,人免疫球蛋白的FR残基被对应的非人残基替代。此外,人源化抗体可以包括未在受者抗体中或在供者抗体中发现的残基。可以进行这些修饰以进一步改善抗体性能,如结合亲和力。通常,人源化抗体将包括基本上全部的至少一个以及典型地两个可变域,可变域中全部的或基本上全部的高变环对应于非人免疫球蛋白序列的高变环,并且全部的或基本上全部的FR区是人免疫球蛋白序列的FR区,虽然FR区可以包含改进抗体性能(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残基取代。FR中的这些氨基酸置换的数量通常在H链上不超过6个,并且在L链上不超过3个。人源化抗体还将可选地包括免疫球蛋白恒定区(Fc)(通常是人免疫球蛋白的恒定区)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);Hurle and Gross,Curr.Op.Biotech.5:428-433(1994)和美国专利号6,982,321和7,087,409。

[0159] “人抗体”是具有这样的氨基酸序列的抗体,所述氨基酸序列对应于由人产生的抗体和/或已经使用任何用于制造如本文所公开的人抗体的技术制造的抗体的氨基酸序列。人抗体的此定义明确地排除了包括非人抗原结合残基的人源化抗体。可以使用本领域已知的各种技术(包含噬菌体展示文库)生产人抗体。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)中也描述了可用于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)。可以通过向转基因动物施用抗原来制备人抗体,所述转基因动物已被改造以响应抗原激发产生这样的抗体,但其内源性基因座已被破坏,例如,免疫的xenomice(参见,例如,关于XENOMOUSE™技术的美国专利号6,075,181和6,150,584)。另外参见,例如,关于经由人B细胞杂交瘤技术产生人抗体的Li et al.,Proc.Nat'l Acad.Sci.USA,103:3557-3562(2006)。

[0160] 当在本文中使用时,术语“高变区”、“HVR”或“HV”指在序列中是高变的和/或形成结构确定的环的抗体可变域的区。通常,抗体包括六个HVR;三个在VH中(H1、H2、H3),并且三个在VL中(L1、L2、L3)。在天然抗体中,H3和L3显示出六个HVR的最大差异,并且H3尤其被认为在赋予抗体精确特异性中发挥独特的作用。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(camelid antibody)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)。

[0161] 有多种HVR描述在使用中并被包括在本文中。是Kabat互补决定区(CDR)的HVR是基于序列可变性的,并且是最常用的(上述Kabat et al.)。相反,Chothia指结构环的位置

(Chothia and Lesk J.Mol.Biol.196:901-917(1987))。AbM HVR体现了Kabat CDR和Chothia结构环之间的折衷,并且被Oxford Molecular's AbM抗体建模软件所使用。"Contact"HVR基于对可获得的复合物晶体结构的分析。来自这些HVR中的每个的残基如下所示。

[0162]

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

[0163] HVR可以包括"延长的HVR",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(优选的实施方案)(H2)和93-102、94-102或95-102(H3)。对于这些延长的HVR定义中的每个,根据上述Kabat et al.对可变域的残基编号。

[0164] "骨架"或"FR"残基是除本文定义的HVR残基之外的那些可变域残基。

[0165] 短语"可变域残基Kabat编号"或"氨基酸位置Kabat编号"及其变形,指在上述Kabat et al.中被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对应于可变域的FR或HVR的缩短或插入的较少的或附加的氨基酸。例如,重链可变域可以包含在H2的残基52之后的单个氨基酸插入(根据Kabat的残基52a)并且在重链FR残基82之后的插入残基(例如,根据Kabat的残基82a、82b和82c等)。对于给定的抗体,残基的Kabat编号可以通过将抗体序列的同源区与"标准"Kabat编号的序列比对来确定。

[0166] 当提及可变域中的残基(大约是轻链的残基1-107和重链的残基1-113)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中的残基时,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)。"如Kabat中的EU索引"指人IgG1EU抗体的残基编号。除非本文中另外规定,对抗体的可变域中的残基编号的提及意为依据Kabat编号系统的残基编号。除非本文中另外规定,对抗体恒定域中的残基编号的提及意为依据EU编号系统的残基编号(例如,参见,美国专利公布号2010-280227)。

[0167] 如本文所使用的,"受体人骨架"是包括源自人免疫球蛋白骨架或人共有骨架的VL骨架或VH骨架的氨基酸序列的骨架。"源自"人免疫球蛋白骨架或人共有骨架的受体人骨架可以包括与其相同的氨基酸序列,或者其可以含有预先存在的氨基酸序列改变。在一些实施方案中,预先存在的氨基酸改变的数量是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、或2个或更少。在预先存在的氨基酸改变存在于VH中的情况下,优选的那些改变仅发生在位置71H、73H和78H中的三个、两个或一个

处;例如,那些位置处的氨基酸残基可以是71A、73T和/或78A。在一个实施方案中,VL受体人骨架在序列上与VL人免疫球蛋白骨架序列或人共有骨架序列相同。

[0168] “人共有骨架”是代表人免疫球蛋白VL或VH骨架序列的选择中最普遍存在的氨基酸残基的骨架。通常,人免疫球蛋白VL或VH骨架序列的选择来自可变域序列的亚组。通常,序列的亚组是如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。其实例包含,对于VL,亚组可以是如上述Kabat et al.中的亚组kappa I、kappa II、kappa III或kappa IV。此外,对于VH,亚组可以是如上述Kabat et al.中的亚组I、亚组II或亚组III。

[0169] 在特定位置处的“氨基酸修饰”指特定残基的置换或缺失,或特定残基附近的至少一个氨基酸残基的插入。特定残基“附近的”的插入意为在其一个至两个残基内的插入。插入可以是特定残基的N末端或C末端。本文中优选的的氨基酸修饰是置换。

[0170] “亲和力成熟的”抗体是在其一个或更多个HVR中具有一个或更多个改变的抗体,与不具备那些一个或多个改变的亲代抗体相比,所述改变造成抗体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标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域和VL域改组的亲和力成熟。HVR和/或骨架残基的随机诱变由例如Barbas et al.Proc Nat.Acad.Sci.USA 91:3809-3813(1994);Schier et al.Gene169:147-155(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)描述。

[0171] 如本文所使用的,术语“特异性识别”或“特异性结合”指在包含生物分子的异质分子群体存在的情况下,对于确定靶标的存在是决定性的可测量的和可重现的相互作用(如靶标和抗体之间的吸引或结合)。例如,与靶标或表位特异性或优先结合的抗体是这样的抗体,相比于所述抗体与其他靶标或靶标的其他表位的结合,所述抗体以较大的亲和力、抗体亲抗原性,更容易地和/或以更长的持续时间结合该靶标或表位。还被理解地是,例如,与第一靶标特异性或优先结合的抗体(或部分)可以或可以不与第二靶标特异性或优先结合。同样地,“特异性结合”或“优先结合”不一定要求(尽管其可以包含)排外地结合。与靶标特异性结合的抗体可以具有至少约10^3M^{-1}或10^4M^{-1},有时约10^5M^{-1}或10^6M^{-1},在其它实例中约10^6M^{-1}或10^7M^{-1},约10^8M^{-1}至10^9M^{-1},或约$10^{10}M^{-1}$至$10^{11}M^{-1}$或更高的缔合常数。各种免疫测定方式可以被用来选择与特定蛋白进行特异性免疫反应的抗体。例如,固相ELISA免疫测定被常规用于选择与蛋白质进行特异性免疫反应的单克隆抗体。对于可以被用于确定特异性免疫反应性的免疫测定方式和条件的描述,参见,例如,Harlow and Lane(1988)Antibodies,A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor Publications,New York。

[0172] 如本文所使用的,补体蛋白和第二蛋白质之间的“相互作用”包括(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、减少或完全消除两个蛋白质之间的相互作用时,抗体“抑制”两个蛋白质之间的“相互作用”。当本公开的抗体或其片段与两个蛋白质中的一个结合时,抗体或其片段“抑制”两个蛋白质之间的“相互作用”。

[0173] “阻断”抗体、“拮抗剂”抗体、“抑制性”抗体或“中和”抗体是抑制或降低其结合的抗原的一种或更多种生物活性(如与一种或更多种蛋白质的相互作用)的抗体。在一些实施方案中,阻断抗体、拮抗剂抗体、抑制性抗体或“中和”抗体基本上或完全地抑制抗原的一种或更多种生物活性或相互作用。

[0174] 抗体“效应子功能”指归于抗体的Fc区(天然序列Fc区或氨基酸序列变体Fc区)的那些生物活性,并且随抗体同种型而不同。

[0175] 如本文所使用的,术语“亲和力”指两个作用者(agent)(例如,抗体和抗原)的可逆的结合的平衡常数,并且被表示为解离常数(KD)。亲和力可以比抗体对不相关氨基酸序列的亲和力大至少1倍,大至少2倍,大至少3倍,大至少4倍,大至少5倍,大至少6倍,大至少7倍,大至少8倍,大至少9倍,大至少10倍,大至少20倍,大至少30倍,大至少40倍,大至少50倍,大至少60倍,大至少70倍,大至少80倍,大至少90倍,大至少100倍,或大至少1000倍,或更大。抗体对靶标蛋白的亲和力可以是,例如,从约100纳摩尔(nM)到约0.1nM,从约100nM到约1皮摩尔(pM),或从约100nM到约1飞摩尔(fM)或更多。如本文所使用的,术语“抗体亲抗原性”指在稀释后,两个或更多个作用者的复合物对解离的抵抗力。对于抗体和/或抗原结合片段,术语“免疫反应性”和“优先结合”在本文中被可互换地使用。

[0176] 术语“结合”指两个分子之间由于,例如共价、静电、疏水和离子和/或氢键相互作用(包含相互作用如盐桥和水桥)的直接缔合。主题抗-C1s抗体与补体C1s蛋白内的表位特异性结合。“特异性结合”指具有至少约10^{-7}M或更大(例如,5×10^{-7}M、10^{-8}M、5×10^{-8}M以及更大)的亲和力的结合。“非特异性结合”指具有小于约10^{-7}M的亲和力的结合,例如,具有10^{-6}M、10^{-5}M、10^{-4}M等的亲和力的结合。

[0177] 如本文所使用的,术语“k_{on}”意指抗体与抗原的缔合的速率常数。

[0178] 如本文所使用的,术语“k_{off}”意指抗体从抗体/抗原复合物上解离的速率常数。

[0179] 如本文所使用的,术语“K_D”意指抗体-抗原相互作用的平衡解离常数。

[0180] 如本文所使用的,对于肽、多肽或抗体序列,“氨基酸序列一致性百分比(%)”和“同源性”指在对序列进行比对,并且引入缺口(如果必要)以实现最大序列一致性百分比,并且不考虑任何保守取代作为序列一致性的一部分之后,候选序列中与特定肽或多肽序列中的氨基酸残基相同的氨基酸残基的百分比。为确定氨基酸序列一致性百分比目的的比对可以以本领域技术之内的各种方式实现,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。本领域技术人员可以确定用于测量比对的适当的参数,包含实现在所比较的序列的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。

[0181] “生物样品”包括从个体获得的各种各样的样品类型,并且可以被用于诊断或监测测定。定义包括生物来源的血液和其他液体样品,固态组织样品(如活检标本或组织培养物或源自其的细胞)以及其子代。定义还包含在获得后已经被以任何方式操纵的样品,如通过用试剂处理、溶解或某些组分(如多核苷酸)的富集。术语“生物样品”包括临床样品,并且也包含培养物中的细胞、细胞上清液、细胞裂解物、血清、血浆、生物流体和组织样品。术语“生物样品”包含尿液、唾液、脑脊髓液、间质液、眼内液、滑液、血液成分(如血浆和血清)等。术语“生物样品”也包含固态组织样品、组织培养物样品和细胞样品。

[0182] “分离的”核酸分子是被鉴别的并且从至少一种污染核酸分子分离的核酸分子,所

述“分离的”核酸分子通常在其被产生的环境中与所述至少一种污染核酸分子缔合。优选地，分离的核酸不和与产生环境有关的全部组分缔合。编码本文的多肽和抗体的分离的核酸分子所处的形式不同于其在自然界中被发现时所处的形式或状态。因此，分离的核酸分子不同于细胞中天然存在的编码本文的多肽和抗体的核酸。

[0183] 如本文所使用的，术语“载体(vector)”意指能够转运已经与其连接的另一核酸的核酸分子。一种类型的载体(vector)是“质粒”，其指环状双链DNA，附加的DNA区段可以被连接到其中。另一种类型的载体(vector)是噬菌体载体(vector)。另一种类型的载体(vector)是病毒载体(vector)，其中附加的DNA区段可以被连接到病毒基因组中。某些载体(vector)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(vector)和游离型哺乳动物载体(vector))。其他载体(vector)(例如，非游离型哺乳动物载体(vector))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，并且从而与宿主基因组一同被复制。此外，某些载体(vector)能够指导与其可操作地连接的基因的表达。这样的载体(vector)在本文中被称为“重组表达载体(vector)”，或者被简单地称为“表达载体(vector)”。通常，在重组DNA技术中有用的表达载体(vector)常常是质粒的形式。在本说明书中，“质粒”和“载体(vector)”可以可互换地被使用，因为质粒是载体(vector)的最常用形式。

[0184] 如在文本中可互换地使用的，“多核苷酸”或“核酸”指任何长度的核苷酸的聚合物，并且包含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/或它们的类似物，或者可以通过DNA或RNA聚合酶或者通过合成反应被并入到聚合物中的任何底物。多核苷酸可以包括修饰的核苷酸，如甲基化的核苷酸和它们的类似物。对核苷酸结构的修饰(如果存在)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组分中断。多核苷酸可以包括合成后进行的一个或多个修饰，如缀合至标记物。其他类型的修饰包含，例如，“帽”，用类似物取代天然存在的核苷酸中的一个或更多个，核苷酸间修饰如，例如，具有不带电荷的键(例如，膦酸甲酯、磷酸三酯、氨基磷酸酯、氨基甲酸酯等)和具有带电荷的键(例如，硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯等)的那些、含有悬垂部分(pendant moieties)的那些，如，例如，蛋白质(例如，核酸酶、毒素、抗体、信号肽、聚-L-赖氨酸等)、具有嵌入剂(例如，吖啶、补骨脂素等)的那些、含有螯合剂(例如，金属、放射性金属、硼、氧化型金属等)的那些、含有烷化剂的那些、具有修饰的键(例如，α异头核酸等)的那些，以及一种或多种多核苷酸的未修饰形式。此外，通常存在于糖类中的任何羟基基团可以被，例如，膦酸酯基团、磷酸酯基团替代，被标准保护基团保护，或者被活化以制备与附加的核苷酸的附加的键，或者可以被缀合至固体或半固体支持物。5’和3’末端的OH可以被磷酸化或者可以被胺或从1到20个碳原子的有机加帽基团部分取代。其他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，包含，例如，2’-O-甲基-，2’-O-烯丙基-，2’-氟-或2’-叠氮基-核糖，碳环糖类似物，α-异头糖，差向异构糖(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(如甲基核糖苷)。一个或更多个磷酸二酯键可以被替代性的连接基团替代。这些替代性的连接基团包含，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_2(“酰胺化物”)、P(O)R、P(O)OR’、CO或CH_2(“甲缩醛(formacetal)”)替代的实施方案，其中每个R或R’独立地是H或取代的或未取代的可选地含有醚(-O-)键、芳

基、烯基、环烷基、环烯基或芳烷基的烷基(1-20个C)。多核苷酸中全部的键无需是相同的。前述的描述适用于本文提及的全部多核苷酸,包含RNA和DNA。

[0185] “宿主细胞”包含可以作为或已经作为用于整合多核苷酸插入的一个或多个载体(vector)的受者的个体细胞或细胞培养物。宿主细胞包含单一宿主细胞的子代,并且该子代由于自然的、偶然的或故意的突变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)。宿主细胞包含用本发明的一种或多种多核苷酸在体内转染的细胞。

[0186] 如本文所使用的,“载体(carrier)”包含在采用的剂量和浓度下对于暴露于其的细胞或哺乳动物无毒的药学上可接受的载体(carrier)、赋形剂或稳定剂。通常生理学上可接受的载体(carrier)是水性pH缓冲溶液。生理学上可接受的载体(carrier)的实例包含缓冲液(如磷酸盐、柠檬酸盐和其他有机酸);包含抗坏血酸的抗氧化剂;低分子量(少于约10个残基)多肽;蛋白质,如血清白蛋白、明胶或免疫球蛋白;亲水性聚合物(如聚乙烯吡咯烷酮);氨基酸(如甘氨酸、谷氨酰胺、天门冬酰胺、精氨酸或赖氨酸);单糖、二糖和其他碳水化合物(包含葡萄糖、甘露糖或糊精);螯合剂(如EDTA);糖醇(如甘露糖醇或山梨糖醇);成盐平衡离子(如钠);和/或非离子表面活性剂(如TWEEN™、聚乙二醇(PEG)和PLURONICS™)。

[0187] 如本文所使用的,术语“约”指本技术领域的技术人员易于知晓的各个值的通常误差范围。本文对“约”某个数值或参数的提及包含(并描述了)针对该数值或参数本身的实施方案。

[0188] 除非另外限定,否则本文所使用的全部技术术语和科学术语具有与本发明所属领域的普通技术人员通常理解的相同的含义。虽然与本文所描述的那些相似或等同的任何方法或材料也可以被用在本发明的实践或测试中,但是现在描述优选的方法和材料。本文提到的全部出版物均通过引用被并入本文,以公开和描述与所引用的出版物相关的方法和/或材料。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)中所描述的广泛使用的方法。

[0189] 治疗方法

[0190] 本发明的方法通过施用补体的拮抗剂的药剂,提供对本文所公开的疾病的免疫应答的调控。例如,不受理论的束缚,在发育期间,未成熟的星形细胞诱导神经元中C1q蛋白的表达。炎症介质(如补体因子)在健康的脑组织中通常以非常低的水平被正常表达,但是可以通过各种各样对脑的攻击(如感染、局部缺血和损伤)而被快速诱导。C1q、C1r和C1s的激活有助于炎症应答,其导致突触丢失,伴随着癫痫发作和癫痫发作相关的神经元损坏的产生和重现。在神经退行性疾病的发展过程期间,C1q、C1r和C1s的过表达可以与同样造成炎症的补体激活的信号(例如,β-淀粉样蛋白、APP、细胞因子(如IFNγ、TNFα)等)耦合。

[0191] 通过施用抑制补体激活的药剂,原本将要被丢失的突触可以被维持。这样的药剂包含抗-C1q抗体Fab片段抑制剂,上调天然补体抑制剂的表达的药剂、下调神经元中C1q、C1r或C1s合成的药剂、阻断补体激活的药剂、阻断补体激活信号的药剂等。

[0192] 方法促进与突触丢失有关的病况中神经元功能的改进的维持。相对于未经治疗的患者,神经连接的维持提供神经退行性疾病中功能的改进。突触丢失的预防可以包括在超过1天、2天、3天、4天、5天、6天或至少一周的时间段,相对于缺乏这样的治疗对照至少可测量的改进,例如突触数量的至少10%的改进、至少20%的改进、至少50%的改进或更多。

[0193] 优选地,本发明的药剂以减少突触丢失同时最小化任何副作用的剂量被施用。预期组合物将被获得并且在医师的指导下被用于在体内使用。治疗制剂的剂量将根据疾病的性质、施用频率、施用方式、从宿主清除药剂等广泛变化。

[0194] 待给予特定患者的治疗组合物的有效量将取决于各种各样的因素,其中的数种将因患者而异。利用普通技能,有能力的临床医师将能够在常规临床试验过程中调整特定治疗组合物或显像组合物的剂量。

[0195] 治疗剂(例如,补体抑制剂、基因表达激活剂等)可以被并入用于通过与适当的药学上可接受的载体(carrier)或稀释剂组合治疗施用的各种各样的制剂,并且可以被配制成固态、半固态、液态或气态形式的制剂,如片剂、胶囊剂、粉剂、颗粒剂、软膏剂、溶液、栓剂、注射剂、吸入剂、凝胶剂、微球和气雾剂。照此,化合物的施用可以以各种各样的方式实现,包含口、颊、直肠、肠胃外、腹膜内、皮内、经皮、鞘内、鼻、气管内等施用。活性剂在施用后可以是全身性的,或通过区域性施用、壁内施用的使用或植入物的使用可以是局域的,所述植入物起作用以维持植入位点处的活性剂量。

[0196] 例如,用于通过血脑屏障(BBB)的药物递送的一个策略需要通过渗透手段(如甘露糖醇或白三烯)或通过使用血管活性物质(如缓激肽)以生物化学的方式破坏BBB。使用BBB开放以靶向特定药剂的可能性也是一种选择。当组合物通过血管内注射被施用时,BBB破坏剂可以与本发明的治疗组合物共同施用。穿过BBB的其他策略可能需要使用内源性转运系统,包含载体(carrier)介导的转运体(如葡萄糖和氨基酸载体(carrier)),胰岛素或转铁蛋白的受体介导的转胞吞作用以及主动外排转运体(如p-糖蛋白)。主动转运部分也可以被

缀合至治疗化合物或显像化合物用于在本发明中使用以便利跨过血管的上皮壁的转运。可替代地,BBB之后的药物递送是通过治疗剂或显像剂的直接鞘内递送至颅,如通过Ommaya储液囊。

[0197] 根据期望的制剂,药物组合物可以包含稀释剂的药学上可接受的非毒性载体(carrier),其被定义为通常用于配制用于动物或人施用的药物组合物的运载体(vehicle)。选择稀释剂以使得不影响组合的生物活性。这样的稀释剂的实例是蒸馏水、缓冲水、生理盐水、PBS、林格氏溶液、葡萄糖溶液和汉克氏溶液。此外,药物组合物或制剂可以包含其他载体(carrier)、佐剂或非毒性、非治疗性、非免疫原性稳定剂、赋形剂等。组合物还可以包含附加的物质以接近生理条件,如pH调节剂和缓冲剂、毒性调节剂、湿润剂和去垢剂。

[0198] 组合物也可以包含各种各样的稳定剂中的任何一种,如以抗氧化剂为例。当药物组合物包含多肽时,多肽可以与各种众所周知的增强多肽的体内稳定性,或者以另外的方式增强其药理学性质(例如,增加多肽的半衰期,降低其毒性,增强溶解性或摄取)的化合物复合。这样的修饰或复合剂的实例包含硫酸盐、葡糖酸盐、柠檬酸盐和磷酸盐。组合物的多肽也可以与增强它们的体内特性的分子复合。这样的分子包含,例如,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。

[0199] 关于适合用于各种各样类型的施用的制剂的进一步指导可以在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)。

[0200] 药物组合物可以被施用用于预防疾病的治疗和/或治疗性治疗。活性成分的毒性和治疗疗效可以根据标准制药学程序在细胞培养物和/或实验动物中被确定,包含,例如,确定LD_{50}(对群体的50%致死的剂量)和ED_{50}(在群体的50%中治疗上有效的剂量)。毒性作用和治疗作用之间的剂量比是治疗指数,并且其可以表示为比值LD_{50}/ED_{50}。展现大的治疗指数的化合物是优选的。

[0201] 从细胞培养和/或动物研究获得的数据可以被用在配制用于人的剂量范围中。活性成分的剂量通常排列在包含具有低毒性的ED_{50}的循环浓度范围内。根据采用的剂型和利用的施用途径,剂量可以在该范围内变化。

[0202] 本文所描述的药物组合物可以以多种不同的方式被施用。实例包含经由口、鼻内、直肠、局部、腹膜内、静脉内、肌内、皮下(subcutaneous)、皮肤下(subdermal)、经皮、鞘内和颅内方法施用含有药学上可接受的载体(carrier)的组合物。

[0203] 对于口服施用,活性成分可以以固体剂型(如胶囊剂、片剂和粉剂),或者以液体剂型(如酏剂、糖浆剂和混悬剂)被施用。一种或多种活性组分可以与无活性成分和粉状载体(carrier)(如葡萄糖、乳糖、蔗糖、甘露糖醇、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)一起被包封在明胶胶囊中。可以被添加以提供期望的颜色、味道、稳定性、缓冲能力、分散性或其他已知的期望的特征的附加的无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作压缩片剂。片剂和胶囊剂两者都可以被制造成持续释放产品,以在数小时时间段内提供药品的连续释放。压缩片剂可以被包覆糖衣或膜,以掩盖任何令人不快的味道,并且保护片剂免受空气的影响,或者可以包覆肠溶衣,用于在胃肠道中选择性分解。口服施用的液体剂型可以

含有着色剂和风味剂,以增加患者的接受程度。

[0204] 适合于肠胃外施用的制剂包含水性和非水性的、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;以及水性和非水性无菌混悬液,其可以包含悬浮剂、增溶剂、增稠剂、稳定剂和防腐剂。

[0205] 用于配制药物组合物的组分优选地是高纯度的,并且基本上不含可能有害的污染物(例如,至少国家食品(National Food,NF)级,通常至少分析级,并且更典型地至少药用级)。此外,预期用于体内使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被合成,得到的产物通常基本不含任何可能的有毒物,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。

[0206] 本发明的组合物可以使用任何医学上适当的程序被施用,例如血管内(静脉内、动脉内、毛细血管内)施用、注射进入脑脊髓液、腔内或直接注射在脑中。根据已知的技术,鞘内施用可以通过使用Ommaya储液囊被实行。(F.Balis et al.,Am J.Pediatr.Hematol.Oncol.11,74,76(1989))。

[0207] 在治疗剂被局部施用在脑中的情况下,用于施用本发明的治疗组合物的一种方法是通过任何适合的技术沉积进入或靠近位点(如通过直接注射(如果需要,通过注射器的立体定位辅助)或通过将Ommaya储液囊的尖端放置进腔或包囊内)用于施用。可替代地,对流增强(convection-enhanced)递送导管可以被直接植入位点内、植入天然的或手术创造的包囊内、或植入正常的脑物质内。这样的对流增强的药物组合物递送装置大大改进了组合物遍及脑物质的扩散。这些递送装置的植入导管利用高流速微输注(具有在约0.5μl/分钟至15.0μl/分钟的范围的流量)而非扩散流,以将治疗组合物递送至脑和/或肿瘤块。这样的装置在美国专利号5,720,720中被描述,其通过引用被全部并入本文。

[0208] 待给予特定患者的治疗组合物的有效量将取决于各种各样的因素,其中的数种将因患者而异。有能力的临床医师将能够确定施用至患者的治疗剂的有效量。药剂的剂量将取决于治疗、施用途径、治疗剂的性质、患者对治疗剂的敏感度等。利用LD_{50}动物数据以及其他信息,临床医师可以根据施用途径确定个体的最大安全剂量。利用普通技能,有能力临床医师将能够在常规临床试验过程中优化特定治疗组合物的剂量。组合物可以在一系列超过一次的施用中被施用至受试者。对于治疗组合物,有时候有规律的定期的施用将是必需的,或者可以是期望的。治疗方案将随着药剂变化;例如,一些药剂可以在每天一次或每天两次的基础上长时间段被服用,而更多选择性药剂可以在更加确定的时间过程内被施用,例如一天、两天、三天或更多天,一周或更多周,一个月或更多个月等,每天一次、每天两次、半周一次、每周一次被服用等。

[0209] 制剂可以被优化用于在脑中的保留和稳定性。当药剂被施用到颅区室中时,药剂被保留在该区室中,并且不扩散或者以另外的方式穿过血脑屏障是期望的。稳定化技术包含交联、多聚化或连接至基团(如聚乙二醇、聚丙烯酰胺、中性蛋白质载体(carrier)等),以便实现分子量的增加。

[0210] 用于增加保留的其他策略包含在可生物降解或可生物蚀解的植入物中包埋药剂。治疗活性剂的释放速率由通过聚合物基质的转运速率,和植入物的生物降解控制。药物通过聚合物屏障的转运也将被以下因素影响:化合物溶解度;聚合物亲水性;聚合物交联程

度;聚合物在吸收水时的膨胀,以便使聚合物屏障对药物更具有渗透性;植入物的几何形状等。植入物与选择作为植入位点的区域的尺寸和形状尺寸规格相当。植入物可以是颗粒、片、贴片、板、纤维、微胶囊等,并且可以具有与所选择的插入位点相容的任何尺寸和形状。

[0211] 植入物可以是整体的,即具有遍及聚合物基质均匀分布的活性剂,或者是包封的,其中活性剂的储液囊被聚合物基质包封。待采用的聚合物组合物的选择将随施用位点、期望的治疗时间段、患者耐受性、待治疗的疾病的性质等而变化。聚合物的特性将包含植入位点处的可生物降解性、与感兴趣药剂的相容性、包封的容易度、在生理环境中的半衰期。

[0212] 可以采用的可生物降解的聚合物组合物可以是有机酯或醚,当其降解时产生生理学上可接受的降解产物,包含单体。酸酐、酰胺、原酸酯等自身或与其他单体的组合可以发挥作用。聚合物将是缩合聚合物。聚合物可以是交联的或未交联的。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。感兴趣的聚酯中包含D-乳酸、L-乳酸、外消旋乳酸、乙醇酸、聚己酸内酯及其组合的聚合物。通过采用L-乳酸盐或D-乳酸盐,获得缓慢降解的聚合物,而外消旋物大幅度增加降解。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率。最快降解的共聚物具有大致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将影响植入物的脆性,其中对于较大的几何形状,较大弹性的植入物是期望的。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,分子量为约5kD至500kD等)在感兴趣的多糖中。也可以在主题发明的植入物中采用可生物降解的水凝胶。水凝胶通常是共聚物材料,其特征是吸收液体的能力。可以采用的示例性可生物降解水凝胶在Heller in:Hydrogels in Medicine and Pharmacy,N.A.Peppes ed.,Vol.III,CRC Press,Boca Raton,Fla.,1987,pp 137-149中被描述。

[0213] 本发明也提供包括填充有本发明的药物组合物的一种或更多种成分的一个或更多个容器的药物包装或试剂盒。与这样的一个或多个容器有关的可以是由管理药物或生物制品的制造、使用或销售的政府机构规定的形式的公告,所述公告表明制造、使用或销售机构批准用于人施用。

[0214] 化合物筛选

[0215] 在一些实施方案中,根据调控突触丢失的能力筛选候选药剂,所述药剂可以包含候选补体抑制剂、变体、片段、模拟物、激动剂和拮抗剂。这样的化合物筛选可以使用体外模型、基因改造的细胞或动物、或纯化的蛋白质进行。各种各样的测定可以被用于该目的。在一个实施方案中,被预测为补体(包含特定的补体蛋白(例如C1q)和补体激活信号(例如淀粉样蛋白、APP)等)的拮抗剂或激动剂的化合物在如下文所描述的体外培养系统中被测试。

[0216] 例如,可以通过已知的药理学、通过结构分析、通过使用基于计算机模拟的合理药物设计、通过结合测定等鉴别候选药剂。可以使用各种各样的体外模型确定是否化合物与补体结合,或以另外的方式影响补体活性。这样的候选化合物被用于在容许突触丢失的环境中接触神经元。还可以在体内模型中测试这样的化合物对突触丢失的作用。

[0217] 也可以对由星形细胞(例如,未成熟的星形细胞)产生的分子进行筛选,所述分子诱导神经元中的C1q表达。在这样的测定中,评估神经元和星形细胞的共培养基对诱导C1q表达的分子的生产或表达。例如,可以向培养基中添加阻断抗体以确定对神经元中C1q表达的诱导的作用。

[0218] 通过向培养基中的神经元施用候选药剂以及在不存在或存在药剂的情况下测定突触的存在来定量突触丢失。在本发明一个实施方案中，神经元是例如视网膜神经节细胞(RGC)的主要培养物。经纯化的RGC群体通过常规方法，如序列免疫包被筛选法(sequential immunopanning)获得。细胞被培养在合适的介质中，所述介质将通常包括适当的生长因子，例如，CNTF;BDNF等。神经细胞(例如RCG)被培养足以允许强烈的突起长出的一段时间，并且然后与候选药剂培养约1天至1周的时间段。在一些实施方案中，在活星形细胞饲养物上培养神经元，以便诱导突触丢失的信号传导。培养星形细胞饲养层的方法是本领域已知的。例如，皮质神经胶质细胞可以被沉积在不允许神经元存活的介质中，并且移除不黏连的细胞。

[0219] 如本领域已知的，对于突触的定量，培养基被固定、阻断和洗涤，然后用抗体特异性突触蛋白(例如，突触结合蛋白等)染色，并且用适当的试剂显影。可以用显微镜进行染色分析。在一个实施方案中，用相机和图像采集软件调整荧光发射的数字图像，以去除像素值范围的未使用部分，并且调整使用的像素值以利用整个像素值范围。对应的通道图像可以被合并以产生含有作为单独色彩通道的两个单通道图像的彩色(RGB)图像。使用滚动球背景差分算法可以鉴别共定位点，以从每个图像通道去除低频背景。将图像中的全部突触结合蛋白、PSD-95以及共定位点的数量、平均面积、平均最小和最大像素强度以及平均像素强度记录并存储至磁盘用于分析。

[0220] 如本文所使用的，术语“药剂”描述具有调控突触丢失(特别是通过补体途径)的能力的任何分子，例如，蛋白质或药物。在优选的实施方案中，药剂是抗-C1q抗体Fab片段。候选的药剂也包含抑制C1q表达的基因成分(例如，反义和RNAi分子)以及编码补体抑制剂(例如，CD59)的构建体等。尽管候选药剂通常是有机分子(包含具有大于50道尔顿并且小于约2500道尔顿的分子量的小的有机化合物)，但是其包括许多化学物质类别。候选药剂包括与蛋白质的结构相互作用(特别是氢键结合)所必需的官能团，并且通常包含至少一个胺基、羰基、羟基或羧基基团，优选地功能性化学基团中的至少两个。候选药剂通常包括用上述官能团中的一个或更多个取代的环状碳结构或杂环结构和/或芳族结构或多环芳族结构。也在包含肽类、糖类、脂肪酸、类固醇、嘌呤、嘧啶、及其衍生物、结构类似物或组合的生物分子中发现了候选药剂。通常，多个测定混合物以不同的药剂浓度并行运行，以获得对不同浓度的差别响应。通常，这些浓度中的一个作为阴性对照，即处于零浓度或低于检测水平。

[0221] 感兴趣的病况

[0222] 如本文所使用的，通过“神经学”或“认知”功能，其意为脑中突触的减少增强患者的思考能力、机能等。如本文所使用的，术语“受试者”包括哺乳动物和非哺乳动物。哺乳动物的实例包含，但不限于，哺乳动物类的任何成员：人类、非人灵长类动物(如黑猩猩以及其他类人猿和猴类)；家畜(如牛、马、绵羊、山羊、猪)；家养动物(如兔、狗和猫)；实验室动物(包含啮齿动物，如大鼠、小鼠和豚鼠)等。该术语不指示特定的年龄或性别。

[0223] 对于本申请的抑制突触丢失的方法，感兴趣的病况中包含各种各样的神经退行性病况，例如，阿尔茨海默病、唐氏综合征、亨廷顿病、肌萎缩性侧索硬化、多发性硬化、肌强直性营养不良、青光眼、帕金森病等。还包含补体相关眼部病况，如脉络膜新生血管(CNV)和老年性黄斑变性(AMD)。这样的病况从补体抑制剂的施用中受益，所述补体抑制剂包含C1q的抑制剂，其允许突触的维持或降低的突触丢失。在一些情况下，在已经存在神经元丢失的情况下，也可以期望增强神经发生，例如通过增加神经发生的药剂或方案的施用、神经元祖细

胞的移植等。增强突触发生的药剂(如血小板反应素)也可以被施用。

[0224] 其他感兴趣的病况是自身免疫病况或补体介导的眼部病况。

[0225] 老年性黄斑变性(AMD)是世界各地老年人中失明的主要原因。AMD以由黄斑(负责精细的视力敏锐度的眼部视网膜的高度特化的区)中的退行性改变和新生血管性改变引起的中心视力的进行性丧失为特征。近期的估算表明1400万人由于AMD而失明或视力严重损害。该疾病对老年群体和他们的家庭的身心健康具有极大的影响,并且正在成为主要的公共健康负担。然而,新的发现开始提供与早期AMD有关的相关细胞活动、遗传因素和生物化学过程以及AMD如何成为补体相关的眼部病况的更清楚的图片。存在两种类型的AMD,非渗出性(干性)AMD和渗出性(湿性)AMD。干性或非渗出性形式涉及中央视网膜(黄斑)下方的视网膜色素上皮细胞(RPE)中的萎缩性改变和肥厚性改变以及RPE上的沉积物(玻璃膜疣)。患有非渗出性AMD的患者可以发展为湿性或渗出性形式的AMD,其中被称作脉络膜新生血管膜(CNVM)的异常血管在视网膜下生长,渗出液体和血液,并且最终在视网膜内和视网膜下引起致盲性盘状瘢痕。非渗出性AMD更常见,其通常是渗出性AMD的先兆。非渗出性AMD的表现各不相同;可以出现硬性玻璃膜疣、软性玻璃膜疣、RPE地图状萎缩和色素凝集。补体组分在AMD的早期被沉积在RPE上,并且是玻璃膜疣的主要成分。

[0226] 阿尔茨海默病是与大脑皮质和皮质下灰质中的过量的老年斑有关的认知功能的进行性的不可阻挡的丧失,其也含有β-淀粉样蛋白和由tau蛋白组成的神经元纤维缠结。常见形式影响＞60岁的人,并且其发病率随着年龄增长而增加。其占老年人中痴呆的超过65％。

[0227] 阿尔茨海默病的病因是未知的。在约15％至20％的病例中,疾病以家族式蔓延。剩余的被称作散发性病例,具有一些遗传决定因素。在大多数早发型病例和一些迟发型病例中,疾病具有常染色体显性遗传模式,但是可变的老年期外显率。环境因素是主动调查的焦点。

[0228] 在疾病病程中,丢失大脑皮质、海马体和皮质下结构(包含迈内特(Meynert)基底核中的选择性细胞丢失)、蓝斑和中缝背核(nucleus raphae dorsalis)内的突触,并最终丢失神经元。大脑葡萄糖使用和灌注在脑的一些区域(在疾病的早期阶段,顶叶和颞皮质(temporal cortices),在疾病的晚期阶段,前额皮质)减少。神经炎性斑或老年斑(由淀粉样蛋白核周围的神经突、星形细胞和神经胶质细胞组成)和神经元纤维缠结(由成对螺旋丝组成)在阿尔茨海默病的发病机理中发挥作用。老年斑和神经元纤维缠结随着正常老化出现,但是它们在患有阿尔茨海默病的人中更加普遍。

[0229] 肌萎缩性侧索硬化(ALS)是攻击运动神经元的快速进行性的、总是致命的神经性疾病。肌无力和肌萎缩以及前角细胞功能障碍的病征最初最常在手上被观察到,并且不常在脚上被观察到。发病的位点是随机的,并且进展是不对称的。痛性痉挛是常见的,并且可以先于无力。患者很少存活30年,50％在发病的3年内死亡,20％存活5年,并且10％存活10年。诊断特征包含在成年人生命的中期或晚期期间的发作,以及进行性的、广泛的运动受累而无感觉异常。直到疾病的晚期,神经传导的速度是正常的。

[0230] 细胞体面积、突触数量以及总的突触长度的减少已经被报道甚至在ALS患者的表现正常的神经元中。已经提出,当活性区的可塑性达到其的极限,连续的突触丢失可以导致功能障碍。防止突触丢失可以维持这些患者中的神经元功能。

[0231] 唐氏综合征是通常造成智力迟钝(特征面容)和许多其他典型特征(包含小头畸形和身材矮小)的染色体疾病。在约95％的病例中,存在额外的完整的21号染色体。在尸体剖检时,成人唐氏综合征脑部显示阿尔茨海默病的典型镜检结果,并且许多人也发展了相关的临床病征。

[0232] 帕金森病是以缓慢和减少的活动、肌肉强直、静止性震颤和姿势不稳为特征的特发性缓慢进行的退行性CNS紊乱。在原发性帕金森病中,黑质、蓝斑和其他脑干多巴胺能细胞群的着色的神经元丢失。病因是未知的。黑质神经元(其投射到尾状核和壳)的丢失造成这些区域中神经递质多巴胺的耗竭。发病通常在40岁之后,在较大年龄的群体中,具有增加的发病率。

[0233] 继发性帕金森神经功能障碍由其他特发性退行性疾病、药物或外毒素产生的基底核中多巴胺的功能的丧失或干扰造成。继发性帕金森神经功能障碍的最常见的病因是神经抑制药物或利血平的摄入,其通过阻断多巴胺受体产生帕金森神经功能障碍。不常见的病因包含一氧化碳或锰中毒、脑积水、结构损害(肿瘤、影响中脑或基底核的梗死)、硬脑膜下血肿和退行性紊乱(包含纹状体黑质变性)。

[0234] 肌强直性营养不良是以营养不良性肌无力和肌强直为特征的常染色体显性多系统紊乱。分子缺陷是19q号染色体上的肌强直蛋白-蛋白激酶基因(myotonin-protein kinase gene)的3'非翻译区中的扩增的三核苷酸(CTG)重复序列。症状可以发生在任何年龄,并且临床严重度范围是广泛的。肌强直在手部肌肉中是显著的,并且上睑下垂甚至在轻度的病例中是常见的。在严重的病例中,发生显著的外周肌无力,常常伴随白内障、过早秃顶、斧形面容、心率失常、睾丸萎缩和内分泌异常(例如,糖尿病)。智力迟钝是常见的。受严重影响的人在其50多岁时死亡。

[0235] 青光眼是影响视网膜神经节细胞(RGC)的常见的神经退行性疾病。正在花费巨大的努力来确定RGC如何在青光眼中死亡。证据支持突触和树突(包含RGC)中分区退化程序的存在。来自体外研究和来自青光眼的遗传小鼠模型的近期的数据表明,分子差异退行途径构成RGC体细胞和RGC轴突的破坏的基础。在各种各样的神经退行性疾病中,轴突、树突和突触常常在细胞死亡前完全退化,并且越来越多的证据表明这对临床症状和病征的产生是重要的。

[0236] 亨廷顿病(HD)是以情绪异常、行为异常和精神异常的发展;先前获得的智力或认知功能的丧失;以及活动异常(运动障碍)为特征的遗传性进行性神经退行性疾病。HD的经典病征包含舞蹈症或可以影响面部、手臂、腿部或躯干的自发性、快速、不规则、痉挛性运动的发展,以及思维处理和后天智力能力的逐渐丧失(痴呆)。可能存在记忆、抽象思维和判断力的障碍;对时间、地点或身份的错误认知(定向障碍);增加的焦虑不安;以及人格改变(人格分裂)。虽然症状通常在生命的第四或第五个十年期间变得明显,但发病年龄是可变的,并且范围从幼年早期到成年晚期(例如,70多岁或80多岁)。

[0237] HD以常染色体显性特征在家族内传播。紊乱作为4号染色体上的基因(4p16.3)内编码指令的异常长序列或"重复序列"的结果发生。与HD有关的神经系统功能的进行性丧失由脑的某些区域(包含基底核和大脑皮质)中神经元的丢失造成。

[0238] 多发性硬化以CNS功能障碍的各种各样的症状和病征的缓解和复发性加重为特征。最常见的症状是一个或多个肢体中、躯干中或面部的一侧上的感觉异常;腿部或手部的

无力或笨拙;或视觉障碍,例如,单眼部分失明或疼痛(球后视神经炎)、视力模糊或暗点。其他常见的早期症状是造成双重视力(double vision)(复视(diplopia))的眼原性麻痹、一个或更多个肢体短暂无力、肢体的轻微僵硬或异常易疲劳、小幅度步态障碍、膀胱控制困难、眩晕和轻度情绪障碍;全部显示分散的CNS受累并且经常在疾病被确认之前数月或数年发生。过热可以加重症状和病征。

[0239] 病程是高度变化的、不可预知的,并且在大多数患者中,是间歇性的。首先,数月或数年的缓解可以分开发作,特别是当疾病以球后视神经炎开始时。然而,一些患者频繁的发作并且迅速丧失能力;因为少数病程可以是快速进行的。

[0240] 本发明的方法可以与中枢神经系统的细胞或组织移植组合使用,其中这样的移植物包含神经祖细胞,如在胎儿组织、神经干细胞、胚胎干细胞或预期用于神经修复或增强的其他细胞和组织中发现的神经祖细胞。神经干细胞/祖细胞已经在本领域中被描述,并且它们在各种各样的治疗方案中的用途已经被广泛讨论。例如,除其他之外,美国专利号6,638,501(Bjornson等);美国6,541,255(Snyder等);美国6,498,018(Carpenter);美国专利申请20020012903(Goldman等);Palmer et al.(2001)Nature 411(6833):42-3;Palmer et al.(1997)Mol Cell Neurosci.8(6):389-404;Svendsen et al.(1997)Exp.Neurol.148(1):135-46和Shihabuddin(1999)Mol Med Today.5(11):474-80;上述每个特此通过引用并入本文。

[0241] 神经干细胞和前体细胞可以参与正常发育方面,包含沿着已建立的迁移途径迁移至播散性CNS区、响应于微环境信号而分化成多种发育适当的和区域适当的细胞类型、以及与宿主祖代及它们子代的非破坏性非致瘤性的散布。人NSC能够在这些播散性位置体内表达外来转基因。这样,这些细胞应用于各种各样病况的治疗,包含脊髓、脑和外周神经系统的外伤性损伤;包含阿尔茨海默病、亨廷顿病、帕金森病的退行性紊乱的治疗;包含重度抑郁的情感障碍;中风等。通过突触丢失增强剂,神经元的功能性连接被增强,提供改进的临床结果。

[0242] 药物组合物

[0243] 本发明的抗体Fab片段可以以药物组合物的形式被施用,用于补体相关眼部病况的治疗。

[0244] 通过将具有期望的纯度的抗体Fab片段与可选的药学上可接受的载体(carrier)、赋形剂或稳定剂混合制备本发明的抗体Fab片段的治疗制剂用于存储(以冻干的制剂或水性溶液的形式)(Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition,Osol,A.Ed.[1980])。可接受的载体(carrier)、赋形剂或稳定剂在所采用的剂量和浓度对接受者是无毒性的,并且包含缓冲液(如磷酸盐、柠檬酸盐和其他有机酸);抗氧化剂(包含抗坏血酸和甲硫氨酸);防腐剂(如十八烷基二甲基苄基氯化铵;六甲氯铵;苯扎氯铵,苄索氯铵;苯酚,丁醇或苯甲醇;对羟基苯甲酸烷基酯类,如对羟基苯甲酸甲酯或对羟基苯甲酸丙酯;邻苯二酚;间苯二酚;环己醇;3-戊醇和间甲酚);低分子量(小于约10个残基)多肽;蛋白质,如血清白蛋白、明胶或免疫球蛋白;亲水聚合物,如聚乙烯吡咯烷酮;氨基酸,如甘氨酸、谷氨酰胺、天门冬酰胺、组氨酸、精氨酸或赖氨酸;单糖、二糖和其他碳水化合物,包含葡萄糖、甘露糖或糊精;螯合剂,如EDTA;糖类,如蔗糖、甘露糖醇、海藻糖或山梨糖醇;成盐平衡离子,如钠;金属复合物(例如,锌蛋白复合物);和/或非离子表面活性剂,如TWEEN™、PLURONICS™或聚

乙二醇(PEG)。

[0245] 脂质体转染或脂质体也可以被用于将抗体Fab片段递送到细胞中,其中与靶标的结合域特异性结合的最小的片段是优选的。

[0246] 抗体Fab片段也可以被分别包埋在例如通过凝聚技术或通过界面聚合制备的微胶囊(例如,羟甲基纤维素或明胶微胶囊和聚-(甲基丙烯酸甲酯)微胶囊)中,胶体药物递送系统(例如,脂质体、白蛋白微球、微乳剂、纳米颗粒和纳米胶囊)中或粗乳剂中。这样的技术被公开在Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition,Osol,A.Ed.(1980)中。

[0247] 将被用于体内施用的制剂必须是无菌的。这经由通过无菌过滤膜的过滤容易实现。

[0248] 可以制备持续释放制剂。持续释放制剂的适合的实例包含含有抗体Fab片段的固体疏水聚合物的半透过性基质,所述基质处于成形物品的形式,例如膜或微胶囊。持续释放基质的实例包含聚酯、水凝胶(例如,聚(2-羟乙基-甲基丙烯酸酯)或聚(乙烯醇))、聚乳酸(美国专利号3,773,919)、L-谷氨酸和L-谷氨酸γ乙酯的共聚物、不可降解的乙烯-醋酸乙烯酯、可降解的乳酸-乙醇酸共聚物,如LUPRON DEPOT™(由乳酸-乙醇酸共聚物和醋酸亮丙瑞林组成的可注射微球)和聚-D-(-)-3-羟基丁酸。虽然聚合物如乙烯-醋酸乙烯酯和乳酸-乙醇酸能够使分子释放超过100天,但是某些水凝胶在较短的时间段释放蛋白质。

[0249] 用于眼部疾病或病况的预防或治疗的本发明的化合物通常通过眼部注射、眼内注射和/或玻璃体内注射被施用。其他施用方法也被使用,所述施用方法包含(但不限于)局部、肠胃外、皮下、腹膜内、肺内、鼻内和病灶内施用。肠胃外输注包含肌内、静脉内、动脉内、腹膜内或皮下施用。

[0250] 可以通过本领域已知的方法以及使用本领域已知的成分制备用于眼部施用、眼内施用或玻璃体内施用的制剂。有效治疗的主要要求是通过眼部的适当的渗透。不同于眼睛的前部的疾病(其中药物可以被局部递送),视网膜疾病需要更加位点特异性的方法。滴眼剂和软膏剂很少透过眼睛的后部,并且血眼屏障阻碍系统性施用的药物渗透到眼部组织中。因此,通常用于治疗视网膜疾病(如AMD和CNV)的药物递送方法的选择是直接玻璃体内注射。通常,根据患者的病况以及被递送的药物的性质和半衰期,间隔一定的时间重复玻璃体内注射。对于眼内(例如,玻璃体内)渗透,通常较小尺寸的分子是优选的。

[0251] 补体相关眼部病况(如AMD或CNV)的治疗疗效可以通过在评价眼内疾病中通常使用的各种各样的端点被测量。例如,视力丧失可以被评定。可以通过(但不限于)例如,测量最佳矫正视力敏锐度(BCVA)从基线到期望的时间点的平均改变(例如,其中BCVA是基于早期治疗糖尿病视网膜病变研究(ETDRS)视力敏锐度表以及在4米的测试距离处的测定)、测量相比于基线,在期望的时间点丧失少于15个字母的视力敏锐度的受试者的比例、测量相比于基线,在期望的时间点获得多于或等于15个字母的视力敏锐度的受试者的比例、测量在期望的时间点具有20/2000或更差的视力敏锐度斯内伦等效值(Snellen equivalent)的受试者的比例、测量NEI视力功能调查表、测量在期望的时间点CNV的尺寸和CNV的渗漏量(例如,通过荧光素血管造影术)等评价视力丧失。可以完成眼部评定,例如,其包含(但不限于)例如,进行眼部检查、测量眼内压、评定视力敏锐度、测量裂隙灯压力、评定眼内炎症等。

[0252] 核酸、载体(vector)和宿主细胞

[0253] 可以使用重组方法和组合物产生本公开的抗体Fab片段,例如,如美国专利号4,

816,567中描述的。在一些实施方案中,提供具有编码本公开的任何抗体Fab片段的核苷酸序列的分离的核酸。这样的核酸可以编码含有抗-C1q抗体的V_L/C_L的氨基酸序列和/或含有抗-C1q抗体的V_H/C_H1的氨基酸序列。在一些实施方案中,提供含有这样的核酸的一种或更多种载体(vector)(例如,表达载体(vector))。在一些实施方案中,还提供含有这样的核酸的宿主细胞。在一些实施方案中,宿主细胞含有(例如,已经用以下载体转导):(1)含有核酸的载体(vector),所述核酸编码含有抗体的V_L/C_L的氨基酸序列和含有抗体的V_H/C_H1的氨基酸序列,或(2)含有核酸的第一载体(vector)(所述核酸编码含有抗体的V_L/C_L的氨基酸序列),和含有核酸的第二载体(vector)(所述核酸编码含有抗体的V_H/C_H1的氨基酸序列)。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)。

[0254] 提供制造本公开的抗-C1q抗体Fab片段的方法。在一些实施方案中,方法包含在适合于抗体Fab片段的表达的条件下,培养含有编码抗-C1q抗体Fab片段的核酸的本公开的宿主细胞。在一些实施方案中,随后从宿主细胞(或宿主细胞培养基)回收抗体Fab片段。

[0255] 对于本公开的人源化抗-C1q抗体Fab片段的重组产生,编码抗-C1q抗体Fab片段的核酸被分离,并插入到一个或更多个载体(vector)中用于进一步克隆和/或在宿主细胞中表达。这样的核酸可以容易地被分离并且使用常规程序(例如,通过使用能够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)测序。

[0256] 含有本文所描述的编码本公开的任何抗-C1q抗体Fab片段,或其片段多肽(包含抗体)的核酸序列的适合的载体(vector)包含(不限于)克隆载体(vector)和表达载体(vector)。适合的克隆载体(vector)可以根据标准技术构建,或者可以从本领域可获得的大量克隆载体(vector)中选择。虽然所选择的克隆载体(vector)可以根据预期使用的宿主细胞而变化,但是有用的克隆载体(vector)通常具有自我复制的能力,可以具备特定限制性内切酶的单一靶标,和/或可以携带可以用于选择含有该载体(vector)的克隆的标记基因。适合的实例包含质粒和细菌病毒,例如,pUC18、pUC19、Bluescript(例如,pBS SK+)及其衍生物、mp18、mp19、pBR322、pMB9、ColE1、pCR1、RP4、噬菌体DNA、和穿梭载体(vector)(如pSA3和pAT28)。这些和许多其他克隆载体(vector)是从商业供应商,如BioRad、Strategene和Invitrogen可获得的。

[0257] 表达载体(vector)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(vector)可以作为游离基因或者作为染色体DNA的整合的部分在宿主细胞中复制。适合的表达载体(vector)包含,但不限于,质粒,病毒载体(vector),包含腺病毒、腺相关病毒、逆转录病毒,粘粒和PCT公布号WO 87/04462中公开的一种或多种表达载体(vector)。载体(vector)组分通常可以包含,但不限于,下列中的一个或更多个:信号序列;复制起点;一个或更多个标记基因;适合的转录控制元件(如启动子、增强子和终止子)。对于表达(即翻译),通常还需要一个或更多个翻译控制元件,如核糖体结合位点、翻译起始位点和终止密码子。

[0258] 含有感兴趣的核酸的载体(vector)可以通过多种适当手段中的任何一种被引入到宿主细胞中,包含电穿孔,采用氯化钙、氯化铷、磷酸钙、DEAE-葡聚糖或其他物质转染;基因枪法(microprojectile bombardment);脂质体转染;和感染(例如,在载体(vector)是感染性病原体如牛痘病毒的情况下)。引入载体(vector)或多核苷酸的选择将通常取决于宿

主细胞的特征。在一些实施方案中，载体(vector)含有核酸，所述核酸含有编码本公开的抗-C1q抗体的一个或更多个氨基酸序列。

[0259] 用于克隆或表达抗体Fab片段-编码载体(vector)的适合的宿主细胞包含原核细胞或真核细胞。例如，本公开的抗-C1q抗体Fab片段可以在细菌中产生，特别是当不需要糖基化和Fc效应子功能时。对于细菌中抗体片段和多肽的表达(例如，描述在大肠杆菌中抗体片段的表达的美国专利号5,648,237、5,789,199和5,840,523；和Charlton,Methods in Molecular Biology,Vol.248(B.K.C.Lo,ed.,Humana Press,Totowa,NJ,2003),pp.245-254)。在表达之后，抗体可以从可溶级分中的细菌细胞糊状物(cell paste)中被分离，并且可以被进一步纯化。

[0260] 除了原核生物之外，真核微生物(如丝状真菌或酵母)也是适合于抗体-编码载体(vector)的克隆或表达宿主，包含糖基化途径已经被“人源化”的真菌和酵母菌株，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))。

[0261] 用于表达糖基化抗体Fab片段的适合的宿主细胞还可以源自多细胞生物体(无脊椎动物和脊椎动物)。无脊椎动物细胞的实例包含植物细胞和昆虫细胞。多种杆状病毒毒株已经被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，美国专利号5,959,177、6,040,498、6,420,548、7,125,978和6,417,429，描述了用于在转基因植物中产生抗体的PLANTIBODIES™技术)。

[0262] 脊椎动物细胞也可以用作宿主。例如，适应于在悬浮液中生长的哺乳动物细胞系可以是有用的。有用的哺乳动物宿主细胞系的其他实例是通过SV40转化的猴肾CV1系(COS-7)；人胚胎肾系(如例如，Graham et al.,J.Gen Virol.36:59(1977)中描述的293或293细胞)；幼仓鼠肾细胞(BHK)；小鼠支持细胞(如例如，Mather,Biol.Reprod.23:243-251(1980)中描述的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)中所描述的)；MRC 5细胞；和FS4细胞。其他有用的哺乳动物宿主细胞系包含中国仓鼠卵巢(CHO)细胞，包含DHFR-CHO细胞(Urlaub et al.,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 77:4216(1980))；和骨髓瘤细胞系(如Y0、NS0和Sp2/0)。对于适用于抗体产生的某些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)。

[0263] 组合治疗

[0264] 本公开的补体抑制剂可以(不限于)与任何附加的治疗(如免疫抑制疗法)联合使用，用于本文所公开的任何疾病(包含自身免疫疾病和/或神经退行性疾病)。

[0265] 在一些实施方案中，本公开的抗体与补体激活的旁路途径抑制剂组合施用。这样的抑制剂可以包含(不限于)：因子B阻断抗体；因子D阻断抗体；阻断C3的裂解的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拮抗剂如SB 290157；眼镜蛇毒液因子或非特异性补体抑制剂如甲磺酸萘莫司他(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。这样的抑制剂可以包含纯化的自身抗原的可溶形式,或者抗原模拟物如肽或RNA衍生的模拟表位(包含AQP4抗原的模拟表位)。可替代地,这样的抑制剂可以包含识别自身抗原并防止自身抗体的结合而不触发经典补体途径的阻断剂。这样的阻断剂可以包含,例如,自身抗原结合RNA适配体或在其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不结合C1q的抗体)。

[0266] 试剂盒

[0267] 本发明还提供含有本公开的抗体Fab片段的试剂盒。本发明的试剂盒包含一个或更多个容器,所述容器包括经纯化的抗-C1q抗体Fab片段以及按照本领域已知的方法使用的说明。通常,这些说明包括根据本领域已知的任何方法施用抑制剂以治疗或诊断疾病的描述。试剂盒还可以包括基于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描述。

[0268] 说明通常包含关于用于预期治疗的剂量、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。本发明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,试剂盒中包含的纸页),但是机器可读的说明(例如,存储磁盘或光盘上携带的说明)也是可接受的。

[0269] 标签或包装说明书表明组合物被用于治疗特定的疾病。说明可以被提供以用于实施本文所描述的任何方法。

[0270] 本发明的试剂盒在适合的包装中。适合的包装包含,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。还预期与特定装置,如吸入器、鼻施用装置(例如喷雾器)或输液装置(如微型泵)组合使用的包装。试剂盒可以具有无菌的存取口(例如容器可以是具有可以被皮下注射针头刺穿的塞子的静脉溶液袋或小瓶)。容器也可以具有无菌的存取口(例如,容器可以是具有可以被皮下注射针头刺穿的塞子的静脉溶液袋或小瓶)。组合物中的至少一种活性剂是经典补体途径的抑制剂。容器还可以包括第二药学活性剂。

[0271] 试剂盒可以可选地提供附加的组分,如缓冲液和说明性信息。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一个或多个包装说明书。

[0272] 范例

[0273] 实施例1:C1q结合测定

[0274] 直接ELISA被用于评定Fab和全长抗体与人C1q的结合(图1)。简要地说,用在碳酸氢盐缓冲液(pH 9.4)(Thermo Scientific)中的人C1q(2μg/mL)(Complement Technology)涂覆黑色96孔板(#3925,Corning),在4℃过夜。第二天,用dPBS洗涤板三次,并用3%BSA/PBS在室温(RT)阻断1小时。在dPBS 0.3%BSA、0.1%吐温缓冲液中制备M1、M1-Fab的连续稀释液(50μL/孔)。随后在RT孵育1小时,分别以2000-4000倍向小鼠kappa或小鼠FC、人kappa和人FC(Jackson Immunoresearch)添加碱性磷酸酶(AP)缀合的二级抗体。在RT孵育附加的1小时后,用dPBS 0.05%吐温洗涤板三次,并用AP底物(Thermo Scientific)显出冷光。使用Envision读板仪(Perkin Elmer)测量发光计数。将计数绘制为浓度的函数,并且使用4参数逻辑拟合推导C1q结合的EC50。如图1中所证实的,M1Fab具有与M1全抗体相同的结合亲和力。图1B显示M1全抗体(二价)和M1Fab(单价)。预期M1全抗体将比M1抗体Fab展现与C1q结合

的较高的抗体亲抗原性。

[0275] 实施例2:溶血

[0276] 使用敏化的绵羊RBC和正常人血清作为补体的来源测定抗-C1q抗体抑制RBC溶血的能力(图2)。简要地说,在GVB++缓冲液(Complement Technology)中的50×稀释的正常人血清中,在10000ng/mL至10ng/mL的范围内滴定抗体(M1-全IgG、M1-Fab、人源化M1和人源化M1-Fab)。然后,将50μL稀释的血清与50μL稀释的绵羊RBC(～1亿个细胞/mL)(Complement Technology)混合。样品在37℃被孵育30分钟。然后,将板在2000rpm离心分离5分钟,收集上层清液并且在415nm处读取吸光度。在GVB++缓冲液中独自运行包含背景溶血的对照而无血清,并且使用水触发最大溶血。将未处理的吸光度减去背景并且归一化至最大溶血,并且绘制为浓度的函数。使用4参数逻辑拟合测定溶血的抑制的IC50。如图2中所证实的,M1Fab具有和M1全抗体相同的功能能效。预期由于M1全抗体占据C1q的多个功能头部基团(图1B)的能力,以及由于较大的尺寸对其他头部基团的空间位阻,其将展现较高的能效。

[0277] 通过引用并入

[0278] 本文所引用的专利、公布的专利申请以及非专利参考文献中的每个以引用方式被整体并入。

[0279] 等同物

[0280] 本领域技术人员将识别、或仅仅使用常规实验能够确定本文所描述的本发明的具体实施方案的许多等同物。这样的等同物旨在由以下权利要求涵盖。

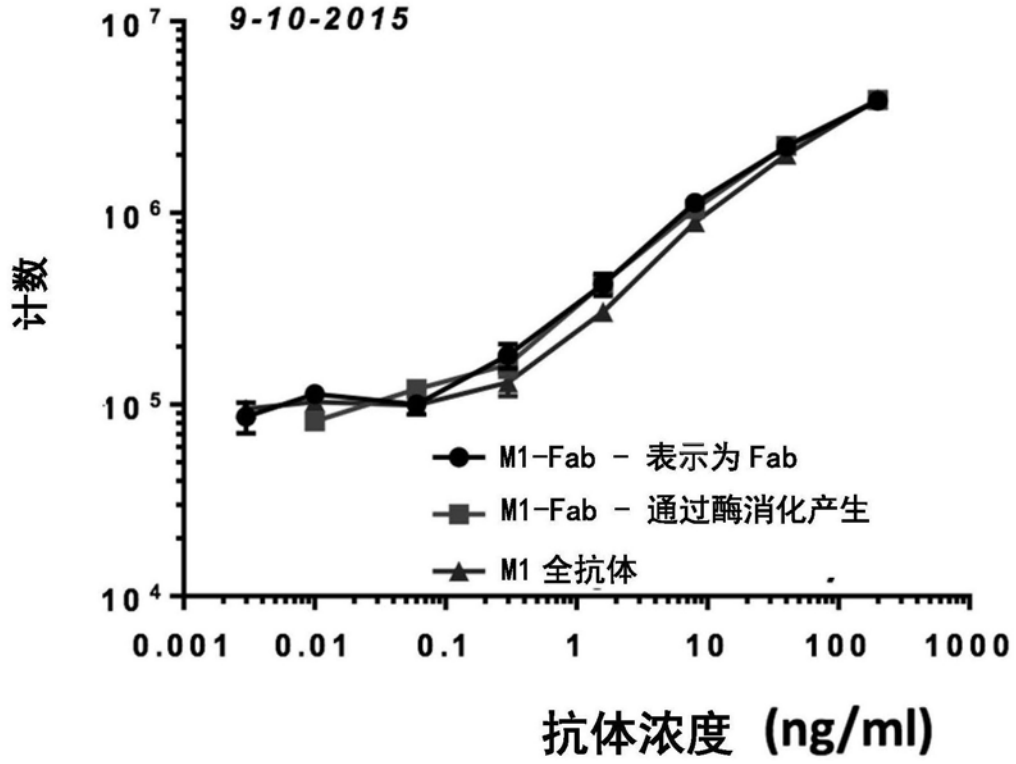

9-10-2015
计数
10^7
10^6
10^5
10^4
M1-Fab – 表示为 Fab
M1-Fab – 通过酶消化产生
M1 全抗体
0.001
0.01
0.1
1
10
100
1000
抗体浓度 (ng/ml)

图1A

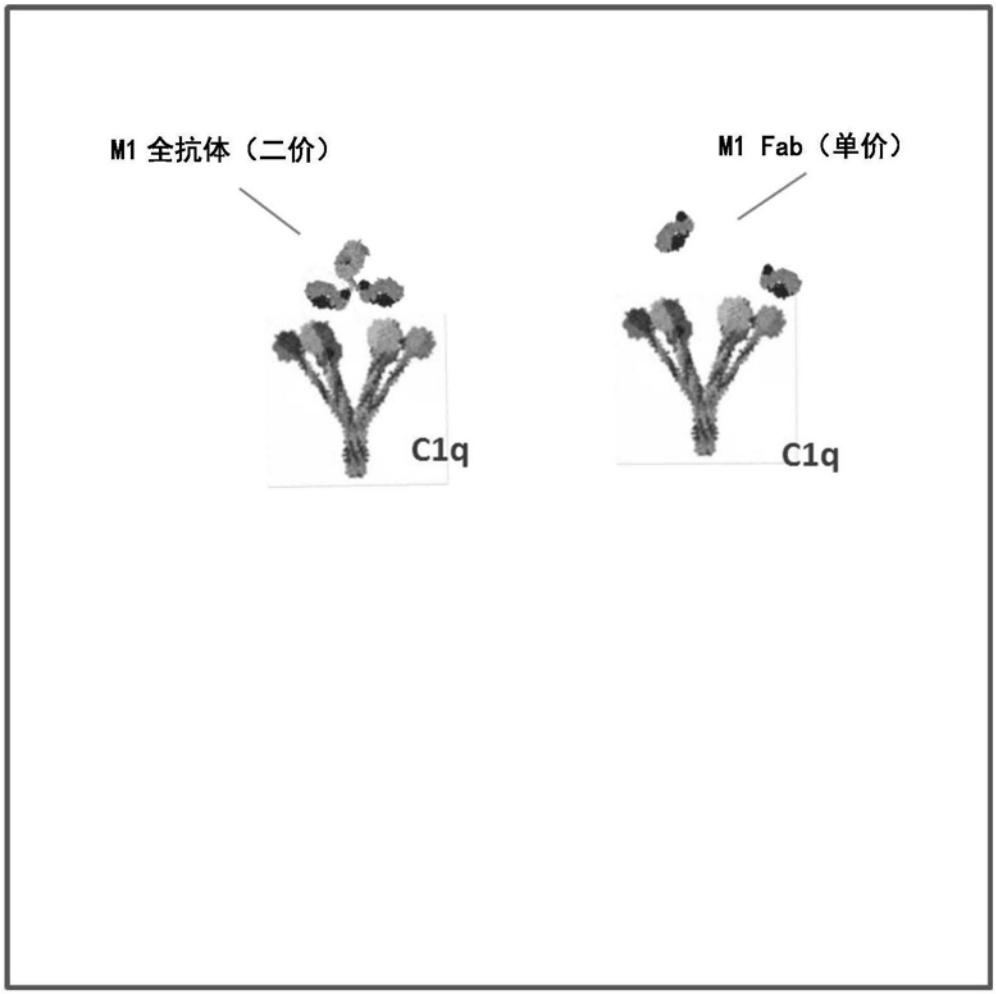

M1 全抗体（二价）
M1 Fab（单价）
C1q
C1q

图1B

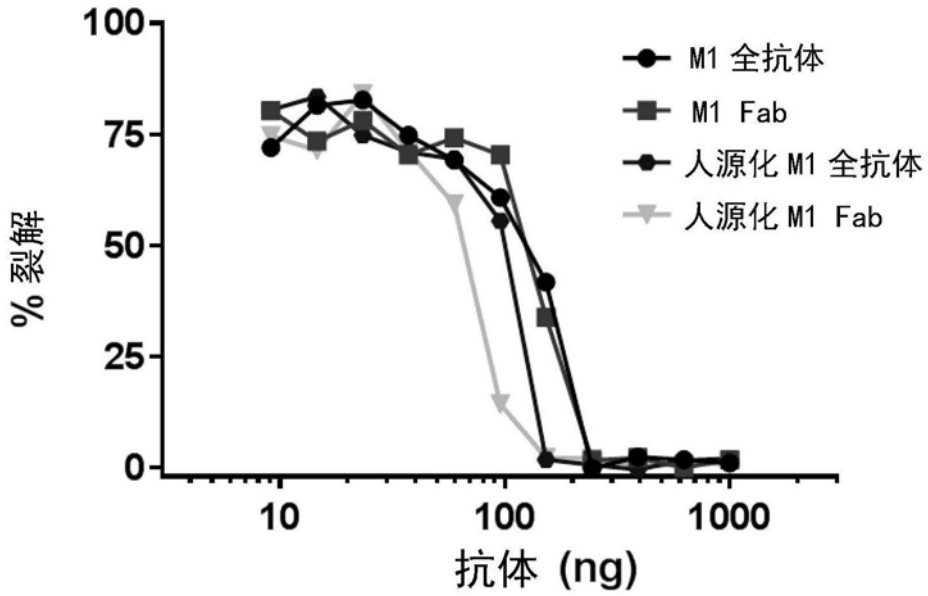
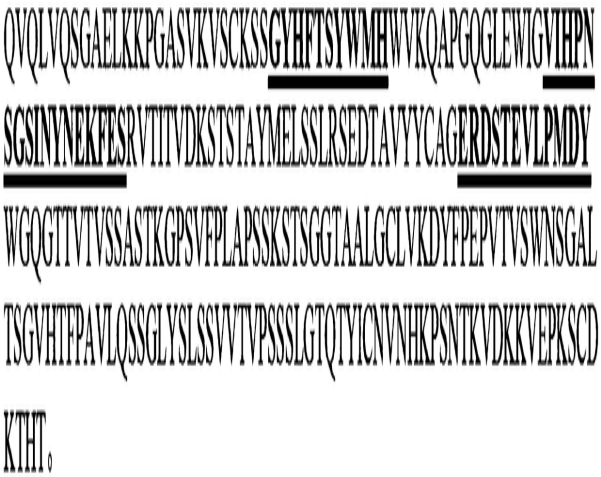

100
75
50
25
0
% 裂解
10
100
1000
抗体 (ng)
M1 全抗体
M1 Fab
人源化 M1 全抗体
人源化 M1 Fab

图2

专利名称(译)	抗补体因子C1Q的FAB片段及其应用		
公开(公告)号	CN108779171A	公开(公告)日	2018-11-09
申请号	CN201680079670.4	申请日	2016-11-23
[标]发明人	T耶德诺克 A罗森塔尔		
发明人	T·耶德诺克 S·桑卡拉纳拉亚南 A·罗森塔尔 M·莱维坦		
IPC分类号	C07K16/18 A61K39/395 G01N33/53 G01N33/534 A61K49/16 C12N15/13 A61P25/28 A61P25/00 A61P27/02 A61P37/00		
CPC分类号	A61P1/04 A61P3/00 A61P3/04 A61P11/00 A61P11/06 A61P13/12 A61P17/00 A61P19/02 A61P21/02 A61P21/04 A61P25/00 A61P25/14 A61P25/16 A61P25/28 A61P27/02 A61P27/04 A61P27/06 A61P29/00 C07K16/18 C07K2317/24 C07K2317/55 C07K2317/76 C07K2317/92 G01N33/564 G01N2333/4716 G01N2800/50 C07K2317/33 G01N33/6857 G01N33/6893 G01N2800/7095 C07K2317/56 C07K2317/565		
代理人(译)	甘玲 缪策		
优先权	62/259227 2015-11-24 US		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本公开大体上涉及抗-C1q抗体Fab片段及使用抗-C1q抗体Fab片段的方法。