

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **037325**

(13) **B1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента
2021.03.12

(21) Номер заявки
201690182

(22) Дата подачи заявки
2014.07.09

(51) Int. Cl. **A61P 11/06** (2006.01)
C07K 16/42 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)

(54) **АНТИТЕЛА ПРОТИВ ФАКТОРА КОМПЛЕМЕНТА C1q И ИХ ПРИМЕНЕНИЯ**

(31) **61/844,369; 61/871,813**

(32) **2013.07.09; 2013.08.29**

(33) **US**

(43) **2016.10.31**

(86) **PCT/US2014/046042**

(87) **WO 2015/006504 2015.01.15**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
АННЕКСОН, ИНК. (US)

(72) Изобретатель:
**Розенталь Арнон, Левитен Майкл
(US)**

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(56) HU Y. et al. Characterization Of C1q In Teleosts: Insight Into The Molecular And Functional Evolution Of C1q Family And Classical Pathway. 08 July 2010; page 28782, left column, third paragraph. DOI 10.1074/jbc.M110.131318.

WO-A1-2012176765

LIANG Z. et al. Antinuclear Autoantibodies From B6.Sle1 Mice. 29 September 2003; page 1, bottom.

WO-199823761

LOPEZ-REQUENA A. et al. Immunogenicity Of Autologous Immunoglobulins: Principles And Practices. March 7, 2006; page 2, top.

US-B1-6197930

WO-A2-2003052377

(57) Изобретение относится к области иммунологии. Изобретение описывает изолированные антитела против C1q и выделенные полинуклеотиды, кодирующие указанные антитела. Изобретение относится к клеткам-хозяевам, содержащим нуклеиновые кислоты по изобретению, а также к клетке гибридомы с учетным номером РТА-120399 в АТСС или ее потомству. Изобретение относится к способу лечения или предотвращения заболевания, ассоциированного с активацией комплемента у индивидуума, нуждающегося в таком лечении, способ, включающий в себя стадию введения терапевтически эффективной дозы указанного антитела. В изобретении также описаны набор для лечения или профилактики заболевания, ассоциированного с активацией комплемента, и диагностический набор, содержащий антитело против C1q. Способы обнаружения синапсов у индивидуума или в биологическом образце также предусмотрены изобретением.

B1

037325

**037325
B1**

Перекрестные ссылки на родственные заявки

По данной заявке испрашивается приоритет в соответствии с предварительной патентной заявкой США № 61/844369, поданной 9 июля 2013 г., и предварительной патентной заявкой США № 61/871813, поданной 29 августа 2013 г., каждая из которых полностью включена в данное описание посредством ссылки.

Представление списка последовательностей в виде текстового файла ASCII

Содержание следующего представления в виде текстового файла ASCII полностью включено в данное описание посредством ссылки: машиночитаемая форма (CRF) списка последовательностей (наименование файла: 717192000640SeqList.txt, запись данных: 9 июля 2014 г., размер: 21 КБ).

Предшествующий уровень

1) Область.

Изобретение относится к антителам против C1q и способам их применения.

2) Описание предшествующего уровня техники.

Избыточную активацию комплемента ассоциируют с рядом болезненных состояний, включающих многочисленные воспалительные и аутоиммунные заболевания. В последнее время было показано, что система комплемента способствует патологии нейродегенеративного заболевания. Конкретно, было показано, что факторы комплемента, такие как C1q, экспрессируются в нейрональных синапсах и отмечают такие синапсы для устранения. См., например, опубликованные патентные заявки США № 2012/0195880 и 2012/328601. В то время как селективная потеря синапсов является существенным аспектом нормального развития мозга ("синаптический прунинг"), избыточная потеря синапсов, особенно в зрелом или стареющем мозге, приводит к нейродегенерации и снижению когнитивных способностей. Было обнаружено, что повышенная экспрессия синаптического комплемента способствует потере синапсов при нормальном старении и при прогрессировании нейродегенеративного заболевания. Напротив, было обнаружено, что снижение экспрессии нейронального комплемента является нейропротективным. На основании этих открытий нейтрализацию активности факторов комплемента, таких как C1q, считают перспективной терапевтической стратегией для предотвращения синаптической потери и для замедления прогрессирования нейродегенеративного заболевания, а также снижения когнитивных способностей при нормальном старении.

Нейродегенеративные заболевания, включающие в себя потерю синапсов и рассматриваемые как подверженные терапевтическим воздействиям, нацеленным на нейтрализацию факторов комплемента, таких как C1q, включают болезнь Альцгеймера, боковой амиотрофический склероз, рассеянный склероз, глаукому, миотоническую дистрофию, синдром Дауна, болезнь Паркинсона, болезнь Хантингтона и т.п.

В настоящее время известно только ограниченное число комплемент-нейтрализующих антител (см., например, 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). В настоящее время только антитело, нейтрализующее C5, Экулизумаб, ингибитор терминального пути активации комплемента, получило разрешение контролирующего органа; Экулизумаб реализуется на рынке для лечения пароксизмальной ночной гемоглобинурии (PNH; Hillmen et al., *N. Engl. J. Med.* 2006, 355(12):1233-43).

Таким образом, существует потребность в разработке дополнительных антител, которые специфически связываются с факторами комплемента, такими как C1q, и нейтрализуют их биологические активности.

Все ссылки, цитируемые в данном описании, включая патентные заявки и публикации, полностью включены в данное описание посредством ссылки.

Краткое содержание сущности изобретения

В данном описании представлены антитела против C1q и способы применения антител против C1q.

В некоторых аспектах, данное раскрытие предоставляет изолированное антитело против C1q, содержащее переменный домен легкой цепи и переменный домен тяжелой цепи, где переменный домен легкой цепи содержит HVR-L1, HVR-L2 и HVR-L3 моноклонального тела M1, продуцируемого клеточной линией гибридомы, депонированной с учетным номером PTA-120399, или ее потомством; и/или, где переменный домен тяжелой цепи содержит HVR-H1, HVR-H2 и HVR-H3 моноклонального тела M1, продуцируемого клеточной линией гибридомы, депонированной с учетным номером ATCC PTA-120399, или ее потомством.

В некоторых аспектах, настоящее раскрытие предоставляет изолированное антитело, которое специфически связывается с белком C1q, где антитело содержит легкую цепь HVR, выбранную из группы, состоящей из HVR-L1, содержащей аминокислотную последовательность из SEQ ID NO:5, HVR-L2, содержащей аминокислотную последовательность из SEQ ID NO:6, и HVR-L3, содержащей аминокислотную последовательность из SEQ ID NO:7; и/или где антитело содержит тяжелую цепь HVR, выбранную из группы, состоящей из HVR-H1, содержащей аминокислотную последовательность из SEQ ID NO:9, HVR-H2, содержащей аминокислотную последовательность из SEQ ID NO:10, и HVR-H3, содержащей

аминокислотную последовательность из SEQ ID NO:11. В нескольких вариантах осуществления, которые могут комбинироваться с любым из предшествующих вариантов осуществления, антитело содержит HVR-L1, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO:5, HVR-L2, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO:6, и HVR-L3, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO:7; и/или где антитело содержит HVR-H1, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO:9, HVR-H2, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO:10, и HVR-H3, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO:11. В нескольких вариантах осуществления, которые могут комбинироваться с любым из предшествующих вариантов осуществления, антитело содержит переменный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99%, или 100% идентичной SEQ ID NO:4. В нескольких вариантах осуществления, которые могут комбинироваться с любым из предшествующих вариантов осуществления, антитело содержит переменный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99%, или 100% идентичной SEQ ID NO:8.

В некоторых аспектах, настоящее раскрытие предоставляет изолированное мышинное моноклональное антитело M1 против человеческого C1q, продуцируемое клеточной линией гибридомы, депонированной с учетным номером ATCC PTA-120399, или ее потомством.

В нескольких вариантах осуществления, которые могут комбинироваться с любым из предшествующих вариантов осуществления, антитело специфически связывается как с человеческим C1q, так и с мышинным C1q. В нескольких вариантах осуществления, которые могут комбинироваться с любым из предшествующих вариантов осуществления, антитело специфически связывается с крысиным C1q. В нескольких вариантах осуществления, которые могут комбинироваться с любым из предшествующих вариантов осуществления, антитело специфически связывается с человеческим C1q, мышинным C1q и крысиным C1q. В нескольких вариантах осуществления, которые могут комбинироваться с любым из предшествующих вариантов осуществления, антитело имеет константу диссоциации (K_D) для человеческого C1q и мышинного C1q, которая находится в интервале от менее чем приблизительно 30 нМ до менее чем приблизительно 100 пМ. В нескольких вариантах осуществления, которые могут комбинироваться с любым из предшествующих вариантов осуществления, антитело имеет константу диссоциации (K_D) для человеческого C1q и мышинного C1q равную менее чем приблизительно 30 нМ. В нескольких вариантах осуществления, которые могут комбинироваться с любым из предшествующих вариантов осуществления, антитело имеет константу диссоциации (K_D) для человеческого C1q и мышинного C1q, равную менее чем приблизительно 20 нМ. В нескольких вариантах осуществления, которые могут комбинироваться с любым из предшествующих вариантов осуществления, антитело имеет константу диссоциации (K_D) для человеческого C1q и мышинного C1q, равную менее чем приблизительно 10 нМ. В нескольких вариантах осуществления, которые могут комбинироваться с любым из предшествующих вариантов осуществления, антитело имеет константу диссоциации (K_D) для человеческого C1q и мышинного C1q, равную менее чем приблизительно 5 нМ. В нескольких вариантах осуществления, которые могут комбинироваться с любым из предшествующих вариантов осуществления, антитело имеет константу диссоциации (K_D) для человеческого C1q и мышинного C1q, равную менее чем приблизительно 1 нМ. В нескольких вариантах осуществления, которые могут комбинироваться с любым из предшествующих вариантов осуществления, антитело имеет константы диссоциации (K_D) для человеческого C1q и мышинного C1q, равные менее чем 100 пМ или менее чем приблизительно 100 пМ. В нескольких вариантах осуществления, которые могут комбинироваться с любым из предшествующих вариантов осуществления, антитело специфически связывается с C1q и нейтрализует его биологическую активность. В нескольких вариантах осуществления, которые могут комбинироваться с любым из предшествующих вариантов осуществления, биологическая активность C1q представляет собой (1) связывание C1q с аутоантителом, (2) связывание C1q с C1r, (3) связывание C1q с C1s, (4) связывание C1q с фосфатидилсерином, (5) связывание C1q с пентраксином-3, (6) связывание C1q с С-реактивным белком (CRP), (7) связывание C1q с глобулярным рецептором C1q (gC1qR), (8) связывание C1q с рецептором 1 комплемента (CR1), (9) связывание C1q с В-амилоидом или (10) связывание C1q с кальретикулином. В нескольких вариантах осуществления, которые могут комбинироваться с любым из предшествующих вариантов осуществления, биологическая активность C1q представляет собой (1) активацию классического пути активации комплемента, (2) активацию антитело- и комплемент-зависимой цитотоксичности, (3) гемолиз CH50, (4) потерю синапсов, (5) продуцирование антител В-клетками, (6) созревание дендритных клеток, (7) пролиферацию Т-клеток, (8) продуцирование цитокинов (9) активацию микроглии, (10) реакцию Артюса, (11) фагоцитоз синапсов или нервных окончаний или (12) активацию клеток, экспрессирующих рецептор

3 комплемента (CR3/C3). В нескольких вариантах осуществления, которые могут комбинироваться с любым из предшествующих вариантов осуществления, гемолиз CH50 включает в себя гемолиз человеческого, мышиноного и/или крысиного CH50. В нескольких вариантах осуществления, которые могут комбинироваться с любым из предшествующих вариантов осуществления, антитело способно к нейтрализации по меньшей мере на 50%, по меньшей мере 80% или по меньшей мере 90% гемолиза CH50. В нескольких вариантах осуществления, которые могут комбинироваться с любым из предшествующих вариантов осуществления, антитело способно к нейтрализации по меньшей мере 50% гемолиза CH50 при дозе, равной менее чем 200 нг/мл, менее чем 100 нг/мл, менее чем 50 нг/мл, или менее чем 20 нг/мл. В нескольких вариантах осуществления, которые могут комбинироваться с любым из предшествующих вариантов осуществления, антитело представляет собой мышиноное антитело. В нескольких вариантах осуществления, которые могут комбинироваться с любым из предшествующих вариантов осуществления, антитело представляет собой гуманизованное или химерное антитело.

В некоторых аспектах, настоящее раскрытие предоставляет изолированное антитело против C1q, которое связывается по существу с тем же эпитопом C1q, что и антитело M1, продуцируемое клеточной линией гибридомы с учетным номером ATCC PTA-120399, или его фрагменты, связывающие C1q. В нескольких вариантах осуществления, антитело содержит вариабельный домен легкой цепи, содержащий HVR-L1, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO:5, HVR-L2, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO:6, и HVR-L3, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO:7. В нескольких вариантах осуществления, вариабельный домен легкой цепи содержит вариабельный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99%, или 100% идентичной SEQ ID NO:4. В нескольких вариантах осуществления, антитело содержит вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий HVR-H1, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO:9, HVR-H2, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO:10, и HVR-H3, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO:11. В нескольких вариантах осуществления, вариабельный домен тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичной SEQ ID NO:8.

В некоторых аспектах, настоящее раскрытие предоставляет изолированное антитело против C1q, которое связывается с белком C1q и связывается с одной или несколькими аминокислотами белка C1q в интервалах аминокислотных остатков, выбранных из группы, состоящей из: i. аминокислотных остатков 96-226 из SEQ ID NO:1 (SEQ ID NO:16), или аминокислотных остатков цепи белка C1q (C1qA), соответствующих аминокислотным остаткам 196-226 (GLFQWSGGMVLQLQGDQVWVEKDPKKGHI) из SEQ ID NO:1 (SEQ ID NO:16); ii. аминокислотных остатков 196-221 из SEQ ID NO:1 (SEQ ID NO:17), или аминокислотных остатков из C1qA, соответствующих аминокислотным остаткам 196-221 (GLFQWSGGMVLQLQGDQVWVEKDP) из SEQ ID NO:1 (SEQ ID NO:17); iii. аминокислотных остатков 202-221 из SEQ ID NO:1 (SEQ ID NO:18), или аминокислотных остатков из C1qA, соответствующих аминокислотным остаткам 202-221 (SGGMVLQLQGDQVWVEKDP) из SEQ ID NO:1 (SEQ ID NO:18); iv. аминокислотных остатков 202-219 из SEQ ID NO:1 (SEQ ID NO:19), или аминокислотных остатков из C1qA, соответствующих аминокислотным остаткам 202-219 SGGMVLQLQGDQVWVEK из SEQ ID NO:1 (SEQ ID NO:19); и v. аминокислотных остатков Lys 219 и/или Ser 202 из SEQ ID NO:1, или аминокислотных остатков из C1qA, соответствующих Lys 219 и/или Ser 202 из SEQ ID NO:1. В нескольких вариантах осуществления, антитело дополнительно связывается с одной или несколькими аминокислотами белка C1q в интервалах аминокислотных остатков, выбранных из группы, состоящей из: (a) аминокислотных остатков 218-240 из SEQ ID NO:3 (SEQ ID NO:20) или аминокислотных остатков цепи белка C1qC (C1qC) соответствующих аминокислотным остаткам 218-240 (WLAVNDYYDMVGI QGSDSVFSGF) из SEQ ID NO:3 (SEQ ID NO:20); (b) аминокислотных остатков 225-240 из SEQ ID NO:3 (SEQ ID NO:21) или аминокислотных остатков из C1qC, соответствующих аминокислотным остаткам 225-240 (YDMVGI QGSDSVFSGF) из SEQ ID NO:3 (SEQ ID NO:21); (c) аминокислотных остатков 225-232 из SEQ ID NO:3 (SEQ ID NO:22) или аминокислотных остатков из C1qC, соответствующих аминокислотным остаткам 225-232 (YDMVGIQG) из SEQ ID NO:3 (SEQ ID NO:22); (d) аминокислотного остатка Tyr 225 из SEQ ID NO:3 или аминокислотного остатка из C1qC, соответствующего аминокислотному остатку Tyr 225 из SEQ ID NO:3; (e) аминокислотных остатков 174-196 из SEQ ID NO:3 (SEQ ID NO:23) или аминокислотных остатков из C1qC, соответствующих аминокислотным остаткам 174-196 (HTANLCVLLYRSGVKW TFCGHT) из SEQ ID NO:3 (SEQ ID NO:23); (f) аминокислотных остатков 184-192 из SEQ ID NO:3 (SEQ ID NO:24) или аминокислотных остатков из C1qC, соответствующих аминокислотным остаткам 184-192 (RSGVKWTF) из SEQ ID NO:3 (SEQ ID NO:24); (g) аминокислотных остатков 185-187 из SEQ ID NO:3

или аминокислотных остатков из C1qC, соответствующих аминокислотным остаткам 185-187 (SGV) из SEQ ID NO:3; и (h) аминокислотного остатка Ser 185 из SEQ ID NO:3 или аминокислотного остатка из C1qC, соответствующего аминокислотному остатку Ser 185 из SEQ ID NO:3. В некоторых вариантах осуществления, антитело представляет собой гуманизированное антитело, химерное антитело или человеческое антитело. В некоторых вариантах осуществления, антитело связывается с аминокислотным остатком Lys 219 и Ser 202 из человеческого C1qA, как показано в SEQ ID NO:1 или аминокислотами человеческого C1qA, соответствующими Lys 219 и Ser 202, как показано в SEQ ID NO:1, и аминокислотным остатком Tyr 225 человеческого C1qC, как показано в SEQ ID NO:3, или аминокислотным остатком из человеческого C1qC, соответствующим Tyr 225, как показано в SEQ ID NO:3. В некоторых вариантах осуществления, антитело связывается с аминокислотным остатком Lys 219 человеческого C1qA, как показано в SEQ ID NO:1 или аминокислотным остатком из человеческого C1qA, соответствующим Lys 219, как показано в SEQ ID NO:1, и аминокислотным остатком Ser 185 человеческого C1qC, как показано в SEQ ID NO:3, или аминокислотным остатком из человеческого C1qC, соответствующим Ser 185, как показано в SEQ ID NO:3.

В некоторых аспектах, настоящее раскрытие предоставляет изолированное антитело против C1q, которое связывается с белком C1q и связывается с одной или несколькими аминокислотами белка C1q в интервалах аминокислотных остатков, выбранных из группы, состоящей из: (a) аминокислотных остатков 218-240 из SEQ ID NO:3 (SEQ ID NO:20) или аминокислотных остатков из C1qC, соответствующих аминокислотным остаткам 218-240 (WLAVNDYYDMVGI QGSDSVFSGF) из SEQ ID NO:3 (SEQ ID NO:20); (b) аминокислотных остатков 225-240 из SEQ ID NO:3 (SEQ ID NO:21) или аминокислотных остатков из C1qC, соответствующих аминокислотным остаткам 225-240 (YDMVGI QGSDSVFSGF) из SEQ ID NO:3 (SEQ ID NO:21); (c) аминокислотных остатков 225-232 из SEQ ID NO:3 (SEQ ID NO:22) или аминокислотных остатков из C1qC, соответствующих аминокислотным остаткам 225-232 (YDMVGIQG) из SEQ ID NO:3 (SEQ ID NO:22); (d) аминокислотного остатка Tyr 225 из SEQ ID NO:3 или аминокислотного остатка из C1qC, соответствующего аминокислотному остатку Tyr 225 из SEQ ID NO:3; (e) аминокислотных остатков 174-196 из SEQ ID NO:3 (SEQ ID NO:23) или аминокислотных остатков из C1qC, соответствующих аминокислотным остаткам 174-196 (HTANLCVLLYRSGVKW TFCGHT) из SEQ ID NO:3 (SEQ ID NO:23); (f) аминокислотных остатков 184-192 из SEQ ID NO:3 (SEQ ID NO:24) или аминокислотных остатков из C1qC, соответствующих аминокислотным остаткам 184-192 (RSGVKWTF) из SEQ ID NO:3 (SEQ ID NO:24); (g) аминокислотных остатков 185-187 из SEQ ID NO:3 или аминокислотных остатков из C1qC, соответствующих аминокислотным остаткам 185-187 (SGV) из SEQ ID NO:3; и (h) аминокислотного остатка Ser 185 из SEQ ID NO:3 или аминокислотного остатка из C1qC, соответствующего аминокислотному остатку Ser 185 из SEQ ID NO:3. В некоторых вариантах осуществления, антитело представляет собой гуманизированное антитело, химерное антитело или человеческое антитело. В некоторых вариантах осуществления, антитело связывается с аминокислотным остатком Lys 219 и Ser 202 из человеческого C1qA, как показано в SEQ ID NO:1, или аминокислотами из человеческого C1qA, соответствующими Lys 219 и Ser 202, как показано в SEQ ID NO:1, и аминокислотным остатком Tyr 225 человеческого C1qC, как показано в SEQ ID NO:3, или аминокислотным остатком из человеческого C1qC, соответствующим Tyr 225, как показано в SEQ ID NO:3. В некоторых вариантах осуществления, антитело связывается с аминокислотным остатком Lys 219 человеческого C1qA, как показано в SEQ ID NO:1, или аминокислотным остатком из человеческого C1qA, соответствующим Lys 219, как показано в SEQ ID NO:1, и аминокислотным остатком Ser 185 человеческого C1qC, как показано в SEQ ID NO:3, или аминокислотным остатком из человеческого C1qC, соответствующим Ser 185, как показано в SEQ ID NO:3.

В нескольких вариантах осуществления, которые могут комбинироваться с любым из предшествующих вариантов осуществления, антитело представляет собой гуманизированное антитело, химерное антитело или человеческое антитело. В нескольких вариантах осуществления, которые могут комбинироваться с любым из предшествующих вариантов осуществления, антитело специфически связывается как с человеческим C1q, так и с мышинным C1q. В нескольких вариантах осуществления, которые могут комбинироваться с любым из предшествующих вариантов осуществления, антитело специфически связывается с крысиным C1q. В нескольких вариантах осуществления, которые могут комбинироваться с любым из предшествующих вариантов осуществления, антитело специфически связывается с человеческим C1q, мышинным C1q и крысиным C1q. В нескольких вариантах осуществления, которые могут комбинироваться с любым из предшествующих вариантов осуществления, антитело имеет константу диссоциации (K_D) для человеческого C1q и мышинового C1q, которая находится в интервале от менее чем приблизительно 30 нМ до менее чем приблизительно 100 пМ. В нескольких вариантах осуществления, которые могут комбинироваться с любым из предшествующих вариантов осуществления, антитело имеет константу диссоциации (K_D) для человеческого C1q и мышинового C1q, равную менее чем приблизительно 30 нМ. В нескольких вариантах осуществления, которые могут комбинироваться с любым из предшествующих вариантов осуществления, антитело имеет константу диссоциации (K_D) для человеческого C1q и мышинового C1q, равную менее чем приблизительно 20 нМ. В нескольких вариантах осуществления, которые могут комбинироваться с любым из предшествующих вариантов осуществления, антитело имеет

константу диссоциации (K_D) для человеческого C1q и мышшиного C1q, равную менее чем приблизительно 10 нМ В нескольких вариантах осуществления, которые могут комбинироваться с любым из предшествующих вариантов осуществления, антитело имеет константу диссоциации (K_D) для человеческого C1q и мышшиного C1q, равную менее чем приблизительно 5 нМ В нескольких вариантах осуществления, которые могут комбинироваться с любым из предшествующих вариантов осуществления, антитело имеет константу диссоциации (K_D) для человеческого C1q и мышшиного C1q, равную менее чем приблизительно 1 нМ. В нескольких вариантах осуществления, которые могут комбинироваться с любым из предшествующих вариантов осуществления, антитело имеет константы диссоциации (K_D) для человеческого C1q и мышшиного C1q, равные менее чем 100 пМ, или менее чем приблизительно 100 пМ. В нескольких вариантах осуществления, которые могут комбинироваться с любым из предшествующих вариантов осуществления, антитело специфически связывается с C1q и нейтрализует его биологическую активность. В нескольких вариантах осуществления, которые могут комбинироваться с любым из предшествующих вариантов осуществления, антитело представляет собой (1) связывание C1q с аутоантителом, (2) связывание C1q с C1r, (3) связывание C1q с C1s, (4) связывание C1q с фосфатидилсеринем, (5) связывание C1q с пентраксином-3, (6) связывание C1q с C-реактивным белком (CRP), (7) связывание C1q с глобулярным рецептором C1q (gC1qR), (8) связывание C1q с рецептором 1 комплемента (CR1), (9) связывание C1q с β -амилоидом или (10) связывание C1q с кальретикулином. В нескольких вариантах осуществления, которые могут комбинироваться с любым из предшествующих вариантов осуществления, биологическая активность представляет собой (1) активацию пути активации классического комплемента, (2) активацию антитело- и комплемент-зависимой цитотоксичности, (3) гемолиз CH50, (4) потерю синапсов, (5) продуцирование антител В-клетками, (6) созревание дендритных клеток, (7) пролиферацию Т-клеток, (8) продуцирование цитокинов (9) активацию микроглии, (10) реакцию Артюса, (11) фагоцитоз синапсов или нервных окончаний или (12) активацию клеток, экспрессирующих рецептор 3 комплемента (CR3/C3). В нескольких вариантах осуществления, которые могут комбинироваться с любым из предшествующих вариантов осуществления, гемолиз CH50 включает в себя гемолиз человеческого, мышшиного и/или крысиного CH50. В нескольких вариантах осуществления, которые могут комбинироваться с любым из предшествующих вариантов осуществления, антитело способно к нейтрализации по меньшей мере 50%, по меньшей мере 80% или по меньшей мере 90% гемолиза CH50. В нескольких вариантах осуществления, которые могут комбинироваться с любым из предшествующих вариантов осуществления, антитело способно к нейтрализации по меньшей мере 50% гемолиза CH50 при дозе, равной менее чем 200 нг/мл, менее чем 100 нг/мл, менее чем 50 нг/мл или менее чем 20 нг/мл.

В нескольких вариантах осуществления, которые могут комбинироваться с любым из предшествующих вариантов осуществления, антитело представляет собой биспецифическое антитело. В нескольких вариантах осуществления, которые могут комбинироваться с любым из предшествующих вариантов осуществления, антитело конструируют, чтобы увеличить проницаемость в мозг. В нескольких вариантах осуществления, которые могут комбинироваться с любым из предшествующих вариантов осуществления, антитело представляет собой биспецифическое антитело, распознающее первый антиген и второй антиген. В нескольких вариантах осуществления, которые могут комбинироваться с любым из предшествующих вариантов осуществления, первый антиген представляет собой белок C1q, а второй антиген представляет собой антиген, облегчающий транспорт через гематоэнцефалический барьер. В нескольких вариантах осуществления, которые могут комбинироваться с любым из предшествующих вариантов осуществления, второй антиген выбирают из группы, состоящей из трансферринового рецептора (TR), инсулинового рецептора (HIR), рецептора инсулин-подобного фактора роста (IGFR), белков 1 и 2, относящихся к рецепторам липопротеинов низкой плотности (LPR-1 и 2), рецептора дифтерийного токсина, CRM197, однодоменного антитела ламы, TМЕМ 30(A), домена белковой трансдукции, TAT, Syn-B, пенетратина, поли-аргининового пептида, ангиопеп-пептида и ANG1005. В нескольких вариантах осуществления, которые могут комбинироваться с любым из предшествующих вариантов осуществления, антитело принадлежит к классу IgG. В нескольких вариантах осуществления, которые могут комбинироваться с любым из предшествующих вариантов осуществления, антитело имеет изотип IgG₁, IgG₂, IgG₃, или IgG₄. В нескольких вариантах осуществления, которые могут комбинироваться с любым из предшествующих вариантов осуществления, антитело представляет собой фрагмент антитела. В нескольких вариантах осуществления, которые могут комбинироваться с любым из предшествующих вариантов осуществления, антитело представляет собой фрагмент Fab, F(ab')₂, или Fab'. В нескольких вариантах осуществления, которые могут комбинироваться с любым из предшествующих вариантов осуществления, фрагмент антитела специфически связывается с C1q и нейтрализует его биологическую активность. В нескольких вариантах осуществления, которые могут комбинироваться с любым из предшествующих вариантов осуществления, фрагмент антитела имеет лучшую проницаемость в мозг по сравнению со своим соответствующим непротессированным антителом. В нескольких вариантах осуществления, которые могут комбинироваться с любым из предшествующих вариантов осуществления, фрагмент антитела имеет более короткое время полужизни по сравнению со своим соответствующим непротессированным антителом.

В некоторых аспектах, настоящее раскрытие предоставляет изолированный полинуклеотид, содер-

жащий последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую антитело данного раскрытия. В некоторых аспектах, настоящее раскрытие предоставляет изолированный полинуклеотид, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую антитело против С1q по любому из предшествующих вариантов осуществления. В некоторых аспектах, настоящее раскрытие предоставляет изолированную клетку-хозяина, содержащую последовательность нуклеиновой кислоты данного раскрытия. В некоторых аспектах, настоящее раскрытие предоставляет изолированную клетку-хозяина, содержащую последовательность нуклеиновой кислоты по любому из предшествующих вариантов осуществления. В некоторых аспектах, настоящее раскрытие предоставляет клетку гибридомы, депонированной с учетным номером АТСС РТА-120399 или ее потомства. В некоторых аспектах, настоящее раскрытие предоставляет фармацевтическую композицию, содержащую антитело данного раскрытия и фармацевтически приемлемый носитель. В некоторых аспектах, настоящее раскрытие предоставляет фармацевтическую композицию, содержащую антитело против С1q по любому из предшествующих вариантов осуществления и фармацевтически приемлемый носитель.

В некоторых аспектах, настоящее раскрытие предоставляет способ лечения или предотвращения заболевания, ассоциированного с активацией комплемента у индивидуума, нуждающегося в таком лечении, способ, включающий в себя стадию введения терапевтически эффективной дозы антитела данного раскрытия. В некоторых аспектах, настоящее раскрытие предоставляет способ лечения или предотвращения заболевания, ассоциированного с активацией комплемента у индивидуума, нуждающегося в таком лечении, способ, включающий в себя стадию введения терапевтически эффективной дозы антитела против С1q по любому из предшествующих вариантов осуществления. В других аспектах, настоящее раскрытие предоставляет антитело против С1q по любому из предшествующих вариантов осуществления для применения при лечении и предотвращении заболевания, ассоциированного с активацией комплемента у индивидуума, нуждающегося в таком лечении. В других аспектах, настоящее раскрытие предоставляет применение антитела против С1q по любому из предшествующих вариантов осуществления в производстве лекарственного средства для лечения и предотвращения заболевания, ассоциированного с активацией комплемента у индивидуума, нуждающегося в таком лечении.

В нескольких вариантах осуществления, которые могут комбинироваться с любым из предшествующих вариантов осуществления, заболевание, ассоциированное с активацией комплемента, представляет собой нейродегенеративное расстройство. В нескольких вариантах осуществления, которые могут комбинироваться с любым из предшествующих вариантов осуществления, нейродегенеративное расстройство является ассоциированным с потерей синапсов или соединений нервов. В нескольких вариантах осуществления, которые могут комбинироваться с любым из предшествующих вариантов осуществления, нейродегенеративное расстройство является ассоциированным с потерей синапсов, которая является зависимой от рецептора комплемента 3(CR3)/C3 или рецептора комплемента CR1. В нескольких вариантах осуществления, которые могут комбинироваться с любым из предшествующих вариантов осуществления, нейродегенеративное расстройство является ассоциированным с зависимым от патологической активности синаптического прунинга. В нескольких вариантах осуществления, которые могут комбинироваться с любым из предшествующих вариантов осуществления, нейродегенеративное расстройство является ассоциированным с фагоцитозом синапсов микроглией. В нескольких вариантах осуществления, которые могут комбинироваться с любым из предшествующих вариантов осуществления, нейродегенеративное расстройство представляет собой болезнь Альцгеймера, боковой амиотрофический склероз, рассеянный склероз, глаукому, миотоническую дистрофию, синдром Дауна, болезнь Паркинсона или болезнь Хантингтона. В нескольких вариантах осуществления, которые могут комбинироваться с любым из предшествующих вариантов осуществления, заболевание, ассоциированное с активацией комплемента, представляет собой воспалительное заболевание, аутоиммунное заболевание или метаболическое нарушение. В нескольких вариантах осуществления, которые могут комбинироваться с любым из предшествующих вариантов осуществления, воспалительное заболевание, аутоиммунное заболевание или метаболическое нарушение представляет собой диабет, ожирение, ревматоидный артрит (RA), острый респираторный дистресс-синдром (ARDS), отдаленное повреждение ткани после ишемии и реперфузии, активацию комплемента во время операции на сердце в условиях искусственного кровообращения, дерматомиозит, пемфигус, волчаночный нефрит и результирующий гломерулонефрит и васкулит, сердечно-легочное шунтирование, индуцированную кардиоплегией эндотелиальную дисфункцию, мембранозно-пролиферативный гломерулонефрит типа II, нефропатию IgA, острую почечную недостаточность, криоглобулинемию, антифосфолипидный синдром, дегенеративные заболевания желтого пятна, возрастную дегенерацию желтого пятна (AMD), хороидальную неоваскуляризацию (CNV), увеит, диабетическую ретинопатию, относящуюся к ишемии ретинопатию, эндофтальмит, внутриглазное неоваскулярное заболевание, диабетический отек желтого пятна, патологическую миопию, болезнь фон Гиппеля-Линдау, гистоплазмоз глаз, нейромиелит зрительного нерва (NMO), окклюзию центральной вены сетчатки (CRVO), неоваскуляризацию роговицы, неоваскуляризацию сетчатки, аллотрансплантацию, сверхострое отторжение, гемодиализ, хронический окклюзионный легочный дистресс-синдром (COPD), астму или аспирационную пневмонию. В нескольких вариантах осуществления, которые могут комбинироваться с любым из предшествующих вариантов осуществления, заболевание, ассо-

циированное с активацией комплемента, представляет собой аутоиммунное заболевание, выбранное из группы, состоящей из тяжелой миастении, сахарного диабета первого типа, тиреоидита Хашимото, болезни Аддисона, Целиакии, болезни Крона, злокачественной анемии, обыкновенной пузырчатки, витилиго, аутоиммунных гемолитических анемий, паранеопластических синдромов, васкулитного заболевания, ревматической полимиалгии, темпорального артериита и гранулематоза Вегенера.

В некоторых аспектах, настоящее раскрытие предоставляет набор, содержащий антитело против C1q по любому из предшествующих вариантов осуществления, и листовку-вкладыш в упаковке, содержащую инструкции по применению антитела для лечения или предотвращения заболевания, ассоциированного с активацией комплемента у индивидуума, нуждающегося в таком лечении. В нескольких вариантах осуществления, заболевание, ассоциированное с активацией комплемента, представляет собой нейродегенеративное расстройство. В нескольких вариантах осуществления, нейродегенеративное расстройство является ассоциированным с потерей синапсов или потерей соединений нервов. В нескольких вариантах осуществления, нейродегенеративное расстройство является ассоциированным с потерей синапсов, которая является зависимой от рецептора комплемента 3(CR3)/C3 или рецептора комплемента CR1. В нескольких вариантах осуществления, нейродегенеративное расстройство является ассоциированным с зависимым от патологической активности синаптического прунинга. В нескольких вариантах осуществления, нейродегенеративное расстройство является ассоциированным с фагоцитозом синапсов микроглией. В нескольких вариантах осуществления, нейродегенеративное расстройство выбирают из группы, состоящей из болезни Альцгеймера, бокового амиотрофического склероза, рассеянного склероза, глаукомы, миотонической дистрофии, синдрома Дауна, болезни Паркинсона и болезни Хантингтона. В нескольких вариантах осуществления, заболевание, ассоциированное с активацией комплемента, представляет собой воспалительное заболевание, аутоиммунное заболевание или метаболическое нарушение. В нескольких вариантах осуществления, воспалительное заболевание, аутоиммунное заболевание или метаболическое нарушение выбирают из группы, состоящей из диабета, ожирения, ревматоидного артрита (RA), острого респираторного дистресс-синдрома (ARDS), отдаленного повреждения ткани после ишемии и реперфузии, активации комплемента во время операции на сердце в условиях искусственного кровообращения, дерматомиозита, пемфигуса, волчаночного нефрита и результирующего гломерулонефрита и васкулита, сердечно-легочного шунтирования, индуцированной кардиоплегией эндотелиальной дисфункции, мембранозно-пролиферативного гломерулонефрита типа II, нефропатии IgA, острой почечной недостаточности, криоглобулинемии, антифосфолипидного синдрома, дегенеративных заболеваний желтого пятна, возрастной дегенерации желтого пятна (AMD), хороиальной неоваскуляризации (CNV), увеита, диабетической ретинопатии, относящейся к ишемии, ретинопатии, эндофтальмита, внутриглазного неоваскулярного заболевания, диабетического отека желтого пятна, патологической миопии, болезни фон Гиппеля-Линдау, гистоплазмоза глаз, нейромиеелита зрительного нерва (NMO), окклюзии центральной вены сетчатки (CRVO), неоваскуляризации роговицы, неоваскуляризации сетчатки, аллотрансплантации, сверхострого отторжения, гемодиализа, хронического окклюзионного легочного дистресс-синдрома (COPD), астмы и аспирационной пневмонии. В нескольких вариантах осуществления, заболевание, ассоциированное с активацией комплемента, представляет собой аутоиммунное заболевание, выбранное из группы, состоящей из тяжелой миастении, сахарного диабета первого типа, тиреоидита Хашимото, болезни Аддисона, целиакии, болезни Крона, злокачественной анемии, обыкновенной пузырчатки, витилиго, аутоиммунных гемолитических анемий, паранеопластических синдромов, васкулитного заболевания, ревматической полимиалгии, темпорального артериита и гранулематоза Вегенера.

В некоторых аспектах, настоящее раскрытие предоставляет диагностический набор, содержащий антитело данного раскрытия. В некоторых аспектах, настоящее раскрытие предоставляет набор, содержащий антитело против C1q по любому из предшествующих вариантов осуществления. В нескольких вариантах осуществления, набор предназначен для диагностических или терапевтических применений, как раскрыто в данном описании.

В некоторых аспектах, настоящее раскрытие предоставляет способ обнаружения синапсов у индивидуума, имеющего нейродегенеративное заболевание или аутоиммунное заболевание, способ, включающий в себя: а) введение антитела данного раскрытия индивидууму, и б) обнаружение антитела, связанного с синапсами, таким образом, обнаружение синапсов у индивидуума. В других аспектах, настоящее раскрытие предоставляет способ обнаружения синапсов у индивидуума, посредством а) введения антитела против C1q по любому из предшествующих вариантов осуществления индивидууму, и б) обнаружения антитела, связанного с синапсами, таким образом, обнаружения синапсов у индивидуума. В других аспектах, настоящее раскрытие предоставляет антитело против C1q по любому из предшествующих вариантов осуществления для применения при обнаружении синапсов у индивидуума. В других аспектах, настоящее раскрытие предоставляет применение антитела против C1q по любому из предшествующих вариантов осуществления в производстве лекарственного средства для обнаружения синапсов у индивидуума. В нескольких вариантах осуществления, которые могут комбинироваться с любым из предшествующих вариантов осуществления, антитело, связанное с синапсами, обнаруживают, используя методы визуализации, выбранные из группы, состоящей из позитронно-эмиссионной томографии (ПЭТ), рентгеновской компьютерной томографии, однофотонной эмиссионной компьютерной томографии

(ОФЭКТ), компьютерной томографии (КТ) и компьютерной аксиальной томографии (КАТ). В нескольких вариантах осуществления, которые могут комбинироваться с любым из предшествующих вариантов осуществления, обнаружение антитела, связанного с синапсами, предоставляет количественный показатель числа синапсов у индивидуума. В нескольких вариантах осуществления, которые могут комбинироваться с любым из предшествующих вариантов осуществления, индивидуум имеет нейродегенеративное заболевание или аутоиммунное заболевание. В нескольких вариантах осуществления, которые могут комбинироваться с любым из предшествующих вариантов осуществления, число синапсов у индивидуума измеряют повторно в течение периода времени, и потерю синапсов у индивидуума обнаруживают с течением времени. В нескольких вариантах осуществления, которые могут комбинироваться с любым из предшествующих вариантов осуществления, потеря синапсов в динамике является показателем эффективности лечения нейродегенеративного заболевания или аутоиммунного заболевания.

В некоторых аспектах, настоящее раскрытие предоставляет способ обнаружения синапсов в биологическом образце, способ, включающий в себя: а) контактирование биологического образца с антителом данного раскрытия и б) обнаружение антитела, связанного с синапсами, таким образом, обнаружение синапсов в биологическом образце. В некоторых аспектах, настоящее раскрытие предоставляет способ обнаружения синапсов в биологическом образце, способ, включающий в себя а) контактирование биологического образца с антителом данного раскрытия и б) обнаружение антитела, связанного с синапсами, таким образом, обнаружение синапсов в биологическом образце. В других аспектах, настоящее раскрытие предоставляет способ обнаружения синапсов в биологическом образце, посредством а) контактирования биологического образца с антителом против C1q по любому из предшествующих вариантов осуществления, и б) обнаружения антитела, связанного с синапсами, таким образом, обнаружения синапсов у индивидуума.

В нескольких вариантах осуществления, которые могут комбинироваться с любым из предшествующих вариантов осуществления, способ дополнительно включает в себя стадию перед стадией а), получения биологического образца от индивидуума. В нескольких вариантах осуществления, которые могут комбинироваться с любым из предшествующих вариантов осуществления, биологический образец содержит биопат, ткань или клетку. В нескольких вариантах осуществления, которые могут комбинироваться с любым из предшествующих вариантов осуществления, антитело обнаруживают посредством иммунофлуоресцентной микроскопии, иммуноцитохимии, иммуногистохимии, ELISA, анализа FACS или иммунопреципитации.

Следует понимать, что одно, несколько или все из свойств различных вариантов осуществления, описанных в данном документе, могут комбинироваться с образованием других вариантов осуществления композиций и способов, предоставленных в данном описании. Эти и другие аспекты композиций и способов, предоставленных в данном описании, станут очевидными для специалиста в данной области.

Описание чертежей

Фиг. 1 иллюстрирует результаты скрининга ELISA для антител, специфически связывающих человеческий C1q. Тестировали супернатанты гибридомы, содержащие антитела 1C7, 2A1, 3A2, или 5A3 против C1q соответственно. Левые столбцы (серые) представляют сигналы от связывания антитела против C1q с человеческим белком C1q. Правые столбцы (черные) представляют сигналы от связывания антитела против C1q с человеческим трансферрином (HT);

фиг. 2 - C1q-нейтрализующие активности антител 1C7, 2A1, 3A2, и 5A3 против C1q в тесте на гемолиз человеческого CH50 в формате однократной дозы;

фиг. 3 иллюстрирует C1q-нейтрализующие активности антител 1C7, 3A2 и 4A4B11 против C1q в тесте на гемолиз человеческого CH50 в формате доза-ответ;

фиг. 4 - C1q-нейтрализующие активности антител M1 и 4A4B11 против C1q в тестах на гемолиз человеческого, мышинового и крысиного CH50 в формате доза-ответ. Фиг. 4А иллюстрирует результаты теста на гемолиз человеческого CH50. Фиг. 4В иллюстрирует результаты теста на гемолиз мышинового CH50. Фиг. 4С иллюстрирует результаты теста на гемолиз крысиного CH50;

фиг. 5 - масс-спектрометрическую характеристику комплексов антитела против C1q. Фиг. 5А показывает смесь ANN-001 (4A4B11) и C1q и показывает, что мономер ANN-001 при предсказанной массе ~150 кДа, мономер C1q при ожидаемой массе ~460 кДа, и комплекс C1q/ANN-001 1:1 при предсказанной массе, равной ~600 кДа. Фиг. 5В показывает смесь ANN-005 (M1) и C1q и показывает мономер ANN-005 при предсказанной массе, равной ~150 кДа, мономер C1q при ожидаемой массе, равной ~460 кДа, и комплекс C1q/ANN-005 1:1 при предсказанной массе, равной ~600 кДа;

фиг. 6 иллюстрирует, что пептиды C1q не конкурируют с интактным C1q за связывание с моноклональным антителом ANN-005 (M1). Фиг. 6А отображает C1q и ANN-005, смешанные в эквимоллярных концентрациях и инкубированные в отсутствие смеси пептидов C1q. Фиг. 6В отображает C1q и ANN-005, смешанные в эквимоллярных концентрациях и инкубированные в присутствии смеси пептидов C1q, генерируемых посредством расщепления C1q пепсином, и анализируемые посредством масс-спектрометрии. В каждом случае, часть несвязанного антитела и антиген (ANN-005 и C1q) могут быть идентифицированы при ожидаемых массах для мономеров (~150 и ~460 кДа соответственно), а комплекс 1:1 присутствует при массе, равной ~615 кДа.

Подробное описание изобретения

Общие методы.

Методы и методики, описанные в данном документе, или упоминаемые посредством ссылок, обычно являются хорошо понимаемыми и общепринято используемыми с применением традиционной методологии специалистами в данной области, такой как, например, широко используемые методологии, описанные в Sambrook et al., *Molecular Cloning 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)); series *Methods in Enzymology* (Academic Press, Inc.): *PCR 2: Practical Approach* (M.J. MacPherson, B.D. Hames and G.R. Taylor eds. (1995)), Harlow and Lane, eds. (1988) *Antibodies, Laboratory Manual*, and *Animal Cell Culture* (R.I. Freshney, ed. (1987)); *Oligonucleotide Synthesis* (M.J. Gait, ed., 1984); *Methods in Molecular Biology*, Human Press; *Cell Biology: 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: 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: 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); and *Cancer: Principles and Practice of Oncology* (V.T. DeVita et al., eds., J.B. Lippincott Company, 1993).

Определения.

Как используют в данном описании, термин "предотвращение" включает обеспечение профилактики по отношению к возникновению или рецидиву конкретного заболевания, расстройства или состояния у индивидуума. Индивидуум может быть предрасположен, подвержен конкретному заболеванию, расстройству или состоянию или иметь риск развития такого заболевания, расстройства или состояния, но еще не диагностирован с заболеванием, расстройством или состоянием.

Как используют в данном описании, индивидуум "имеющий риск" развития конкретного заболевания, расстройства или состояния, может иметь или не иметь обнаруживаемые заболевание или симптомы заболевания и может иметь или не иметь проявляемые обнаруживаемое заболевание или симптомы заболевания, предшествующие способам лечения, описанным в данном документе. "Имеющий риск" означает, что индивидуум имеет один или несколько факторов риска, которые представляют собой измеряемые параметры, которые коррелируют с развитием конкретного заболевания, расстройства или состояния, как известно в данной области. Индивидуум, имеющий один или несколько из этих факторов риска, имеет более высокую вероятность развития конкретного заболевания, расстройства или состояния, чем индивидуум без одного или нескольких из этих факторов риска.

Как используют в данном описании, термин "лечение" относится к клиническому вмешательству, направленному на изменение природного пути развития индивидуума, подвергаемого лечению, во время прохождения клинической патологии. Желательные эффекты лечения включают снижение скорости прогрессирования, уменьшение интенсивности или временное ослабление патологического состояния, и ремиссию или улучшенный прогноз развития конкретного заболевания, расстройства или состояния. Индивидуум успешно "лечится", например, если один или несколько симптомов, ассоциированных с конкретным заболеванием, расстройством или состоянием, смягчаются или устраняются.

"Эффективное количество" относится по меньшей мере к количеству, эффективному, при дозировках и в течение периодов времени, необходимых для достижения желательного терапевтического или профилактического результата. Эффективное количество может быть обеспечено при одном или нескольких введениях.

"Терапевтически эффективное количество" является, по меньшей мере, минимальной концентрацией, требуемой для оказания измеряемого улучшения конкретного заболевания, расстройства или состояния. Терапевтически эффективное количество в данном описании может варьировать в соответствии с факторами, такими как состояние заболевания, возраст, пол и масса тела пациента, и способность антитела против С1q вызывать желательный ответ у индивидуума. Терапевтически эффективное количество также является количеством, при котором любые токсические или вредные эффекты антитела против С1q перевешиваются терапевтически благоприятными эффектами.

"Постоянное" введение относится к введению лекарственных средства (средств) в непрерывном режиме, в противоположность к резкому введению, так, чтобы поддерживать первоначальные терапевтический эффект (активность) в течение продолжительного периода времени. "Периодическое" введение относится к лечению, которое не проводится последовательно без прерывания, но скорее является циклическим по природе.

Как используют в данном описании, введение "совместно" с еще одним другим соединением или другой композицией включает одновременное введение и/или введение в различное время. Совместное

введение также охватывает введение в виде совместной лекарственной формы или введение в виде раздельных композиций, включая введение при различных частотах или интервалах дозирования, и использование такого же пути введения или различных путей введения.

"Индивидуум" для целей лечения, предотвращения или снижения риска относится к любому животному, классифицируемому как млекопитающее, включая людей, домашних и сельскохозяйственных животных, и содержащихся в зоопарке, спортивных или комнатных животных, таких как собаки, лошади, кролики, крупный рогатый скот, свиньи, хомяки, песчанки, мыши, хорьки, крысы, кошки и т.п. В нескольких вариантах осуществления индивидуум является человеком.

Как используют в данном описании, "аутоантитело" означает любое антитело, которое распознает антиген хозяина.

Термин "иммуноглобулин" (Ig) используют взаимозаменяемо с термином "антитело" в данном описании. Термин "антитело" в данном документе используется в самом широком смысле и конкретно охватывает моноклональные антитела, поликлональные антитела, мультиспецифические антитела (например, биспецифические антитела), образованные по меньшей мере из двух интактных антител, и фрагменты антител постольку, поскольку они проявляют желательную биологическую активность.

Основной 4-цепочечный блок антитела представляет собой гетеротетрамерный гликопротеин, составленный из двух идентичных легких (L) цепей и двух идентичных тяжелых (H) цепей. Спаривание V_H и V_L вместе образует единственный антигенсвязывающий участок. Структуру и свойства различных классов антител, см., например, *Basic and Clinical Immunology*, 8th Ed., Daniel P. Stites, Abba I. Terr and Tristram G. Parslow (eds.), Appleton & Lange, Norwalk, CT, 1994, page 71 и Chapter 6.

L-цепь от любого вида позвоночных может быть отнесена к одному из двух четко отличающихся типов, называемых каппа ("κ") и лямбда ("λ"), на основании аминокислотных последовательностей их константных доменов. В зависимости от аминокислотной последовательности константного домена их тяжелых цепей (CH) иммуноглобулины могут быть отнесены к различным классам или изотипам. Существует пять классов иммуноглобулинов: IgA, IgD, IgE, IgG и IgM, имеющих тяжелые цепи, обозначенные альфа ("α"), дельта ("δ"), эпсилон ("ε"), гамма ("γ") и мю ("μ") соответственно. γ и α классы дополнительно подразделяют на подклассы (изотипы) на основании относительно минорных различий в последовательности и функции CH, например, люди экспрессируют следующие подклассы: IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и IgA2. Структуры субъединиц и трехмерные конфигурации различных классов иммуноглобулинов являются хорошо известными и описаны в общем виде, например в Abbas et al., *Cellular and Molecular Immunology*, 4th ed. (W.B. Saunders Co., 2000).

"Нативные антитела" обычно представляют собой гетеротетрамерные гликопротеины с массой приблизительно 150000 Да, составленные из двух идентичных легких (L) цепей и двух идентичных тяжелых (H) цепей. Каждая легкая цепь связана с тяжелой цепью одной ковалентной дисульфидной связью, в то время как число дисульфидных связей варьирует среди тяжелых цепей различных иммуноглобулиновых изоформ. Каждая тяжелая и легкая цепь также имеет равномерно распределенные межцепные дисульфидные мостики. Каждая тяжелая цепь имеет по одному концу переменный домен (V_H), сопровождаемый рядом константных доменов. Каждая легкая цепь имеет переменный домен по одному концу (V_L) и константный домен по ее другому концу; константный домен легкой цепи соответствует первому константному домену тяжелой цепи, а переменный домен легкой цепи соответствует переменному домену тяжелой цепи. Полагают, что конкретные аминокислотные остатки образуют область контакта между переменными доменами легкой цепи и тяжелой цепи.

"Изолированное" антитело, такое как антитело против C1q настоящего раскрытия, представляет собой антитело, которое было идентифицировано, отделено и/или извлечено из компонентов его продуцирующей среды (например, природным или рекомбинантным образом). В нескольких вариантах осуществления изолированный полипептид не имеет ассоциации со всеми другими загрязняющими компонентами из его продуцирующей среды. Загрязняющие компоненты из его продуцирующей среды, такие как компоненты, происходящие из рекомбинантных трансфицированных клеток, являются веществами, которые обычно будут препятствовать исследовательским, диагностическим или терапевтическим применениям антитела и могут включать ферменты, гормоны и другие белковые или небелковые растворенные вещества. В нескольких вариантах осуществления, полипептид будет очищен: (1) до более чем 95 мас.% антитела, как определяют, например, методом Лоури, и в нескольких вариантах осуществления, до более чем 99 мас.%; (2) до степени, достаточной для получения по меньшей мере 15 остатков N-концевой или внутренней аминокислотной последовательности посредством применения секвенатора с вращающимся стаканом, или (3) до гомогенности посредством SDS-PAGE при невозстанавливающих или восстанавливающих условиях с использованием окрашивания Кумасси голубым или серебром. Изолированное антитело включает антитело *in situ* внутри рекомбинантных Т-клеток, так как по меньшей мере один компонент природной среды антитела не будет присутствовать. Как правило, однако, изолированные полипептид или антитело будут получены посредством по меньшей мере одной стадии очистки.

"Переменная область" или "переменный домен" антитела, такого как антитело против C1q настоящего раскрытия, относится к аминоконцевым доменам тяжелой или легкой цепи антитела. Вари-

белые домены тяжелой цепи и легкой цепи могут именоваться "V_H" и "V_L" соответственно. Эти домены обычно являются наиболее переменными частями антитела (относительно других антител того же самого класса) и содержат антигенсвязывающие участки.

Термин "переменные" относится к тому факту, что некоторые сегменты переменных доменов в значительной степени отличаются по последовательности среди антител, таких как антитела против С1q настоящего раскрытия. V домен опосредует связывание антигена и определяет специфичность конкретного антитела для его конкретного антигена. Однако переменность не является равномерно распределенной на протяжении полного диапазона переменных доменов. Вместо этого она концентрируется в трех сегментах, называемых гиперпеременными областями (HVR), в переменных доменах как легкой цепи, так и тяжелой цепи. В более высокой степени консервативные части переменных доменов называют каркасными областями (FR). Каждый из переменных доменов нативных тяжелых и легких цепей содержит четыре области FR, главным образом принимающих β-складчатую конфигурацию, соединенные тремя HVR, которые образуют петли, соединяющие, и в некоторых случаях образующие часть β-складчатой структуры. HVR в каждой цепи удерживаются вместе в непосредственной близости FR областями и, вместе с HVR от другой цепи, способствуют образованию антигенсвязывающего участка антитела (см. Kabat et al., *Sequences of Immunological Interest*, Fifth Edition, National Institute of Health, Bethesda, MD (1991)). Константные домены не являются вовлеченными непосредственно в связывание антитела с антигеном, но проявляют различные эффекторные функции, такие как участие антитела в антигенозависимой клеточной цитотоксичности.

Термин "моноклональное антитело", как используют в данном описании, относится к антителу, такому как антитело против С1q настоящего раскрытия, полученному из популяции по существу гомогенных антител, т.е. индивидуальные антитела, составляющие популяцию являются идентичными за исключением возможных природных мутаций и/или посттрансляционных модификаций (например, изомеризаций, амидирований), которые могут присутствовать в минорных количествах. Моноклональные антитела являются высокоспецифичными, являясь направленными против единичного антигенного участка. В отличие от препаратов поликлональных антител, которые типично включают различные антитела, направленные против различных детерминант (эпитопов), каждое моноклональное антитело направлено против единственной детерминанты на антигене. В дополнение к их специфичности, моноклональные антитела являются преимущественными в том, что их синтезируют посредством культивирования гибридомы, незагрязненной другими иммуноглобулинами. Модификатор "моноклональные" указывает на характер антител, как полученных по существу из гомогенной популяции антитела, и не следует рассматривать, как требующий получения антител каким-либо конкретным способом. Например, моноклональные антитела для применения в соответствии с настоящим изобретением могут быть получены различными технологиями, включающими, например, метод гибридомы (например, Kohler and Milstein, *Nature*, 256:495-97 (1975); Hongo et al., *Hybridoma*, 14 (3):253-260 (1995), Harlow et al., *Antibodies: Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2d ed. 1988); Hammerling et al., в: *Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas* 563-681 (Elsevier, N.Y., 1981)), методы рекомбинантных ДНК (см., например, патент США № 4816567), технологии фагового отображения (см., например, 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); и Lee et al., *J. Immunol. Methods* 284 (1-2): 119-132 (2004), и технологии продуцирования человеческих или подобных человеческим антител у животных, которые имеют части или все из человеческих иммуноглобулиновых локусов или генов, кодирующих последовательности человеческих иммуноглобулинов (см., например, 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); патенты США № 5545807; 5545806; 5569825; 5625126; 5633425 и 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); и Lonberg and Huszar, *Intern. Rev. Immunol.* 13:65-93 (1995).

Термины "непроцессированное антитело", "интактное антитело" или "цельное антитело" используют взаимозаменяемо для обозначения антитела, такого как антитело против С1q настоящего раскрытия, в его по существу интактной форме, в противоположность фрагменту антитела. Конкретно цельные антитела включают антитела с тяжелыми и легкими цепями, включающими область Fc. Константные домены могут представлять собой константные домены с нативными последовательностями (например, человеческие константные домены с нативными последовательностями) или их вариантами аминокислотной последовательности. В некоторых случаях интактное антитело может иметь одну или несколько эффекторных функций.

"Фрагмент антитела" содержит часть интактного антитела, антигенсвязывающую и/или переменную область интактного антитела. Примеры фрагментов антител включают фрагменты Fab, Fab', F(ab')₂ и Fv; диатела; линейные антитела (см. патент США 5641870, пример 2; Zapata et al., *Protein Eng.* 8(10):1057-1062 (1995)); молекулы одноцепочечных антител и мультиспецифические антитела, образо-

ванные из фрагментов антител.

Обработка папаином антител, таких как антитела против C1q настоящего раскрытия, производит два идентичных антигенсвязывающих фрагмента, называемых "Fab"-фрагментами, и остаточный "Fc" фрагмент, обозначение которого отражает способность легко кристаллизоваться. Фрагмент Fab состоит из полной L цепи наряду с доменом переменной области H цепи (V_H), и первого константного домена одной тяжелой цепи (C_{H1}). Каждый Fab фрагмент является моновалентным по отношению к связыванию антигена, т.е. он имеет единственный антигенсвязывающий участок. Обработка антитела пепсином дает на выходе одиночный крупный фрагмент $F(ab')_2$, который приблизительно соответствует двум связанным дисульфидом фрагментам Fab, имеющим различную антигенсвязывающую активность, и все еще способен к сшивке с антигеном. Фрагменты Fab' отличаются от фрагментов Fab обладанием нескольких дополнительных остатков по карбокси-концу домена C_{H1} , включающих один или несколько цистеинов из шарнирной области антитела. Fab'-SH в данном описании является обозначением для Fab', в котором цистеиновые остатки(остатки) константных доменов несут свободную тиольную группу. $F(ab')_2$ фрагменты антитела изначально были получены как пары Fab' фрагментов которые имеют шарнирные цистеины между ними. Также известны другие химические сочетания фрагментов антител.

Fc-фрагмент содержит карбокси-концевые части обеих H цепей, удерживаемых вместе дисульфидами. Эффекторные функции антител определяются последовательностями в Fc-области, области, которая также распознается по Fc-рецепторам (FcR), обнаруженным на некоторых типах клеток.

"Fv" представляет собой минимальный фрагмент антитела, который содержит полный участок распознавания и связывания антигена. Этот фрагмент состоит из димера доменов переменной области одной тяжелой и одной легкой цепи, находящихся в тесной, нековалентной ассоциации. В результате складчатости этих двух доменов возникают шесть гипервариабельных петель (по 3 петли от каждой из H и L цепей), которые способствуют связыванию антигена аминокислотными остатками и придают специфичность связыванию антигена с антителом. Однако даже одиночный переменной домен (или половина Fv, содержащая только три HVR, специфичных к антигену) обладает способностью распознавать и связывать антиген, несмотря на более низкую аффинность, чем у всего участка связывания.

"Одноцепочечные Fv", также сокращаемые как "sFv" или "scFv", представляют собой фрагменты антител, которые содержат V_H и V_L домены антитела, соединенные в одиночную полипептидную цепь. В нескольких вариантах осуществления полипептид sFv дополнительно содержит полипептидный линкер между V_H и V_L доменами, который делает возможным для sFv образовать желательную структуру для связывания антигена. Обзор по sFv, см. Pluckthun in *Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenberg и Moore eds., Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994).

"Функциональные фрагменты" антител, таких как антитела против C1q настоящего раскрытия, содержат часть интактного антитела, обычно включающую антигенсвязывающую или переменную область интактного антитела или F область антитела, которая сохраняет или имеет модифицированную FcR-связывающую способность. Примеры фрагментов антител включают линейное антитело, молекулы одноцепочечного антитела и мультиспецифические антитела, образованные из фрагментов антител.

Термин "диатела" относится к небольшим фрагментам антител, полученным посредством построения sFv фрагментов (см. предшествующий параграф) с короткими линкерами (приблизительно 5-10 остатков) между V_H и V_L доменами, таким образом, что достигается межцепочечное, но не внутрицепочечное спаривание V доменов, приводя, таким образом, к бивалентному фрагменту, т.е. фрагменту, имеющему два антигенсвязывающих участка.

Биспецифические диатела представляют собой гетеродимеры двух "перекрестных" sFv фрагментов, в которых V_H и V_L домены двух антител присутствуют на различных полипептидных цепях. Диатела описаны более подробно, например, в EP 404097; WO 93/11161; Hollinger et al., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 90:6444-48 (1993).

Как используют в данном описании, "химерное антитело" относится к антителу (иммуноглобулину), такому как антитело против C1q настоящего раскрытия, в котором часть тяжелой и/или легкой цепи является идентичной или гомологичной соответствующим последовательностям в антителах, полученных от конкретных видов или принадлежащих к конкретному классу или подклассу антител, в то время как оставшаяся часть цепи (цепей) является (являются) идентичными или гомологичными соответствующим последовательностям в антителах, полученных от еще одного вида или принадлежащих к еще одному другому классу или подклассу антител, а также фрагментам таких антител, при условии, что они проявляют желательную биологическую активность (патент США № 4816567; Morrison et al., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA*, 81:6851-55 (1984)). Химерные антитела, представляющие интерес в данном описании, включают антитела PRIMATIZED®, где антигенсвязывающая область антитела является производной антитела, продуцируемого, например, посредством иммунизации обезьян-макак антигеном, представляющим интерес. Как используют в данном описании, "гуманизованное антитело" является разновидностью "химерных антител".

"Гуманизованные" формы нечеловеческих (например, мышинных) антител, таких как антитела против C1q настоящего раскрытия, представляют собой химерные антитела, которые содержат минимальную последовательность, производных от нечеловеческого иммуноглобулина. В одном варианте

осуществления, гуманизированное антитело представляет собой человеческий иммуноглобулин (реципиентное антитело), в котором остатки от HVR реципиента заменяют на остатки из HVR нечеловеческого вида (донорное антитело), такого как мышь, крыса, кролик или примат, не являющийся человеком, имеющий желательную специфичность, аффинность и/или емкость. В некоторых случаях, остатки FR человеческого иммуноглобулина заменяют на соответствующие нечеловеческие остатки. Кроме того, гуманизированные антитела могут содержать остатки, которые не обнаруживаются в реципиентном антителе или в донорном антителе. Эти модификации могут быть получены, чтобы дополнительно выделить рабочую характеристику антитела, такую как аффинность связывания. Как правило, гуманизированное антитело будет содержать по существу все по меньшей мере из одного, и обычно двух, переменных доменов, в которых все или по существу все из гипервариабельных петель соответствуют таким петлям последовательности нечеловеческого иммуноглобулина, и все или по существу все из областей FR являются областями FR с последовательностью человеческого иммуноглобулина, несмотря на то, что области FR могут включать одну или несколько индивидуальных замен остатка FR, которые улучшают рабочую характеристику антитела, такую как аффинность связывания, изомеризация, иммуногенность и т.п. Число этих аминокислотных замен в FR равно обычно не более 6 в H цепи, а в L цепи, не более 3. Гуманизированное антитело необязательно будет также содержать по меньшей мере часть константной области иммуноглобулина (Fc), обычно часть константной области человеческого иммуноглобулина. Более подробно см., например, Jones et al., *Nature* 321:522-525 (1986); Riechmann et al., *Nature* 332:323-329 (1988); и Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2:593-596 (1992). См. также, например, Vaswani и Hamilton, *Алл. Allergy, Asthma & Immunol.* 1:105-115 (1998); Harris, *Biochem. Soc. Transactions* 23:1035-1038 (1995); Hurler and Gross, *Curr. Op. Biotech.* 5:428-433 (1994); и патенты США № 6982321 и 7087409.

"Человеческое антитело" представляет собой антитело, которое обладает аминокислотной последовательностью, соответствующей последовательности антитела, такого как антитело против С1q настоящего раскрытия, продуцируемое человеком, и/или было получено с использованием любого из методов получения человеческих антител, как раскрыто в данном документе. Это определение человеческого антитела специфически исключает гуманизированное антитело, содержащее нечеловеческие антигенсвязывающие остатки. Человеческие антитела могут быть продуцированы с использованием различных методов, известных в данной области, включающих библиотеки фагового отображения. Hoogenboom и Winter, *J. Mol. Biol.*, 227:381 (1991); Marks et al., *J. Mol. Biol.*, 222:581 (1991). Также доступными для получения человеческих моноклональных антител являются методы, описанные в Cole et al., *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, p. 77 (1985); Voerner et al., *J. Immunol.*, 147(1): 86-95 (1991). См. также van Dijk и van de Winkel, *Curr. Opin. Pharmacol.* 5:368-74 (2001). Человеческие антитела могут быть получены посредством введения антигена трансгенному животному, которое было модифицировано для продуцирования таких антител в ответ на симуляцию антигеном, но чьи эндогенные локусы были заблокированы, например, иммунизированные ксеномыши (см., например, патенты США № 6075181 и 6150584, касающиеся технологии XENOMOUSE™). См. также, например, Li et al., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA*, 103:3557-3562 (2006), касающаяся человеческих антител, генерированных посредством технологии гибридомы человеческих В-клеток.

Термин "гипервариабельная область", "HVR" или "HV," когда его применяют в данном документе, относится к областям антитело-вариабельный домен, таким как такая область антитела против С1q настоящего раскрытия, которые являются гипервариабельными по последовательности и/или образуют структурно определенные петли. Обычно, антитела содержат шесть HVR; три в VH (H1, H2, H3), и три в VL (L1, L2, L3). В нативных антителах, H3 и L3 проявляют наибольшее разнообразие из шести HVR, и полагают, что H3, в частности, играет уникальную роль при придании узкой специфичности антителам. См., например, 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)). Несомненно, природные антитела семейства верблюдовых, состоящие только из тяжелой цепи являются функциональными и стабильными в отсутствие легкой цепи. См., например, Hamers-Casterman et al., *Nature* 363:446-448 (1993) и Sheriff et al., *Nature Struct. Biol.* 3:733-736 (1996).

Ряд уточненных контуров HVR применяется, и они охватываются в данном документе. HVR, которые представляют собой области определяющие комплементарность (CDR) по Кэбат, основаны на вариабельности последовательности, и применяются наиболее часто (Kabat et al., выше). Чотиа, вместо этого, ссылается на местоположение структурных петель (Chothia and Lesk *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987)). AbM HVR представляет компромисс между CDR по Кэбат и структурными петлями Чотиа, и применяются в программном обеспечении для моделирования антител, Oxford Molecular's AbM. "Контактные" HVR основаны на анализе доступных комплексных кристаллических структур. Остатки из каждой из этих HVR отмечены ниже.

Петля Кэбат AbM Чотиа контактные

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 (нумерация Кэбат)

H1 H31-H35 H26-H35 H26-H32 H30-H35 (нумерация Чотиа)

H2 H50-H65 H50-H58 H53-H55 H47-H58

H3 H95-H102 H95-H102 H96-H101 H93-H101

HVR могут содержать "расширенные HVR" следующим образом: 24-36 или 24-34 (L1), 46-56 или 50-56 (L2) и 89-97 или 89-96 (L3) в VL и 26-35 (H1), 50-65 или 49-65 (H2), и 93-102, 94-102, или 95-102 (H3) в VH. Остатки варибельного домена пронумерованы в соответствии с Kabat et al., выше, для каждого из этих определений расширенной HVR.

"Каркасные" или "FR" остатки представляют собой такие остатки варибельного домена, которые отличаются от остатков HVR, определенных в данном документе.

Фраза "нумерация остатка варибельного домена по Кэбат" или "нумерация положения аминокислоты по Кэбат" и ее вариации относятся к системе нумерации, применяемой к варибельным доменам тяжелой цепи или варибельным доменам легкой цепи при составлении антител в Kabat et al., выше. Используя данную систему нумерации действительная линейная аминокислотная последовательность может содержать меньше или дополнительные аминокислот, соответствующих укорачиванию FR или HVR варибельного домена, или вставке в него. Например, варибельный домен тяжелой цепи может включать единственную аминокислотную вставку (остаток 52a в соответствии с Kabat) после остатка 52 из H2 и вставленные остатки (например, остатки 82a, 82b и 82c и т.д. в соответствии с Kabat) после остатка 82 FR тяжелой цепи. Нумерация остатков по Кэбат может быть определены для данного антитела посредством выравнивания по областям гомологии последовательности антитела со "стандартной" пронумерованной по Кэбат последовательностью.

Система нумерации Кэбат, как правило, применяется, когда рассматривают остаток в варибельном домене (приблизительно остатки 1-107 легкой цепи и остатки 1-113 тяжелой цепи) (например, Kabat et al., Sequences of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)). "Система нумерации EU" или "EU индекс", как правило, применяют, когда рассматривают остаток в константной области тяжелой цепи иммуноглобулина (например, EU индекс описанный у Kabat et al., выше). "EU индекс по Кэбат" относится к нумерации остатка EU антитела человеческого IgG1. Если в данном документе не установлено иначе, ссылки на номера остатков в варибельном домене антител означают нумерацию остатка по системе нумерации Кэбат. Если в данном документе не установлено иначе, ссылки на номера остатков в константном домене антитела означают нумерацию остатка по системе нумерации EU (например, см. Опубликованную патентную заявку США № 2010-280227).

"Акцепторный человеческий каркас", как используют в данном описании, представляет собой каркас, содержащий аминокислотную последовательность из каркаса VL или VH, производную от каркаса человеческого иммуноглобулина или человеческого консенсусного каркаса. Акцепторный человеческий каркас "производный от" каркаса человеческого иммуноглобулина или человеческого консенсусный каркас может содержать их одинаковую аминокислотную последовательность, или он может содержать предварительно существующие изменения аминокислотной последовательности. В нескольких вариантах осуществления, число предварительно существующих изменений аминокислот составляет 10 или менее, 9 или менее, 8 или менее, 7 или менее, 6 или менее, 5 или менее, 4 или менее, 3 или менее, или 2 или менее. В нескольких вариантах осуществления, где предварительно существующие изменения аминокислот присутствуют в VH, эти изменения происходят по только трем, двум или одному из положений 71H, 73H и 78H; например, аминокислотные остатки по эти положениям могут представлять собой 71A, 73T и/или 78A. В одном варианте осуществления, акцепторный человеческий каркас VL является идентичным по последовательности с последовательностью VL каркаса человеческого иммуноглобулина или последовательностью человеческого консенсусного каркаса.

"Человеческий консенсусный каркас" является каркасом, который представляет наиболее часто встречающиеся аминокислотные остатки при выборе VL или VH каркасных последовательностей человеческого иммуноглобулина. Как правило, выбор VL или VH последовательностей человеческого иммуноглобулина производят из подгруппы последовательностей варибельного домена. Как правило, подгруппа последовательностей является подгруппой как в Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991). Примеры включают для VL, подгруппой может быть подгруппа kI, kII, kIII или kIV как в Kabat et al., выше. Дополнительно, для VH, подгруппой может быть подгруппа I, подгруппа II или подгруппа III как в Kabat et al., выше.

"Аминокислотная модификация" по установленному положению, например антитела против C1q настоящего раскрытия, относится к замене или делеции установленного остатка, или вставке по меньшей

мере одного аминокислотного остатка, примыкающего к установленному остатку. Вставка, "примыкающая" к установленному остатку, означает вставку в пределах его одного-двух остатков. Вставка может являться N-концевой или C-концевой к установленному остатку. В нескольких вариантах осуществления, аминокислотная модификация в данном документе представляет собой замену.

Антитело "с созревшей аффинностью", такое как антитело против C1q настоящего раскрытия, представляет собой антитело с одним или несколькими изменениями в одной или нескольких его HVR, что приводит к улучшению аффинности антитела к антигену, по сравнению с родительским антителом, которое не обладает этими изменениями (изменениями). В одном варианте осуществления, антитело с созревшей аффинностью имеет наномолярные или даже пикомолярные аффинности для целевого антигена. Антитела с созревшей аффинностью получают по методикам, известным в данной области. Например, Marks et al., *Bio/Technology* 10:779-783 (1992) описывает созревание аффинности посредством перетасовки VH- и VL-доменов. Случайный мутагенез HVR и/или каркасных остатков описан, например, в: 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); и Hawkins et al., *J. Mol. Biol.* 226:889-896 (1992).

Как используют в данном документе, термин "специфически распознает" или "специфически связывает" относится к измеряемым и воспроизводимым взаимодействиям, таким как притяжение или связывание между мишенью и антителом, таким как антитело против C1q настоящего раскрытия, причем определяющим является присутствие мишени в присутствии гетерогенной популяции молекул, включающей биологические молекулы. Например, антитело, такое как антитело против C1q настоящего раскрытия, которое специфически или преимущественно связывается с мишенью или эпитопом, представляет собой антитело, которое связывается с данными мишенью или эпитопом с более высокой аффинностью, авидностью, более легко, и/или с более высокой продолжительностью, чем оно связывается с другими мишенями или другими эпитопами мишени. Также понятно при прочтении данного определения, что, например, антитело (или фрагмент), которое специфически или преимущественно связывается с первой мишенью, может или не может специфически или преимущественно связываться со второй мишенью. Как таковое, "специфическое связывание" или "преимущественное связывание" необязательным образом требует (хотя может включать) исключительного связывания. Антитело, которое специфически связывается с мишенью, может иметь константу ассоциации, равную по меньшей мере приблизительно 10^3 M^{-1} или 10^4 M^{-1} , иногда приблизительно 10^5 M^{-1} или 10^6 M^{-1} , в других случаях, приблизительно 10^6 M^{-1} или 10^7 M^{-1} , приблизительно 10^8 M^{-1} - 10^9 M^{-1} или приблизительно 10^{10} M^{-1} - 10^{11} M^{-1} или выше. Различные форматы иммунологического анализа могут применяться для отбора антител, специфически иммунореактивных с конкретным белком. Например, твердофазные системы иммунологического анализа ELISA обычно применяют для отбора моноклональных антител, специфически иммунореактивных с белком. См., например, Harlow и Lane (1988) *Antibodies, Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Publications, New York, для описания форматов иммунологического анализа и условий, которые могут применяться для определения специфичной иммунореактивности.

Как используют в данном описании, "взаимодействие" между белком комплемента, таким как фактор комплемента C1q, и вторым белком охватывает, без ограничения, белок-белковое взаимодействие, физическое взаимодействие, химическое взаимодействие, связывание, ковалентное связывание и ионное связывание. Как используют в данном описании, антитело "ингибирует взаимодействие" между двумя белками, когда антитело разрушает, снижает или полностью устраняет взаимодействие между двумя белками. Антитело настоящего раскрытия или его фрагмент "ингибирует взаимодействие" между двумя белками, когда антитело или его фрагмент связывается с одним из двух белков.

"Блокирующее" антитело, "антагонистическое" антитело, "ингибиторное" антитело, или "нейтрализующее" антитело представляет собой антитело, такое как антитело против C1q настоящего раскрытия, которое ингибирует или снижает одну или несколько биологических активностей антигена, который оно связывает, такие как взаимодействия с одним или несколькими белками. В нескольких вариантах осуществления блокирующие антитела, антагонистические антитела, ингибиторные антитела или "нейтрализующие" антитела по существу или полностью ингибируют одну или несколько биологических активностей или взаимодействий антигена.

"Эффекторные функции" антитела относятся к тем биологическим активностям, присущим области Fc (нативной последовательности области Fc или аминокислотной последовательности вариантной области Fc) антитела, и варьируют вместе с изотипом антитела.

Термин "область Fc" в данном документе применяют для обозначения C-концевой области тяжелой цепи иммуноглобулина, включающей области Fc с нативной последовательностью и вариантные области Fc. Несмотря на то что границы области Fc тяжелой цепи иммуноглобулина могут изменяться, область Fc тяжелой цепи человеческого IgG обычно определяют, как вытянутую от аминокислотного остатка в положении Cys226, или от Pro230, к ее карбоксильному концу. C-концевой лизин (остаток 447 в соответствии с системой нумерации EU) области Fc может быть удален, например, во время получения или очистки антитела, или посредством рекомбинантного конструирования нуклеиновой кислоты, кодирующей тяжелую цепь антитела. Соответственно, композиция интактного антитела может содержать популяции

антитела со всеми удаленными остатками K447, популяции антитела без удаленных остатков K447, и популяции антитела, имеющие смесь антител с остатком K447 и без него. Подходящие области Fc с нативной последовательностью для применения в антителах изобретения включают человеческие IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4.

"Область Fc с нативной последовательностью" содержит аминокислотную последовательность, идентичную аминокислотной последовательности области Fc, обнаруженной в природе. Области Fc человека с нативной последовательностью включают нативную последовательность области Fc человеческого IgG1 (не-А и А-аллотипов); нативную последовательность области Fc человеческого IgG2; нативную последовательность области Fc человеческого IgG3; и нативную последовательность области Fc человеческого IgG4, а также их природные варианты.

"Вариантная область Fc" содержит аминокислотную последовательность, которая отличается от нативной последовательности области Fc вследствие по меньшей мере одной аминокислотной модификации. В нескольких вариантах осуществления, вариантная область Fc отличается одной или несколькими аминокислотными заменой(заменами). В нескольких вариантах осуществления, вариантная область Fc имеет по меньшей мере одну аминокислотную замену по сравнению с нативной последовательностью области Fc или с областью Fc родительского полипептида, например от приблизительно одной до приблизительно десяти аминокислотных замен, и, в нескольких вариантах осуществления, от приблизительно одной до приблизительно пяти аминокислотных замен в нативной последовательности области Fc или в области Fc родительского полипептида. Вариантная область Fc в данном документе будет, в нескольких вариантах осуществления, обладать по меньшей мере приблизительно 80% гомологии с нативной последовательностью области Fc и/или с областью Fc родительского полипептида, и, в нескольких вариантах осуществления, по меньшей мере приблизительно 90% гомологии с ней, и, в нескольких вариантах осуществления, по меньшей мере приблизительно 95% гомологии с ней.

"Fc-рецептор" или "FcR" описывает рецептор, который связывается с областью Fc антитела. В нескольких вариантах осуществления, FcR представляет нативную последовательность человеческого FcR. Кроме того, в нескольких вариантах осуществления, FcR представляет область, которая связывает антитело IgG (гамма-рецептор), и включает рецепторы подклассов FcγRI, FcγRII и FcγRIII, включая аллельные варианты и альтернативно сплайсированные формы этих рецепторов, рецепторы FcγRII включают FcγRIIA ("активирующий рецептор") и FcγRIIB ("ингибирующий рецептор"), которые имеют аналогичные аминокислотные последовательности, которые различаются прежде всего по их цитоплазматическим доменам. Активирующий рецептор FcγRIIA содержит мотив активации иммунорецептора на основе тирозина ("ITAM") в его цитоплазматическом домене. Ингибирующий рецептор FcγRIIB содержит мотив ингибирования иммунорецептора на основе тирозина ("ITIM") в его цитоплазматическом домене. (См., например, M. Daeron, *Annu. Rev. Immunol.* 15:203-234 (1997)). Обзор FcR приведен в Ravetch и Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9:457-92 (1991); Capel et al., *Immunomethods* 4:25-34 (1994); и de Haas et al., *J. Lab. Clin. Med.* 126: 330-41 (1995). Другие FcR, включающие те, что будут идентифицированы в будущем, охвачены термином "FcR" в данном документе. FcR могут также увеличивать время полужизни антител в сыворотке.

Связывание с FcRn *in vivo* и время полужизни в сыворотке человеческих высокоаффинных полипептидов, связывающихся с FcRn, может быть подвергнуто анализу, например, у трансгенных мышей или в трансфицированных человеческих клеточных линиях, экспрессирующих человеческий FcRn, или у приматов, которым вводят полипептиды, имеющие вариантную область Fc. WO 2004/42072 (Presta) описывает варианты антитела с улучшенным или сниженным связыванием с FcR. См. также, например, Shields et al., *J. Biol. Chem.* 9(2):6591-6604 (2001).

Термин " k_{on} ", как используют в данном описании, предназначен для обозначения константы скорости ассоциации антитела с антигеном.

Термин " k_{off} ", как используют в данном описании, предназначен для обозначения константы скорости диссоциации антитела из комплекса антитело/антиген.

Термин " K_D ", как используют в данном описании, предназначен для обозначения равновесной константы диссоциации взаимодействия антитело-антиген.

Как используют в данном описании, "процент (%)" идентичности аминокислотной последовательности и "гомология" по отношению к последовательности пептида, полипептида или антитела относятся к процентной доле аминокислотных остатков в кандидатной последовательности, которые являются идентичными с аминокислотными остатками в конкретной пептидной или полипептидной последовательности, после выравнивания последовательностей и введения пробелов, если необходимо, для достижения максимального процента идентичности последовательности, и без учета любых консервативных замен как части идентичности последовательности. Выравнивание с целью определения процента идентичности аминокислотной последовательности может достигаться различными путями, которые находятся в объеме квалификации в данной области, например, с использованием общедоступного компьютерного программного обеспечения, такого как программное обеспечение BLAST, BLAST-2, ALIGN или MEGA-LIGN™ (DNASTAR). Специалисты в области могут определить соответствующие параметры для изме-

рения выравнивания, включающие любые алгоритмы, известные в данной области, необходимые для достижения максимального выравнивания на протяжении полной длины сравниваемых последовательностей.

"Изолированная" молекула или клетка представляет собой молекулу или клетку, которую идентифицируют и отделяют по меньшей мере от одной контаминантной молекулы или клетки, с которой она обычным образом ассоциирована в окружении, в котором ее получали. В нескольких вариантах осуществления, изолированная молекула или клеток не имеет ассоциации со всеми компонентами, ассоциированными с окружением при получении. Изолированная молекула или клетка находится в форме, отличающейся по форме и или установке, в которой ее обнаруживают в природе. Изолированные молекулы, следовательно, отличаются от молекул, существующих природным образом в клетках; изолированные клетки отличаются от клеток, существующих естественно в тканях, органах или индивидуумах. В нескольких вариантах осуществления, изолированная молекула представляет собой антитело против С1q настоящего раскрытия. В других вариантах осуществления, изолированная клетка представляет собой клетку-хозяина или клетку гибридомы, продуцирующей антитело против С1q настоящего раскрытия.

"Изолированная" молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая антитело, такое как антитело против С1q настоящего раскрытия, является молекулой нуклеиновой кислоты, которую идентифицируют и отделяют по меньшей мере от одной контаминантной молекулы нуклеиновой кислоты, с которой она обычным образом ассоциирована в окружении, в котором ее получали. В нескольких вариантах осуществления, изолированная нуклеиновая кислота не имеет ассоциации со всеми компонентами, ассоциированными с окружением при получении. Изолированные молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие полипептиды и антитела в данном документе, находятся в форме, отличающейся по форме или установке, в которой ее обнаруживают в природе. Изолированные молекулы нуклеиновых кислот, следовательно, отличаются от нуклеиновой кислоты кодирующей полипептиды и антитела в данном документе, существующие естественным образом в клетках.

Термин "вектор", как используют в данном описании, предназначен для наименования молекулы нуклеиновой кислоты, способной к перемещению еще одной нуклеиновой кислоты, с которой она была связана. Один тип вектора представляет собой "плазмиду", которая относится к кольцевой двухцепочечной ДНК, внутри которой дополнительные сегменты ДНК могут быть лигированы. Еще один тип вектора представляет собой фаговый вектор. Еще одним типом вектора является вирусный вектор, где дополнительные сегменты ДНК могут быть лигированы внутри вирусного генома. Некоторые векторы обладают способностью к автономной репликации в клетке-хозяине, в которую они вводятся (например, бактериальные векторы, имеющие бактериальную точку начала репликации и эписомальные векторы млекопитающих). Другие векторы (например, неэписомальные векторы млекопитающих) могут быть интегрированы в геном клетки-хозяина при введении в клетку-хозяина, и, таким образом, реплицироваться наряду с хозяйским геномом. Кроме того, некоторые векторы обладают способностью направлять экспрессию генов, с которыми они функционально связаны. Такие векторы называются в данном документе "рекомбинантными векторами экспрессии" или просто "векторы экспрессии". Обычно, векторы экспрессии, применимые в технологиях рекомбинантных ДНК, часто находятся в форме плазмид. В настоящем описании, "плазида" и "вектор" могут применяться взаимозаменяемо, так как плазида является наиболее часто применяемой формой вектора.

"Полинуклеотид" или "нуклеиновая кислота", как применяют взаимозаменяемо в данном документе, относится к полимерам нуклеотидов любой длины и включают ДНК и РНК. Нуклеотиды могут представлять собой дезоксирибонуклеотиды, рибонуклеотиды, модифицированные нуклеотиды или основания, и/или их аналоги, или любой субстрат, который может быть введен в полимер посредством ДНК или РНК полимеразы или синтетической реакции. Полинуклеотид может содержать модифицированные нуклеотиды, такие как метилированные нуклеотиды и их аналоги. Если присутствует, модификация нуклеотидной структуре может придаваться до или после сборки полимера. Последовательность нуклеотидов может прерываться нуклеотидными компонентами.

Полинуклеотид может содержать модификацию (модификации), сделанные после синтеза, такие как конъюгация с меткой. Другие типы модификаций включают, например, "кэпы", замену одного или нескольких природных нуклеотидов на аналог, межнуклеотидные модификации, такие как, например, модификации с незаряженными связками (например, метилфосфонаты, сложные фосфотриэфиры, фосфоамидаты, карбаматы и т.д.) и с заряженными связками (например, фосфотиоаты, фосфодитиоаты и т.д.), модификации, содержащие боковые фрагменты, такие как, например, белки (например, нуклеазы, токсины, антитела, сигнальные пептиды, рly-L-лизин и т.д.), модификации с интеркаляторами (например, акридином, псораленом и т.д.), модификации, содержащие хелатирующие средства (например, металлы, радиоактивные металлы, бор, окисляемые металлы и т.д.), модификации, содержащие алкилирующие средства, модификации с модифицированными связками (например, α -аномерные нуклеиновые кислоты и т.д.), а также немодифицированные формы полинуклеотидов. Дополнительно, любая из гидроксильных групп, обычно присутствующая в сахарах, может быть замещена, например, фосфонатными группами, фосфатными группами, защищенными стандартными защитными группами, или активированными для получения дополнительных связей с дополнительными нуклеотидами, или может быть конъюгирована с

твердыми или полутвердыми основами. 5' и 3' концевая ОН может быть фосфорилирована или замещена аминами или фрагментами органических кэпирующих групп из от 1 до 20 атомов углерода. Другие гидроксилы также могут быть дериватизированы стандартными защитными группами. Полинуклеотиды могут также содержать аналогичные формы сахаров, рибозы или дезоксирибозы, которые в целом известны в данной области, включающие, например, 2'-О-метил-, 2'-О-аллил-, 2'-фтор- или 2'-азидо-рибозу, аналоги карбоциклического сахара, α -аномерные сахара, эпимерные сахара, такие как арабиноза, ксилозы или ликозы, пиранозные сахара, фуранозные сахара, седогептулозы, ациклические аналоги и основные нуклеозидные аналоги, такие как метилрибозид. Одна или несколько связей из сложных фосфодиэфиров могут быть заменены на альтернативные связующие группы. Эти альтернативные связующие группы включают, но не ограничиваются перечисленным, варианты осуществления, где фосфат заменяют на P(O)S ("тиоат"), P(S)S ("дитиоат"), (O)NR₂ ("амидат"), P(O)R, P(O)OR', CO, или CH₂ ("формацеталь"), в которых каждый R или R' независимо является H или замещенным или незамещенным алкилом (1-20 C), необязательно содержащим простую эфирную (-O-) связь, арил, алкенил, циклоалкил, циклоалкенил или аралкил. Не все связки в полинуклеотиде обязательно являются идентичными. Предшествующее описание относится ко всем приведенным полинуклеотидам, указанным в данном документе, включая РНК и ДНК.

"Клетка-хозяин" включает индивидуальную клетку или клеточную культуру, которая может являться или являлась реципиентом для вектора (векторов) для введения полинуклеотидных вставок. Клетки-хозяева включают потомство единственной клетки-хозяина, и потомство необязательно может быть полностью идентичным (по морфологии или по геномному компоненту ДНК) исходной родительской клетке вследствие природной, случайной, или планомерной мутации. Клетка-хозяин включает клетки, трансфицированные *in vivo* полинуклеотидом(полинуклеотидами) данного изобретения.

"Носители", как используют в данном описании, включают фармацевтически приемлемые носители, эксципиенты, или стабилизаторы, которые являются нетоксическими по отношению к клетке или млекопитающему, подвергаемых их воздействию при используемых дозировках и концентрациях. Часто физиологически приемлемый носитель представляет собой водный раствор с забуференным рН. Примеры физиологически приемлемых носителей включают буферы такие как фосфатный, цитратный и с другими органическими кислотами; антиоксиданты, включающие аскорбиновую кислоту; низкомолекулярный (менее чем приблизительно из 10 остатков) полипептид; белки, такие как альбумин сыворотки, желатин или иммуноглобулины; гидрофильные полимеры, такие как поливинилпирролидон; аминокислоты, такие как глицин, глутамин, аспарагин, аргинин или лизин; моносахариды, дисахариды и другие углеводы, включающие глюкозу, маннозу или декстрины; хелатирующие средства, такие как ЭДТА; сахарные спирты, такие как маннит или сорбит; солеобразующие противоионы, такие как натрий; и/или неионные поверхностно-активные вещества такие как TWEEN™, полиэтиленгликоль (PEG) и PLURONICS™.

Термин "приблизительно", как используют в данном описании, относится к обычному интервалу ошибки для соответствующего значения, хорошо известному для специалиста в данной области техники. Ссылка на "приблизительно" для значения или параметра в данном документе включает (и описывает) варианты осуществления, которые направлены на данное значение или параметр *per se*.

Как используют в данном описании и в прилагаемой формуле изобретения, формы единственного числа включают ссылку на множественное число, если контекст ясно не указывает иначе. Например, ссылка на "антитело" является ссылкой на от одного до множества антител, такие как молярные количества, и включает их эквиваленты, известные специалистам в данной области, и так далее.

Понимают, что аспект и варианты осуществления изобретения, описанные в данном документе, включают "содержащие" "состоящие" и "состоящие по существу из" аспекты и варианты осуществления.

Обзор изобретения.

Настоящее раскрытие предоставляет антитела против С1q и их применения. Антитела против С1q данного раскрытия специфически связывают белок С1q данного раскрытия. В нескольких вариантах осуществления, антитела против С1q представляют собой С1q-нейтрализующие антитела. В нескольких вариантах осуществления, антитела против С1q данного раскрытия могут связываться с комплексом С1.

В некоторых аспектах, настоящее раскрытие предоставляет мышинное моноклональное антитело М1, которое продуцируется клеточной линией гибридомы, называемой мышинная гибридома С1q-М1 7788-1(М) 051613, и, которая была депонирована в АТСС 6 Июня, 2013 г. с учетным номером в АТСС РТА-120399.

В некоторых аспектах, настоящее раскрытие предоставляет антитело против С1q, содержащее вариабельный домен легкой цепи и вариабельный домен тяжелой цепи, где вариабельный домен легкой цепи содержит последовательность вариабельного домена легкой цепи антитела М1; и/или, где тяжелая цепь содержит последовательность вариабельного домена тяжелой цепи антитела М1.

В некоторых аспектах, настоящее раскрытие предоставляет антитело против С1q, содержащее вариабельный домен легкой цепи и вариабельный домен тяжелой цепи, где вариабельный домен легкой цепи содержит HVR-L1, HVR-L2 и HVR-L3 моноклонального тела М1, продуцируемого клеточной линией гибридомы, депонированной в АТСС с учетным номером РТА-120399, или ее потомством; и/или, где вариабельный домен тяжелой цепи содержит HVR-H1, HVR-H2 и HVR-H3 моноклонального тела

M1, продуцируемого клеточной линией гибридомы, депонированной в АТСС с учетным номером РТА-120399, или ее потомством.

В некоторых аспектах, настоящее раскрытие предоставляет антитело против С1q, которое связывается по существу с тем же эпитопом С1q, что и (1) антитело M1, продуцируемое клеточной линией гибридомы, депонированной в АТСС 6 июня, 2013 г. и имеющей учетный номер АТСС РТА-120399 или ее потомством, (2) антигенсвязывающий фрагмент антитела M1, или (3) антитело, содержащее HVR-L1, HVR-L2, HVR-L3, HVR-H1, HVR-H2 и HVR-H3 из антитела M1.

В нескольких вариантах осуществления, антитела против С1q данного раскрытия нейтрализуют биологическую активность С1q. Применения антител против С1q включают, без ограничения, обнаружение фактора комплемента С1q, например, у индивидуумов, имеющих нейродегенеративное расстройство, ассоциированное с зависимой от фактора комплемента 1 (CF1) патологической потерей синапсов. Дополнительные неограничивающие применения включают ингибирование классического пути активации комплемента, например, в случаях, где классический путь комплемента активируется аутоантителами, такими как NMO-специфичные аутоантитела. Дополнительные неограничивающие применения антител против С1q включают диагностику и лечение расстройств, которые ассоциированы с повышенной экспрессией факторов комплемента, таких как С1q, или ассоциированы с активацией пути комплемента. Такие расстройства могут включать, без ограничения, аутоиммунные расстройства, воспалительные нарушения и нейродегенеративные расстройства, включающие нейродегенеративные расстройства, ассоциированные с потерей синапсов.

В еще одном аспекте, настоящее раскрытие предоставляет изолированную молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую антитело данного раскрытия.

Настоящее раскрытие также предоставляет изолированные клетки-хозяева, содержащие молекулу нуклеиновой кислоты, которая кодирует антитело данного раскрытия. В нескольких вариантах осуществления, предоставлена линия изолированных клеток-хозяев, которая продуцирует нейтрализующее моноклональное мышиное антитело M1. Эта линия изолированных клеток-хозяев была депонирована в АТСС и имеет учетный номер АТСС РТА-120399.

Дополнительно, предоставлены фармацевтические композиции, содержащие антитела против С1q, такие как С1q-нейтрализующие антитела данного раскрытия, в комбинации с фармацевтически приемлемыми носителями. Настоящее раскрытие также предоставляет набор, содержащий антитело против С1q для применения в любом способе, описанных в данном документе.

Настоящее раскрытие дополнительно предоставляет способы применения антител против С1q данного раскрытия (например, С1q-нейтрализующих антител данного раскрытия) для лечения или предотвращения нейродегенеративного заболевания или аутоиммунного заболевания у индивидуума, нуждающегося в таком лечении, для обнаружения синапсов у индивидуума, имеющего нейродегенеративное заболевание или аутоиммунное заболевание, и для обнаружения синапсов в биологическом образце. Настоящее раскрытие также предоставляет наборы, содержащие С1q антитела данного раскрытия (например, С1q-нейтрализующие антитела данного раскрытия).

Белки комплемента.

Антитела данного раскрытия специфически распознают фактор комплемента С1q и/или С1q в комплексе С1 классического пути активации комплемента. Распознаваемый фактор комплемента может быть выделен, без ограничения, из любого организма, имеющего систему комплемента, включая любой организм млекопитающего, такого как человек, мышь, крыса, кролик, обезьяна, собака, кошка, корова, лошадь, верблюд, овца, коза или свинья.

Как используют в данном описании, "комплекс С1" относится к белковому комплексу, который может включать, без ограничения, один белок С1q, два белка С1г и два белка С1s (например, С1q²s²).

Как используют в данном описании, "фактор комплемента С1q" относится как к дикому типу последовательностей, так и природным вариантным последовательностям.

Неограничивающий пример фактора комплемента С1q, распознаваемого антителами данного изобретения, является человеческий С1q, включающий три полипептидных цепи А, В и С

C1q, цепь A (homo sapiens), Учетный № База данных белков:
NP_057075.1; GenBank No.: NM_015991:

>gi|7705753|ref|NP_057075.1| комплемент C1q субкомпонент
субъединицы А предшественник [Homo sapiens]

MEGPRGWLVLCLVLAISLASMVTEDLCRAPDGKKGEAGRPRRRRGLKGEQGEPPGAPGIR
TGIQGLKGDQGEPPSGNPGKVGYPGSPGLGARGIPGIKGTGKSPGNIKDQPRPAFSAIRRN
PMGGNVVIFDVTITNQEEPYQNHSGRFVCTVPGYFFTFQVLSQWEICLSIVSSSRGQVRRSLG
FCDTNNKGLFQVVSQGMVLQLQQDQVWVEKDKPKGHIYQSEADSVFSGFLIFPSA (SEQ
ID NO:1)

C1q, цепь B (homo sapiens), Учетный № База данных белков:
NP_000482.3; GenBank No.: NM_000491.3:

>gi|87298828|ref|NP_000482.3| комплемент C1q субкомпонент
субъединицы В предшественник [Homo sapiens]

MMMKIPWGSIPVLMLLLLLGLIDISQAQLSCTGPPAIPGIPGIPGTPGPDGQPGTPGIK
EKGLPGLAGDHGEFGEKGDPIGNPGKVGPKGPMGPKGGPGAPGAPGPKGESGDYKATQKIAF
SATRTINVPLRRDQTIRFDHVTNMMNNYEPKFTCKVPGLYYFTYHASSRGNLCVNLMRGR
ERAQKVVTFCDYAYNTFQVTTGGMVLKLEQGENVFLQATDKNSLLGMEGANSIFSGFLLFPDME
A (SEQ ID NO:2)

C1q, цепь C (homo sapiens), Учетный № База данных белков:
NP_001107573.1; GenBank No.: NM_001114101.1:

>gi|166235903|ref|NP_001107573.1| комплемент C1q
субкомпонент субъединицы С предшественник [Homo sapiens]

MDVGPSSPLPHLGLKLLLLLLLLPLRQANTGCYGIPIGMPGLPGAPGKDGYPGLPGKGE
GIPAIPIGIRGPKGQKGEPLGPIPGKNGPMGPPGMPGVPGPMGIPGEPGEEGRYKQKQSVFTV
TRQTHQPPAPNSLIRFNAVLTNPQGDYDTSTGKFTCKVPGLYYFVYHASHTANLCLVLLYRSGVK
VVTFCGHTSKTNQVNSGGVLLRLQVGEVWLVAVNDYYDMVGIQGSDSVFSGLLFPD (SEQ
ID NO:3)

Соответственно, антитело против C1q настоящего раскрытия может связываться с полипептидной цепью А, полипептидной цепью В и/или полипептидной цепью С белка C1q. В нескольких вариантах осуществления, антитело против C1q настоящего раскрытия связывается с полипептидной цепью А, полипептидной цепью В, и/или полипептидной цепью С человеческого C1q или его гомолога, такого как C1q человека, мыши, крысы, кролика, обезьяны, собаки, кошки, коровы, лошади, верблюда, овцы, козы или свиньи.

Антитела против C1q.

Антитела данного раскрытия специфически связываются с фактором комплемента C1q и/или C1q в комплексе C1 классического пути комплемента. В нескольких вариантах осуществления, антитела против C1q специфически связываются с человеческим C1q. В нескольких вариантах осуществления, антитела против C1q специфически связываются с человеческим и мышинным C1q. В нескольких вариантах осуществления, антитела против C1q специфически связываются с крысиным C1q. В нескольких вариантах осуществления, антитела против C1q специфически связываются с человеческим C1q, мышинным C1q и крысиным C1q.

В нескольких вариантах осуществления, антитела против C1q данного раскрытия нейтрализуют биологическую активность фактора комплемента C1q. В нескольких вариантах осуществления, антитела ингибируют взаимодействие между фактором комплемента C1q и другими факторами комплемента, такими как C1g или C1s, или между C1q и антителом, таким как аутоантитело. Как раскрыто в данном документе, аутоантитело настоящего раскрытия включает, без ограничения, антитело, которое распознает антиген хозяина и активирует классический путь активации комплемента. На первой стадии этого процесса активации фактор комплемента C1q связывается с иммунным комплексом аутоантитело-аутоантиген. В нескольких вариантах осуществления, антитела ингибируют взаимодействие между фактором комплемента C1q и нефактором комплемента. Нефактор комплемента может включать фосфатидилсерин, пентраксин-3, С-реактивный белок (CRP), глобулярный рецептор C1q (gC1qR), рецептор 1 комплемента (CR1), β-амилоид и кальретикулин. В нескольких вариантах осуществления, антитела ингибируют классический путь активации комплемента. В некоторых вариантах осуществления, антитела

дополнительно ингибируют альтернативный путь. В нескольких вариантах осуществления, антитела ингибируют аутоантитело- и комплемент-зависимую цитотоксичность (CDC). В нескольких вариантах осуществления, антитела ингибируют комплемент-зависимую клеточноопосредованную цитотоксичность (CDCC). В нескольких вариантах осуществления, антитела ингибируют продуцирование антител В-клетками, созревание дендритных клеток, пролиферацию Т-клеток, продуцирование цитокинов или активацию микроглии. В нескольких вариантах осуществления, антитела ингибируют реакцию Артюса. В нескольких вариантах осуществления, антитела ингибируют фагоцитоз синапсов или нервных окончаний. В нескольких вариантах осуществления, антитела ингибируют активацию клеток, экспрессирующих рецептор 3 комплемента (CR3/C3).

Функциональные свойства антител данного изобретения, такие как константы диссоциации для антигенов, ингибирование белок-белковых взаимодействий (например, взаимодействий C1q-аутоантитело), ингибирование аутоантитело-зависимой и комплемент-зависимой цитотоксичности (CDC), ингибирование комплемент-зависимой клеточноопосредованной цитотоксичности (CDCC), или образование повреждения, могут, без ограничения, быть измерены в экспериментах *in vitro*, *ex vivo* или *in vivo*.

Константы диссоциации (K_D) антител против C1q для C1q могут составлять менее чем 100 нМ, менее чем 90 нМ, менее чем 80 нМ, менее чем 70 нМ, менее чем 60 нМ, менее чем 50 нМ, менее чем 40 нМ, менее чем 30 нМ, менее чем 20 нМ, менее чем 10 нМ, менее чем 9 нМ, менее чем 8 нМ, менее чем 7 нМ, менее чем 6 нМ, менее чем 5 нМ, менее чем 4 нМ, менее чем 3 нМ, менее чем 2 нМ, менее чем 1 нМ, менее чем 0,5 нМ, менее чем 0,1 нМ, менее чем 0,05 нМ, менее чем 0,01 нМ, или менее чем 0,005 нМ. В нескольких вариантах осуществления, константы диссоциации находятся в интервале от менее чем приблизительно 30 нМ до менее чем приблизительно 100 пМ. В нескольких вариантах осуществления, константы диссоциации составляют менее чем приблизительно 30 нМ. В нескольких вариантах осуществления, константы диссоциации составляют менее чем приблизительно 20 нМ. В нескольких вариантах осуществления, константы диссоциации составляют менее чем приблизительно 10 нМ. В нескольких вариантах осуществления, константы диссоциации составляют менее чем приблизительно 5 нМ. В нескольких вариантах осуществления, константы диссоциации составляют менее чем приблизительно 1 нМ. В нескольких вариантах осуществления, константы диссоциации составляют менее чем приблизительно 100 пМ. В некоторых вариантах осуществления, константы диссоциации антитела против C1q находятся в интервале от менее чем приблизительно 30 нМ до менее чем приблизительно 100 пМ для человеческого C1q, и находятся в интервале от менее чем приблизительно 30 нМ до менее чем приблизительно 100 пМ для мышинового C1q. В некоторых вариантах осуществления, константы диссоциации антитела против C1q составляют менее чем приблизительно 30 нМ для человеческого C1q и менее чем приблизительно 30 нМ для мышинового C1q. В некоторых вариантах осуществления, константы диссоциации антитела против C1q составляют менее чем приблизительно 20 нМ для человеческого C1q и менее чем приблизительно 20 нМ для мышинового C1q. В некоторых вариантах осуществления, константы диссоциации антитела против C1q составляют менее чем приблизительно 10 нМ для человеческого C1q и менее чем приблизительно 10 нМ для мышинового C1q. В некоторых вариантах осуществления, константы диссоциации антитела против C1q составляют менее чем приблизительно 5 нМ для человеческого C1q и менее чем приблизительно 5 нМ для мышинового C1q. В некоторых вариантах осуществления, константы диссоциации антитела против C1q составляют менее чем приблизительно 1 нМ для человеческого C1q и менее чем приблизительно 1 нМ для мышинового C1q. В некоторых вариантах осуществления, константы диссоциации антитела против C1q составляют менее чем 100 пМ для человеческого C1q и менее чем 100 пМ для мышинового C1q. Константы диссоциации антитела для антигенов, отличных от C1q, могут быть выше по меньшей мере в 5 раз, по меньшей мере в 10 раз, по меньшей мере в 100 раз, по меньшей мере в 1000 раз, по меньшей мере в 10000 раз, или по меньшей мере в 100000 раз, чем константы диссоциации для C1q. Например, константа диссоциации антитела против C1q данного раскрытия может быть выше по меньшей мере в 1000 раз для C1s, чем для C1q. Константы диссоциации могут быть определены любым аналитическим методом, включая любой биохимический или биофизический метод, такой как ELISA, поверхностный плазмонный резонанс (SPR), интерферометрия биослоя (см., например, Octet System от ForteBio), изотермическая титрующая калориметрия (ИТС), дифференциальная сканирующая калориметрия (DSC), круговой дихроизм (CD), анализ остановленного слоя и колориметрические или флуоресцентные анализы плавления белка. Константы диссоциации (K_D) антител против C1q для C1q могут быть определены, например, с использованием непротессированных антител или фрагментов антитела, таких как Fab фрагменты.

Одним иллюстративным путем определения аффинности связывания антител с C1q является измерение аффинности связывания монофункциональных Fab фрагментов антител. Чтобы получить монофункциональные Fab фрагменты, антитело (например, IgG) может расщепляться папаином или рекомбинантно экспрессироваться. Аффинность Fab фрагмента антитела может определяться посредством поверхностного плазмонного резонанса (Biacore3000™ система поверхностного плазмонного резонанса (SPR), Biacore TM., INC, Piscataway N.J.), оборудованная сенсорными чипами с предварительно иммобилизованным стрептавидином (SA), с использованием протекающего буфера HBS-EP (0,01M HEPES, pH 7,4, 0,15 NaCl, 3 mM ЭДТА, 0,005% об./об. ПАВ P20). Биотинилированный человеческий C1q (или любой другой C1q) может быть разбавлен в HBS-EP буфере до концентрации, равной менее чем 0,5 мкг/мл и

инжектирован через индивидуальные каналы чипа, с использованием переменных значений времени контакта, для достижения двух интервалов плотности антигена, либо 50-200 реагирующих единиц (RU) для детальных кинетических исследований или 800-1000 RU для скрининговых анализов. Исследования регенерации показали, что 25 мМ NaOH в 25% об./об. этаноле эффективно удаляет связанный Fab, при поддержании активности C1q на чипе в течение 200 инъекций. Обычно, серийные разведения (перекрывающие концентрации 0,1-10 раз. оцениваемая K_D) образцов очищенного Fab инжектируют в течение 1 мин при 100 мкл/мин и обеспечивают время диссоциации до 2 ч. Концентрации Fab-белков определяют посредством ELISA и/или электрофореза SDS-PAGE, используя Fab известной концентрации (определенный по аминокислотному анализу) в качестве стандарта. Кинетические скорости ассоциации (k_{on}) и скорости диссоциации (k_{off}) получают одновременно аппроксимацией данных в целом к модели связывания Лэнгмюра 1:1 (Karlsson, R. Roos, H. Fagerstam, L. Petersson, B. (1994). *Methods Enzymology* 6. 99-110) с использованием программы BIAevaluation. Значения равновесной константы диссоциации (K_D) рассчитывают как k_{off}/k_{on} . Данный протокол подходит для применения при определении аффинности связывания антитела с любым C1q, включая человеческий C1q, C1q другого млекопитающего (такой как мышинный C1q, крысиный C1q, C1q приматов), а также различных форм C1q. Аффинность связывания антитела, как правило, измеряют при 25°C, но может также измеряться при 37°C.

Антитела данного раскрытия могут связываться с антигенами C1q, выделенными из любого организма, имеющего систему комплемента, включая организм любого млекопитающего, такого как человек, мышь, крыса, кролик, обезьяна, собака, кошка, корова, лошадь, верблюд, овца, коза или свинья. В нескольких вариантах осуществления, антитела против C1q связываются специфически с эпитопами на человеческом C1q. В нескольких вариантах осуществления, антитела против C1q специфически связываются с эпитопами как на человеческом, так и мышинном C1q. В нескольких вариантах осуществления, антитела против C1q специфически связываются с эпитопами на человеческом, мышинном и крысином C1q.

В нескольких вариантах осуществления, в данном документе предоставлено антитело против C1q, которое связывается с эпитопом C1q, который является одинаковым или перекрывается с эпитопом C1q, связанным другим антителом данного раскрытия. В некоторых вариантах осуществления, в данном документе предоставлено антитело против C1q, которое связывается с эпитопом C1q, который является одинаковым или перекрывается с эпитопом C1q, связанным антителом M1 против C1q. В нескольких вариантах осуществления, антитело против C1q конкурирует с другим антителом данного раскрытия за связывание с C1q. В некоторых вариантах осуществления, антитело против C1q конкурирует с антителом против C1q M1 или его антигенсвязывающим фрагментом за связывание с C1q.

Методы, которые могут применяться для определения того, какой эпитоп C1q связывается с антителом против C1q, или того, связываются ли два антитела с одинаковым или перекрывающимся эпитопом, могут включать, без ограничения, рентгеновскую кристаллографию, ЯМР-спектроскопию, аланин-сканирующий мутагенез, скрининг пептидных библиотек, которые включают C1q-производные пептиды с перекрывающимися последовательностями C1q, и анализы конкурентного связывания. Аналитические тесты конкурентного связывания являются особенно применимыми, чтобы определить связываются ли два антитела с одинаковым эпитопом, посредством распознавания идентичных или стерически перекрывающихся эпитопов, или ингибирует ли конкурентно одно антитело связывание еще одного антитела с антигеном. Эти анализы известны в данной области. Обычно, антиген или клетки, экспрессирующие антиген, иммобилизуют на мультисуточном планшете и измеряют способность немеченого антитела блокировать связывание меченого антитела. Обычными метками для таких анализов конкурентного связывания являются радиоактивные метки или ферментные метки.

Конкурентные антитела, охваченные в данном документе, являются антителами, которые ингибируют (т.е. предотвращают или препятствуют в сравнении с контролем) или снижают связывание любого антитела против C1q данного раскрытия (такого как M1 или антигенсвязывающий фрагмент M1) с C1q, по меньшей мере на 50, 60, 70, 80, 90 и 95% при 1 мкМ или менее. Например, концентрация конкурентного антитела при конкурентном анализе может быть равной или ниже K_D антитела M1 или антигенсвязывающего фрагмента M1. Конкуренция между элементами связывания может быть легко проанализирована *in vitro*, например с использованием ELISA и/или при мониторинге взаимодействия антитела с C1q в растворе. Точное средство для проведения анализа не является критическим. C1q может быть иммобилизовано на 96-луночном планшете или может помещаться в гомогенный раствор. В конкретных вариантах осуществления, способность немеченого кандидатного антитела (антител) блокировать связывание меченого антитела против C1q, например M1, может быть измерена с использованием радиоактивных, ферментных или других методов. При обратном анализе, определяют способность немеченых антител препятствовать взаимодействию меченого антитела против C1q с C1q, где указанное меченое антитело против C1q, например M1, и C1q, уже являются связанными. Считывание производят через измерение связанной метки. C1q и кандидатное антитело(антитела) могут быть добавлены в любом порядке или в одно и то же время.

В нескольких вариантах осуществления, антитело против C1q ингибирует взаимодействие между C1q и аутоантителом. В нескольких вариантах осуществления, антитело против C1q представляет собой мышинное моноклональное антитело M1 против человеческого C1q, которое продуцируется клеточной

линией гибридомы, депонированной в АТСС 6 Июня, 2013 г, с учетным номером в АТСС РТА-120399.

В нескольких вариантах осуществления, антитело против С1q представляет собой изолированное антитело, которое связывается по существу с тем же эпитопом С1q, что и М1. В нескольких вариантах осуществления, антитело против С1q представляет собой изолированное антитело, содержащее переменные домены HVR-L1, HVR-L2 и HVR-L3 легкой цепи моноклонального тела М1, продуцируемого клеточной линией гибридомы, депонированной в АТСС 6 июня, 2013 г, с учетным номером в АТСС РТА-120399, или ее потомством. В нескольких вариантах осуществления, антитело против С1q представляет собой изолированное антитело содержащее переменные домены HVR-H1, HVR-H2 и HVR-H3 тяжелой цепи моноклонального тела М1, продуцируемого клеточной линией гибридомы, депонированной в АТСС 6 июня 2013 г., с учетным номером в АТСС РТА-12 03 99, или ее потомством. В нескольких вариантах осуществления, антитело против С1q представляет собой изолированное антитело, содержащее переменные домены легкой цепи HVR-L1, HVR-L2, и HVR-L3 и переменные домены тяжелой цепи HVR-H1, HVR-H2 и HVR-H3 моноклонального тела М1, продуцируемого клеточной линией гибридомы, депонированной в АТСС 6 июня, 2013 г, с учетным номером в АТСС РТА-120399, или ее потомством.

В нескольких вариантах осуществления, антитело против С1q связывается с белком С1q и связывается с одной или несколькими аминокислотами белка С1q в интервале аминокислотных остатков, выбранных из (а) аминокислотных остатков 196-226 из SEQ ID NO:1 (SEQ ID NO:16), или аминокислотных остатков цепи белка С1q (С1qА), соответствующих аминокислотным остаткам 196-226 (GLFQWSGGMVLQLQQGDQVWVEKDPKKGHI) из SEQ ID NO:1 (SEQ ID NO:16); (b) аминокислотных остатков 196-221 из SEQ ID NO:1 (SEQ ID NO:17), или аминокислотных остатков из С1qА, соответствующих аминокислотным остаткам 196-221 (GLFQWSGGMVLQLQQGDQVWVEKDP) из SEQ ID NO:1 (SEQ ID NO:17); (c) аминокислотных остатков 202-221 из SEQ ID NO:1 (SEQ ID NO:18), или аминокислотных остатков из С1qА соответствующих аминокислотным остаткам 202-221 (SGGMVLQLQQGDQVWVEKDP) из SEQ ID NO:1 (SEQ ID NO:18); (d) аминокислотных остатков 202-219 из SEQ ID NO:1 (SEQ ID NO:19), или аминокислотных остатков из С1qА, соответствующих аминокислотным остаткам 202-219 (SGGMVLQLQQGDQVWVEK) из SEQ ID NO:1 (SEQ ID NO:19); и (e) аминокислотных остатков Lys 219 и/или Ser 202 из SEQ ID NO:1, или аминокислотных остатков из С1qА, соответствующих Lys 219 и/или Ser 202 из SEQ ID NO:1.

В нескольких вариантах осуществления, антитело дополнительно связывается с одной или несколькими аминокислотами белка С1q в интервале аминокислотных остатков, выбранных из: (а) аминокислотных остатков 218-240 из SEQ ID NO:3 (SEQ ID NO:20) или аминокислотных остатков цепи С белка С1q (С1qС), соответствующих аминокислотным остаткам 218-240 (WLAVNDYYDMVGI QGSDSV FSGF) из SEQ ID NO:3 (SEQ ID NO:20); (b) аминокислотных остатков 225-240 из SEQ ID NO:3 (SEQ ID NO:21) или аминокислотных остатков из С1qС, соответствующих аминокислотным остаткам 225-240 (YDMVGI QGSDSVFSGF) из SEQ ID NO:3 (SEQ ID NO:21); (c) аминокислотных остатков 225-232 из SEQ ID NO:3 (SEQ ID NO:22) или аминокислотных остатков из С1qС, соответствующих аминокислотным остаткам 225-232 (YDMVGIQG) из SEQ ID NO:3 (SEQ ID NO:22); (d) аминокислотного остатка Tyr 225 из SEQ ID NO:3 или аминокислотного остатка из С1qС, соответствующего аминокислотному остатку Tyr 225 из SEQ ID NO:3; (e) аминокислотных остатков 174-196 из SEQ ID NO:3 (SEQ ID NO:23) или аминокислотных остатков из С1qС, соответствующих аминокислотным остаткам 174-196 (HTANLCVLL YRSGVKWTFCHGT) из SEQ ID NO:3 (SEQ ID NO:23); (f) аминокислотных остатков 184-192 из SEQ ID NO:3 (SEQ ID NO:24) или аминокислотных остатков из С1qС, соответствующих аминокислотным остаткам 184-192 (RSGVKWTF) из SEQ ID NO:3 (SEQ ID NO:24); (g) аминокислотных остатков 185-187 из SEQ ID NO:3 или аминокислотных остатков из С1qС, соответствующих аминокислотным остаткам 185-187 (SGV) из SEQ ID NO:3; (h) аминокислотного остатка Ser 185 из SEQ ID NO:3 или аминокислотного остатка из С1qС, соответствующего аминокислотному остатку Ser 185 из SEQ ID NO:3.

В некоторых вариантах осуществления, антитело против С1q связывается с аминокислотным остатком Lys 219 и Ser 202 из человеческого С1qА, как показано в SEQ ID NO:1 или аминокислотами человеческого С1qА, соответствующими Lys 219 и Ser 202, как показано в SEQ ID NO:1, и аминокислотным остатком Tyr 225 из человеческого С1qС, как показано в SEQ ID NO:3, или аминокислотным остатком из человеческого С1qС, соответствующим Tyr 225, как показано в SEQ ID NO:3. В некоторых вариантах осуществления, антитело против С1q связывается с аминокислотным остатком Lys 219 из человеческого С1qА, как показано в SEQ ID NO:1, или аминокислотным остатком из человеческого С1qА, соответствующим Lys 219, как показано в SEQ ID NO:1, и аминокислотным остатком Ser 185 из человеческого С1qС, как показано в SEQ ID NO:3, или аминокислотным остатком из человеческого С1qС, соответствующим Ser 185, как показано в SEQ ID NO:3.

В нескольких вариантах осуществления, антитело против С1q связывается с белком С1q и связывается с одной или несколькими аминокислотами белка С1q в интервале аминокислотных остатков, выбранных из: (а) аминокислотных остатков 218-240 из SEQ ID NO:3 (SEQ ID NO:20) или аминокислотных остатков из С1qС, соответствующих аминокислотным остаткам 218-240 (WLAVNDYYDMVGI QGSDSVFSGF) из SEQ ID NO:3 (SEQ ID NO:20); (b) аминокислотных остатков 225-240 из SEQ ID NO:3 (SEQ ID NO:21) или аминокислотных остатков из С1qС, соответствующих аминокислотным остаткам

225-240 (YDMVGI QGSDSVFSGF) из SEQ ID NO:3 (SEQ ID NO:21); (c) аминокислотных остатков 225-232 из SEQ ID NO:3 (SEQ ID NO:22) или аминокислотных остатков из C1qC, соответствующих аминокислотным остаткам 225-232 (YDMVGIQG) из SEQ ID NO:3 (SEQ ID NO:22); (d) аминокислотного остатка Тур 225 из SEQ ID NO:3 или аминокислотного остатка из C1qC, соответствующего аминокислотному остатку Тур 225 из SEQ ID NO:3; (e) аминокислотных остатков 174-196 из SEQ ID NO:3 (SEQ ID NO:23) или аминокислотных остатков из C1qC, соответствующих аминокислотным остаткам 174-196 (HTANLCVLLYRSGVKWTFCHGT) из SEQ ID NO:3 (SEQ ID NO:23); (f) аминокислотных остатков 184-192 из SEQ ID NO:3 (SEQ ID NO:24) или аминокислотных остатков из C1qC, соответствующих аминокислотным остаткам 184-192 (RSGVKWTF) из SEQ ID NO:3 (SEQ ID NO:24); (g) аминокислотных остатков 185-187 из SEQ ID NO:3 или аминокислотных остатков из C1qC, соответствующих аминокислотным остаткам 185-187 (SGV) из SEQ ID NO:3; (h) аминокислотного остатка Ser 185 из SEQ ID NO:3 или аминокислотного остатка C1qC, соответствующего аминокислотному остатку Ser 185 из SEQ ID NO:3.

В нескольких вариантах осуществления, антитело против C1q данного раскрытия ингибирует взаимодействие между C1q и C1s. В нескольких вариантах осуществления, антитело против C1q ингибирует взаимодействие между C1q и C1r. В нескольких вариантах осуществления антитело против C1q ингибирует взаимодействие между C1q и C1s и между C1q и C1r. В нескольких вариантах осуществления, антитело против C1q ингибирует взаимодействие между C1q и еще одним антителом, таким как аутоантитело. В нескольких вариантах осуществления, антитело против C1q ингибирует соответствующие взаимодействия, при стехиометрическом соотношении, равном менее чем 2,5:1; 2,0:1; 1,5:1; или 1,0:1. В нескольких вариантах осуществления, антитело против C1q ингибирует взаимодействие, такое как взаимодействие C1q-C1s, при приблизительно эквимоллярных концентрациях C1q и антитела против C1q. В других вариантах осуществления, антитело против C1q связывается с C1q при стехиометрическом соотношении, равном менее чем 20:1; менее чем 19,5:1; менее чем 19:1; менее чем 18,5:1; менее чем 18:1; менее чем 17,5:1; менее чем 17:1; менее чем 16,5:1; менее чем 16:1; менее чем 15,5:1; менее чем 15:1; менее чем 14,5:1; менее чем 14:1; менее чем 13,5:1; менее чем 13:1; менее чем 12,5:1; менее чем 12:1; менее чем 11,5:1; менее чем 11:1; менее чем 10,5:1; менее чем 10:1; менее чем 9,5:1; менее чем 9:1; менее чем 8,5:1; менее чем 8:1; менее чем 7,5:1; менее чем 7:1; менее чем 6,5:1; менее чем 6:1; менее чем 5,5:1; менее чем 5:1; менее чем 4,5:1; менее чем 4:1; менее чем 3,5:1; менее чем 3:1; менее чем 2,5:1; менее чем 2,0:1; менее чем 1,5:1; или менее чем 1,0:1. В некоторых вариантах осуществления, антитело против C1q связывает C1q при стехиометрическом соотношении связывания, находящемся в интервале от 20:1 до 1,0:1 или менее чем 1,0:1. В некоторых вариантах осуществления, антитело против C1q связывает C1q при стехиометрическом соотношении связывания, находящемся в интервале от 6:1 до 1,0:1 или менее чем 1,0:1. В некоторых вариантах осуществления, антитело против C1q связывает C1q при стехиометрическом соотношении связывания, находящемся в интервале от 2,5:1 до 1,0:1 или менее чем 1,0:1. В нескольких вариантах осуществления, антитело против C1q ингибирует взаимодействие между C1q и C1r, или между C1q и C1s, или между C1q и как C1r, так и C1s. В нескольких вариантах осуществления, антитело против C1q ингибирует взаимодействие между C1q и C1r, между C1q и C1s и/или между C1q и как C1r, так и C1s. В нескольких вариантах осуществления, антитело против C1q связывается с А-цепью C1q. В других вариантах осуществления, антитело против C1q связывается с В-цепью C1q. В других вариантах осуществления, антитело против C1q связывается с С-цепью C1q. В нескольких вариантах осуществления, антитело против C1q связывается с А-цепью C1q, В-цепью C1q и/или С-цепью C1q. В нескольких вариантах осуществления, антитело против C1q связывается с глобулярным доменом А-цепи, В-цепи и/или С-цепи C1q. В других вариантах осуществления, антитело против C1q связывается с коллаген-подобным доменом А-цепи C1q, В-цепи C1q и/или С-цепи C1q.

В тех случаях, где антитела данного раскрытия ингибируют взаимодействие между двумя или более факторами комплемента, таких как взаимодействие C1q и C1s, или взаимодействие между C1q и C1r, взаимодействие, происходящее в присутствии антитела может быть снижено по меньшей мере на 10%, по меньшей мере 20%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 99%, относительно контроля, где антитела данного раскрытия отсутствуют. В некоторых вариантах осуществления, взаимодействие, происходящее в присутствии антитела, снижается на количество, в интервале по меньшей мере от 30% до по меньшей мере 99%, относительно контроля, где антитела данного раскрытия отсутствуют.

В нескольких вариантах осуществления, антитела данного раскрытия ингибируют С4-расщепление на по меньшей мере 20%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, или по меньшей мере 99%, или на количество, в интервале от по меньшей мере 30% по меньшей мере до 99%, относительно контроля, где антитела данного раскрытия отсутствуют. Методы измерения С4-расщепления хорошо известны в данной области. Значения EC_{50} для антител данного раскрытия по отношению к С4-расщеплению могут составлять менее чем 3; 2,5; 2,0; 1,5; 1,0; 0,5; 0,25; 0; 0,05 мкг/мл. В нескольких вариантах осуществления, антитела данного раскрытия ингибируют С4-расщепление при приблизительно эквимоллярных концентрациях C1q и соответствующего антитела против C1q.

В нескольких вариантах осуществления, антитела данного раскрытия ингибируют аутоантитело-зависимую и комплемент-зависимую цитотоксичность (CDC) по меньшей мере на 20%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, или по меньшей мере 99% или на количество в интервале по меньшей мере от 30% до по меньшей мере 99% относительно контроля, где антитела данного раскрытия отсутствуют. Значения EC_{50} для антител данного раскрытия по отношению к ингибированию аутоантитело-зависимой и комплемент-зависимой цитотоксичности могут составлять менее чем 3; 2,5; 2,0; 1,5; 1,0; 0,5; 0,25; 0,1; 0,05 мкг/мл.

В нескольких вариантах осуществления, антитела данного раскрытия ингибируют комплемент-зависимую клеточноопосредованную цитотоксичность (CDCC) по меньшей мере на 20%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 99% или на количество, в интервале от по меньшей мере 30% до по меньшей мере 99%, относительно контроля, где антитела данного раскрытия отсутствуют. Методы измерения CDCC хорошо известны в данной области. Значения EC_{50} для антител данного раскрытия по отношению к ингибированию CDCC могут составлять менее чем 3; 2,5; 2,0; 1,5; 1,0; 0,5; 0,25; 0,1; 0,05 мкг/мл. В нескольких вариантах осуществления, антитела данного раскрытия ингибируют CDCC, но не ингибируют антитело-зависимую клеточную цитотоксичность (ADCC).

В нескольких вариантах осуществления, антитела данного раскрытия ингибируют гемолиз C1F (также называемый как гемолиз CH50) по меньшей мере на 20%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 99% или на количество в интервале от по меньшей мере 30% до по меньшей мере 99% относительно контроля, где антитела данного раскрытия отсутствуют, или где применяют контрольные антитела, которые не связываются с фактором комплемента, или другое антитело, такое как аутоантитело (см., например, пример 3). Методы измерения гемолиза C1F хорошо известны в данной области (см., например, пример 3). Значения EC_{50} для антител данного раскрытия по отношению к гемолизу C1F могут составлять менее чем 3; 2,5; 2,0; 1,5; 1,0; 0,5; 0,25; 0,1; 0,05 мкг/мл. В нескольких вариантах осуществления, антитела против C1q данного раскрытия нейтрализуют по меньшей мере 50% гемолиза C1F при дозе, равной менее чем 200 нг/мл, менее чем 100 нг/мл, менее чем 50 нг/мл, или менее чем 20 нг/мл. В нескольких вариантах осуществления, антитела данного раскрытия нейтрализуют гемолиз C1F при приблизительно эквимоллярных концентрациях C1q и антитела против C1q. В нескольких вариантах осуществления, антитела против C1q данного раскрытия нейтрализуют гемолиз в аналитическом тесте на гемолиз человеческого C1F. В нескольких вариантах осуществления, антитела данного раскрытия нейтрализуют гемолиз в аналитическом тесте на гемолиз человеческого, мышиного и крысиного C1F (см., например, пример 3).

В нескольких вариантах осуществления, альтернативный путь может увеличивать CDC, инициированную посредством связывания C1q и последующей активации C1s; по меньшей мере в нескольких из этих вариантов осуществления, антитела данного раскрытия ингибируют альтернативный путь на по меньшей мере 30%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, или по меньшей мере 99%, или на количество, в интервале от по меньшей мере 30% до по меньшей мере 99%, относительно контроля, где антитела данного раскрытия отсутствовали.

В нескольких вариантах осуществления, антитела данного раскрытия предотвращают синаптическую потерю у клеточной модели *in vitro* или модели *in vivo* синаптической потери, такой как мышинная модель *in vivo*. Мышинные модели *in vivo* могут включать Tg2576, мышинный белок-предшественник амилоида (APP) трансгенной модели болезни Альцгеймера, R6/2 NT-CAG150, трансгенную модель для болезни Хантингтона, или SMAA7, мышиную модель спинальной мышечной атрофии, или DBA/2J, генетическую мышинную модель глаукомы. Как правило, могут применяться любая модель нейродегенеративного заболевания, которая проявляет потерю синапсов.

Методы измерения синаптической потери *in vitro* или *in vivo* хорошо известны в данной области. Образование повреждения *in vitro* может быть снижено по меньшей мере на 30%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, или по меньшей мере 95%, или на количество, в интервале от по меньшей мере 30% до по меньшей мере 95%, относительно контрольного эксперимента, в котором антитела данного раскрытия отсутствуют. Значения EC_{50} для антител данного раскрытия по отношению к предотвращению образования повреждения *in vitro* могут составлять менее чем 3; 2,5; 2,0; 1,5; 1,0; 0,5; 0,25; 0,1; 0,05 мкг/мл. Синаптическая потеря *in vivo* может быть снижена по меньшей мере на 5%, по меньшей мере 10%, по меньшей мере 15%, по меньшей мере 20%, по меньшей мере 35%, по меньшей мере 40% или по меньшей мере 50%, или на количество, в интервале от по меньшей мере 5% до по меньшей мере 50%, относительно контрольного эксперимента, в котором антитела данного раскрытия отсутствуют.

В нескольких вариантах осуществления, антитела данного раскрытия предотвращают образование повреждения у модели среза спинного мозга NMO *ex vivo* или мышинной модели NMO *in vivo*. Методы

измерения образования повреждения *ex vivo* или *in vivo* хорошо известны в данной области. Образование повреждения *ex vivo* может быть снижено по меньшей мере на относительный балл, равный 0,5, 1,0, 1,5, 2,0, 2,5, 3,0, 3,5, или 4,0. Значения EC_{50} для антител данного раскрытия по отношению к предотвращению образования повреждения *ex vivo* могут составлять менее чем 3; менее чем 2,5; менее чем 2,0; менее чем 1,5; менее чем 1,0; менее чем 0,5 мкг/мл; менее чем 0,25 мкг/мл; менее чем 0,1 мкг/мл; или менее чем 0,05 мкг/мл. Образование повреждения *in vivo* может быть снижено по меньшей мере на 5%, по меньшей мере 10%, по меньшей мере 15%, по меньшей мере 20%, по меньшей мере 35%, по меньшей мере 40%, или по меньшей мере 50%, или на количество, в интервале от по меньшей мере 5% до по меньшей мере 50% с учетом потери окрашивания (% области). Окрашивание можно оценить, без ограничения, по окрашиванию APQ4, окрашиванию GFAP или окрашиванию MBR.

Настоящее раскрытие предоставляет антитела против C1q. Антитела данного раскрытия могут иметь одну или несколько из следующих характеристик. Антитела данного раскрытия могут представлять собой поликлональные антитела, моноклональные антитела, гуманизированное антитела, человеческие антитела, фрагменты антител, биспецифические и полиспецифические антитела, мультивалентные антитела или гетероконъюгатные антитела. Фрагменты антител данного раскрытия могут быть функциональными фрагментами, которые связывают такой же эпитоп, как и любое из антител против C1q данного раскрытия. В нескольких вариантах осуществления, фрагменты антител данного раскрытия специфически связываются с и нейтрализуют биологическую активность C1q. В нескольких вариантах осуществления, фрагменты антител представляют собой уменьшенные версии антител против C1q или фрагментов антител данного раскрытия, который имеют такой же эпитоп соответствующего непротессированного антитела, но имеют гораздо меньшую молекулярную массу. Такие уменьшенные фрагменты антитела против C1q могут иметь более высокую проницаемость в мозг и более короткое время полужизни, которое является преимущественным для визуализации и диагностических применений (см., например, Lutje S. et al., *Bioconj. Chem.* 2014 Feb 19;25(2):335-41; Tavare R. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2014 Jan 21;111 (3): 1108-13; и Wiehr S. et al., *Prostate.* 2014 May; 74(7):743-55). Соответственно, в нескольких вариантах осуществления, фрагменты антитела против C1q данного раскрытия имеют лучшую проницаемость в мозг по сравнению с их соответствующими непротессированными антителами и/или имеют более короткое время полужизни по сравнению с их соответствующими непротессированными антителами. В нескольких вариантах осуществления, антитела против C1q настоящего раскрытия представляют собой биспецифические антитела распознающие первый антиген и второй антиген. В нескольких вариантах осуществления, первый антиген представляет собой антиген C1q. В нескольких вариантах осуществления, второй антиген представляет собой антиген, способствующий транспорту через гематоэнцефалический барьер, включающий без ограничения, трансферриновый рецептор (TR), инсулиновый рецептор (HIR), рецептор инсулин-подобного фактора роста (IGFR), белки 1 и 2, относящиеся к рецепторам липопротеинов низкой плотности (LPR-1 и 2), рецептор дифтерийного токсина, CRM197, однодоменное антитело ламы, TMEM 30(A), домен белковой трансдукции, TAT, Syn-B, пенетратин, поли-аргининовый пептид, ангиопеп-пептид и ANG1005. Антитела данного раскрытия могут дополнительно содержать сконструированные эффекторные функции, модификации аминокислотной последовательности или другие модификации антитела, известные в данной области; например, константная область антител против C1q, описанных в данном документе, может быть модифицирована, чтобы ослабить активацию комплемента.

Дополнительные антитела против C1q, например антитела, которые специфически связываются с белком C1q настоящего раскрытия, могут быть идентифицированы, подвергнуты скринингу и/или охарактеризованы по их физическим/химическим свойствам и/или биологическим активностям посредством различных аналитических тестов, известных в данной области.

Получение антител.

Антитела против C1q настоящего раскрытия могут охватывать поликлональные антитела, моноклональные антитела, гуманизированные антитела, химерные антитела, человеческие антитела, фрагменты антител (например, Fab, Fab'-SH, Fv, scFv, и F(ab')₂ фрагменты), биспецифические и полиспецифические антитела, мультивалентные антитела, гетероконъюгатные антитела, антитела, полученные из библиотек, антитела, имеющие модифицированные эффекторные функции, гибридные белки, содержащие часть антитела и любую другую модифицированную конфигурацию иммуноглобулиновой молекулы, которая включает участок распознавания антигена, такой как эпитоп, имеющий аминокислотные остатки белка C1q настоящего раскрытия, включая варианты гликозилирования антител, варианты аминокислотной последовательности антител и ковалентно модифицированные антитела. Антитела против C1q могут иметь человеческое, мышиное, крысиное или любое другое происхождение (включая химерные или гуманизированные антитела).

(1) Поликлональные антитела.

Поликлональные антитела, такие как поликлональные антитела против C1q, обычно возникают у животных при множественных подкожных (пк) или внутрибрюшинных (вб) инъекциях соответствующего антигена и адъюванта. Может применяться конъюгирование подходящего антигена (например, очищенного или рекомбинантного белка C1q настоящего раскрытия) с белком, который является иммуно-

генным у вида, подлежащего иммунизации, например гемоцианином лимфы улитки (KLH), альбумином сыворотки, бычьим тиреоглобулином или ингибитором соевого трипсина, с использованием бифункционального или дериватирующего агента, например малеимидобензоил сульфосукцинимидного сложного эфира (конъюгация через остатки цистеина), N-гидроксисукцинимид (через остатки лизина), глутаральдегида, янтарного ангидрида, SOCl_2 , или $\text{R}^1\text{N}=\text{C}=\text{NR}$, где R и R^1 независимо являются низшими алкильными группами. Примеры адъювантов, которые могут использоваться, включают полный адъювант Фрейнда и адъювант MPL-TDM (монофосфорил Липид А, синтетический дикориномиколат трегалозы). Протокол иммунизации может быть выбран специалистом в данной области без излишнего экспериментирования.

Животных иммунизируют против желательного антигена, иммуногенных конъюгатов или производных посредством комбинирования, например, 100 мкг (для кроликов) или 5 мкг (для мышей) белка или конъюгата с 3 объемами полного адъюванта Фрейнда и инъекции раствора внутривенно на множестве участков. Через один месяц, животных повторно иммунизируют 1/5-1/10 исходного количества пептида или конъюгата в полном адъюванте Фрейнда посредством подкожной инъекции на множестве участков. Через от семи до четырнадцати дней у животных производят забор крови и сыворотку анализируют на титр антител. Животных повторно иммунизируют до титровальных плато. Конъюгаты также могут быть получены в культуре рекомбинантных клеток как белковые гибриды. Также для усиления иммунного ответа подходящими являются агрегирующие средства, такие как квасцы.

(2) Моноклональные антитела.

Моноклональные антитела, такие как моноклональные антитела против C1q, получают из популяции по существу гомогенных антител, т.е. индивидуальные антитела, составляющие популяцию, являются идентичными за исключение возможных природных мутаций и/или посттрансляционных модификаций (например, изомеризаций, амидирований), которые могут присутствовать в минорных количествах. Таким образом, модификатор "моноклональные" указывает на характер антител, как не являющихся смесью дискретных антител.

Например, моноклональные антитела против C1q могут быть получены, используя метод гибридомы, впервые описанный Köhler et al., *Nature*, 256:495 (1975), или могут быть получены методами рекомбинантных ДНК (патент США № 4816567).

В методе гибридомы мышь или другое соответствующее животное-хозяин, такое как хомяк, иммунизируют, как выше описано в данном документе, чтобы выявить лимфоциты, которые продуцируют или обладают способностью к продуцированию антител, которые будут специфически связываться с белком, применяемым для иммунизации (например, очищенным или рекомбинантным белком C1q настоящего раскрытия). Альтернативно, лимфоциты могут быть иммунизированы *in vitro*. Лимфоциты затем гибридизируют с клетками миеломы с использованием подходящего средства для гибридизации, такого как полиэтиленгликоль, для образования клетки гибридомы (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, pp.59-103 (Academic Press, 1986)).

Средство иммунизации будет обычно включать антигенный белок (например, очищенный или рекомбинантный белок C1q настоящего раскрытия) или его гибридный вариант. Как правило, лимфоциты периферической крови ("PBL") применяют, если клетки человеческого происхождения являются желательными, в то время как клетки селезенки или лимфатического узла применяют, если желательными являются источники млекопитающих, не являющихся человеком. Лимфоциты затем гибридизируют с иммортализованной клеточной линией с использованием подходящего средства для гибридизации, такого как полиэтиленгликоль, чтобы образовать клетку гибридомы. Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, Academic Press (1986), pp. 59-103.

Иммортализованные клеточные линии обычно представляют собой трансформированные клетки млекопитающих, конкретно клетки миеломы грызуна, клетки бычьего или человеческого происхождения. Обычно, используют крысиные или мышинные клеточные линии миеломы. Клетки гибридомы, полученные таким образом, высевают и выращивают в подходящей культуральной среде, которая может содержать одно или несколько веществ, которые ингибируют рост или выживание негибридизированных, родительских клеток миеломы. Например, если в родительских клетках миеломы отсутствует фермент гипоксантингуанинфосфорибозилтрансфераза (HGPRT или HPRT), культуральная среда для гибридом типично будет включать гипоксантин, аминоптерин и тимидин (среда HAT), которые являются веществами, которые предотвращают рост HGPRT-дефицитных клеток.

В нескольких вариантах осуществления, иммортализованные клетки миеломы представляют собой клетки, которые эффективно гибридизируются, поддерживают стабильное получение антител на высоком уровне выбранными антитело-продуцирующими клетками, и являются чувствительными к среде, такой как среда HAT. Среди них присутствуют линии мышинной миеломы, такие как линии, производные от мышинных опухолей MOPC-21 и MPC-11 (доступные от Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, California USA), а также клетки SP-2 и их производные (например, X63-Ag8-653) (доступные от American Type Culture Collection, Manassas, Virginia USA). Были также описаны клеточные линии человеческой миеломы и мышинной-человеческой гетеромиеломы для получения человеческих моноклональных антител (Kozbor, *J. Immunol.*, 133:3001 (1984); Brodeur et al., *Monoclonal Antibody Production Tech-*

niques and Applications, pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987)).

Культуральную среду, в которой выращивают клетки гибридомы, анализируют на предмет получения моноклональных антител, направленных против антигена (например, белка С1q настоящего раскрытия). В нескольких вариантах осуществления, специфичность связывания моноклональных антител, продуцируемых клетками гибридомы, определяют по иммунопреципитации или посредством аналитического теста на связывание *in vitro*, такого как радиоиммунологический анализ (RIA) или фермент-связанный иммуносорбентный анализ (ELISA).

Культуральная среда, в которой культивируют клетки гибридомы, может быть проанализирована на присутствие моноклональных антител, направленных против желательного антигена (например, белка С1q настоящего раскрытия). В нескольких вариантах осуществления, аффинность связывания и специфичность моноклонального тела могут определяться посредством иммунопреципитации или посредством анализа связывания *in vitro*, такого как радиоиммунологический анализ (RIA) или фермент-связанный анализ (ELISA). Такие методы и анализы являются хорошо известными в области. Например, аффинность связывания может быть определена посредством анализа Скэтчарда из Munson et al., *Anal. Biochem.*, 107:220 (1980).

После идентификации клеток гибридомы, которые продуцируют антитела желательной специфичности, аффинности и/или активности, клоны могут быть субклонированы по методикам ограничивающего разбавления и выращены стандартными методами (Goding, выше). Подходящая культуральная среда для этой цели включает, например, среду D-MEM или RPMI-1640. В дополнение, клетки гибридомы могут быть выращены *in vivo* в виде опухолей в млекопитающем.

Моноклональные антитела, секретированные субклонами, подходящим образом отделяют от культуральной среды, асцитной жидкости или сыворотки посредством общепринятых методик очистки иммуноглобулинов, таких как, например, хроматография на белок А-сефарозе, хроматография на гидроксиапатите, гель-электрофорез, диализ, аффинная хроматография и другие методы, описанные выше.

Моноклональные антитела против С1q могут также быть получены посредством методов рекомбинантных ДНК, таких как методы, раскрытые в патенте США № 4816567, и как описано выше. ДНК, кодирующие моноклональные антитела, легко изолируют и секвенируют с использованием общепринятых методик (например, используя олигонуклеотидные зонды, которые специфически связываются с генами, кодирующими тяжелые и легкие цепи мышинных антител). Клетки гибридомы служат в качестве источника такой ДНК. Сразу после изолирования ДНК может помещаться в векторы экспрессии, которые затем трансфицируют в клетки-хозяева, такие как клетки *E. coli*, клетки COS обезьян, клетки яичника китайского хомяка (СНО) или клетки миеломы, которые иным образом не продуцируют белок иммуноглобулина, чтобы синтезировать моноклональные антитела в таких рекомбинантных клетках-хозяевах. Обзорные статьи по рекомбинантной экспрессии в бактериях из ДНК, кодирующих антитела, включают Skerra et al., *Curr. Opin. Immunol.*, 5:256-262 (1993) и Plückthun, *Immunol. Rev.* 130:151-188 (1992).

В некоторых вариантах осуществления, антитела против С1q могут быть изолированы из фаговых библиотек антител, генерируемых методами, описанными в McCafferty et al., *Nature*, 348:552-554 (1990). Clackson et al., *Nature*, 352:624-628 (1991) и Marks et al., *J. Mol. Biol.*, 222:581-597 (1991) описали выделение мышинных и человеческих антител, соответственно, из фаговых библиотек. Последующие публикации описывают получение высокоаффинных (в наномолярном ("нМ") интервале) человеческих антител посредством перетасовки цепей (Marks et al., *Bio/Technology*, 10:779-783 (1992)), а также комбинаторной инфекции и рекомбинации *in vivo* в качестве стратегии для построения очень крупных фаговых библиотек (Waterhouse et al., *Nucl. Acids Res.*, 21:2265-2266 (1993)). Таким образом, эти методы являются жизнеспособными альтернативами традиционным методам получения моноклональных антител из гибридомы для выделения моноклональных антител желательной специфичности (например, тех, которые связывают белок С1q настоящего раскрытия).

ДНК, кодирующие антитела или их фрагменты, могут также быть модифицированы, например, посредством замены кодирующей последовательности для константных доменов человеческой тяжелой и легкой цепи на гомологичные мышинные последовательности (патент США № 4816567; Morrison et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:6851 (1984)), или посредством ковалентного присоединения к кодирующей последовательности иммуноглобулина всей или части кодирующей последовательности для неиммуноглобулинового полипептида. Обычно такие неиммуноглобулиновые полипептиды заменяют на константные домены антитела, или их заменяют на переменные домены одного антиген-комбинирующего участка антитела, для создания химерного бивалентного антитела, содержащего один антиген-комбинирующий участок, имеющий специфичность к антигену и еще один другой антиген-комбинирующий участок, имеющий специфичность к отличающемуся антигену.

Моноклональные антитела, описанные в данном документе, (например, антитела против С1q настоящего раскрытия или их фрагменты) могут являться моновалентными, получение которых является хорошо известным в данной области. Например, один способ включает в себя рекомбинантную экспрессию легкой цепи иммуноглобулина и модифицированной тяжелой цепи. Тяжелую цепь процессируют, как правило, по любой точке в области Fc, так, чтобы предотвратить сшивку тяжелой цепи. Альтернативно, подходящие остатки цистеина могут быть заменены на другие аминокислотные остатки или под-

вергнуты делеции, чтобы предотвратить сшивку. Способы *in vitro* также подходят для получения моновалентных антител. Расщепление антител для получения их фрагментов, конкретно Fab фрагментов, может выполняться с использованием рутинных методов, известных в данной области.

Химерные или гибридные антитела против C1q также могут быть получены *in vitro*, с использованием известных методов в синтетической химии белка, включающих методы, включающие сшивающие агенты. Например, иммунотоксины могут быть построены, используя реакцию дисульфидного обмена или посредством образования тиоэфирной связи. Примеры подходящих реагентов для этой цели включают имиотиолат и метил-4-меркаптобутиримидат.

(3) Гуманизированные антитела.

Антитела против C1q настоящего раскрытия или фрагменты таких антител могут дополнительно включать гуманизированные или человеческие антитела. Гуманизированные формы нечеловеческих (например, мышинных) антител представляют собой химерные иммуноглобулины, цепи иммуноглобулинов или их фрагменты (такие как Fab, Fab'-SH, Fv, scFv, F(ab')₂ или другие антигенсвязывающие субпоследовательности антител), которые содержат минимальную последовательность, производную от нечеловеческого иммуноглобулина. Гуманизированные антитела включают человеческие иммуноглобулины (реципиентное антитело), в которых остатки из области, определяющей комплементарность (CDR) реципиента замещают остатками из CDR нечеловеческого вида (донорное антитело), такого как мышь, крыса или кролик, имеющими желательную специфичность, аффинность и емкость. В некоторых случаях, остатки Fv каркаса человеческого иммуноглобулина заменяют на соответствующие нечеловеческие остатки.

Гуманизированные антитела могут также содержать остатки, которые не обнаруживаются ни в реципиентном антителе, ни в импортированных CDR или каркасных последовательностях. Как правило, гуманизированное антитело будет содержать по существу все по меньшей мере из одного, и обычно двух, переменных доменов, в которых все или по существу все из CDR областей соответствуют этим областям нечеловеческого иммуноглобулина и все или по существу все из FR областей являются этими областями из консенсусной последовательности человеческого иммуноглобулина. Гуманизированное антитело оптимально будет также содержать по меньшей мере часть константной области иммуноглобулина (Fc), обычно, часть константной области человеческого иммуноглобулина. Jones et al., *Nature* 321: 522-525 (1986); Riechmann et al., *Nature* 332: 323-329 (1988) and Presta, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2: 593-596 (1992). В нескольких вариантах осуществления, антитело против C1q представляет собой химерное антитело, содержащее переменные домены тяжелой и легкой цепи любых антител против C1q, описанных в данном документе (например, антитело M1 и 4A4B11), и константные области из человеческого иммуноглобулина.

Способы гуманизации нечеловеческих антител против C1q хорошо известны в данной области. Обычно, гуманизированное антитело имеет один или несколько аминокислотных остатков, введенных в него из источника, который не является человеком. Эти нечеловеческие аминокислотные остатки часто называют "импортными" остатками, которые обычно берутся из "импортного" переменного домена. Гуманизация может по существу выполняться, следуя способу Winter and co-workers, Jones et al., *Nature* 321:522-525 (1986); Riechmann et al., *Nature* 332:323-327 (1988); Verhoeven et al., *Science* 239:1534-1536 (1988), или посредством замены последовательностей CDRs или CDR грызунов на соответствующие последовательности человеческого антитела. Соответственно, такие "гуманизированные" антитела представляют собой химерные антитела (патент США № 4816567), где по существу менее чем интактный человеческий переменный домен был заменен на соответствующую последовательность от нечеловеческого вида. На практике, гуманизированные антитела представляют собой обычно человеческие антитела, в которых некоторые остатки CDR и возможно некоторые остатки FR заменяют остатками из аналогичных сайтов в антителах грызунов.

Выбор человеческих переменных доменов, как легких, так и тяжелых, для использования при получении гуманизированных антител является очень важным для снижения антигенности. В соответствии с так называемым методом "наилучшего приближения" последовательность переменного домена антитела грызунов скринируют против полной библиотеки известных последовательностей человеческих переменных доменов.

Человеческая последовательность, которая является наиболее сходной с последовательностью грызуна, затем принимают в качестве человеческого каркаса (FR) для гуманизированного антитела. Sims et al., *J. Immunol.*, 151:2296 (1993); Chothia et al., *J. Mol. Biol.*, 196:901 (1987). В еще одном другом методе применяют конкретный каркас, производный от консенсусной последовательности всех человеческих антител из конкретной подгруппы легких или тяжелых цепей. Такой же каркас может применяться для нескольких различных гуманизированных антител. Carter et al., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 89:4285 (1992); Presta et al., *J. Immunol.* 151:2623 (1993).

Кроме того, важно, чтобы антитела были гуманизированы с сохранением высокой аффинности для антигена и других благоприятных биологических свойств. Для достижения этой цели, гуманизированные антитела получают посредством процесса анализа родительских последовательностей и различных концептуальных гуманизированных продуктов, используя трехмерные модели родительских и гуманизи-

ванных последовательностей. Трехмерные модели иммуноглобулинов являются общедоступными и знакомы специалистам в данной области. Доступными являются компьютерные программы, которые иллюстрируют и отображают вероятные трехмерные конформационные структуры выбранных кандидатных иммуноглобулиновых последовательностей. Проверка этих отображений позволяет проводить анализ вероятной роли остатков при функционировании кандидатных иммуноглобулиновых последовательностей, т.е. анализ остатков, которые влияют на способность кандидатного иммуноглобулина связывать его антиген. Таким путем, остатки FR могут выбираться и комбинироваться с реципиентными и импортными последовательностями, таким образом, что достигается желательная характеристика антитела, такая как увеличенная аффинность для целевого антигена или антигенов (например, белков C1q настоящего раскрытия). Как правило, остатки CDR являются непосредственно и наиболее существенно вовлечены во влияние на связывание антигена.

Предусмотрены различные формы гуманизированного антитела против C1q. Например, гуманизированное антитело против C1q может быть фрагментом антитела, таким как Fab, который необязательно конъюгируется с одним или несколькими цитотоксическими агентами(агентами), чтобы генерировать иммуноконъюгат. Альтернативно, гуманизированное антитело против C1q может являться интактным антителом, таким как интактное IgG1 антитело.

(4) Человеческие антитела.

Альтернативно, могут генерироваться человеческие антитела против C1q. Например, в настоящее время является возможным получать трансгенных животных (например, мышей), которые обладают способностью, при иммунизации, продуцировать полный набор человеческих антител в отсутствие эндогенной выработки иммуноглобулинов. Гомозиготная делеция гена объединяющей области тяжелой цепи (J_H) антитела у химерных и мутантных зародышевых мышей приводит к полному ингибированию выработки эндогенного антитела. Перенос геновой матрицы человеческого зародышевого иммуноглобулина в такую зародышевую мутантную мышшь будет приводить к выработке человеческих антител при антигенной стимуляции. См., например, Jakobovits et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA, 90:2551 (1993); Jakobovits et al., Nature, 362:255-258 (1993); Bruggermann et al., Year in Immunol., 7:33 (1993); патент США № 5591669 и WO 97/17852.

Альтернативно, для получения человеческих антител против C1q и фрагментов антитела *in vitro* может применяться технология фагового отображения, из генных наборов переменного (V) домена иммуноглобулина от неиммунизированных доноров. McCafferty et al., Nature 348:552-553 (1990); Hoogenboom and Winter, J. Mol. Biol. 227: 381 (1991). В соответствии с этим методом гены V домена антитела клонируют внутри рамки в ген либо основного или минорного белка оболочки нитевидного бактериофага, такого как M13 или fd, и отображают в виде функциональных фрагментов антитела на поверхности частицы фага.

Вследствие того, что нитевидная частица содержит копию одноцепочечной ДНК генома фага, селекции, основанные на функциональных свойствах антитела, также приводят к селекции гена, кодирующего антитело, проявляющего эти свойства. Таким образом, фаг имитирует некоторые свойства В-клеток. Фаговое отображение может выполняться в различных форматах, обзор которых приведен, например, в Johnson, Kevin S. и Chiswell, David J., Curr. Opin Struct. Biol. 3:564-571 (1993). Некоторые источники сегментов V-гена могут применяться для фагового отображения. Clackson et al., Nature 352:624-628 (1991) изолированного разнотипного массива антиоксазолонных антител из малой статистической комбинаторной библиотеки V-генов, полученных из селезенок иммунизированных мышей. Может быть построен набор V-генов из неиммунизированных человеческих доноров и антитела к разнообразному массиву антигенов (включающему собственные антигены) может быть изолирован, следуя по существу методам, описанным Marks et al., J. Mol. Biol. 222:581-597 (1991), или Griffith et al., EMBO J. 12:725-734 (1993). См. также патенты США № 5565332 и 5573905. Дополнительно, может применяться технология отображения дрожжей для получения человеческих антител против C1q и фрагментов антител *in vitro* (например, WO 2009/036379; WO 2010/105256; WO 2012/009568; US 2009/0181855; US 2010/0056386; и Feldhaus and Siegel (2004) J. Immunological Methods 290:69-80). В других вариантах осуществления, технология отображения рибосом может применяться для получения человеческих антител против C1q и фрагментов антител *in vitro* (например, Roberts and Szostak (1997) Proc. Natl. Acad. Sci. 94:12297-12302; Schaffitzel et al. (1999) J. Immunological Methods 231:119-135; Lipovsek and Plückthun (2004) J. Immunological Methods 290:51-67).

Технологии Cole et al., и Voerner et al., также являются доступными для получения человеческих моноклональных антител против C1q (Cole et al., Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, p. 77 (1985) и Voerner et al., J. Immunol. 147(1): 86-95 (1991). Аналогично, человеческие антитела против C1q могут быть получены посредством введения локусов человеческих иммуноглобулинов в трансгенных животных, например мышей, у которых гены эндогенных иммуноглобулинов были частично или полностью инактивированы. При стимуляции наблюдают выработку человеческих антител, которая близко совпадает с наблюдаемой выработкой у людей во всех отношениях, включая перестройку генов, сборку и набор антител. Этот подход описан, например, в патентах США №№ 5545807; 5545806; 5569825; 5625126; 5633425; 5661016 и в следующих научных публикациях: Marks et al., Bio/Technology

10: 779-783 (1992); Lonberg et al., Nature 368: 856-859 (1994); Morrison, Nature 368: 812-13 (1994), Fishwild et al., Nature Biotechnology 14: 845-51 (1996), Neuberger, Nature Biotechnology 14: 826 (1996) и Lonberg и Huszar, Intern. Rev. Immunol. 13: 65-93 (1995).

Наконец, человеческие антитела против C1q могут также генерироваться *in vitro* активированными В-клетками (см. патенты США № 5567610 и 5229275).

(5) Фрагменты антител.

В некоторых вариантах осуществления существуют преимущества применения фрагментов антитела против C1q, в большей степени, чем цельных антител против C1q. Более мелкие размеры фрагментов обеспечивают быстрое выведение.

Различные технологии были разработаны для получения фрагментов антител. Традиционно, эти фрагменты производили посредством протеолитического расщепления интактных антител (см., например, Morimoto et al., J. Biochem. Biophys. Method. 24:107-117 (1992); и Brennan et al., Science 229:81 (1985)). Однако эти фрагменты теперь могут быть получены непосредственно посредством рекомбинантных клеток-хозяев, например, с использованием нуклеиновых кислот, кодирующих антитела против C1q настоящего раскрытия. Фрагменты антител Fab, Fv и scFv могут все экспрессироваться, секретироваться из *E.coli*, таким образом, позволяя проводить прямое получение больших количеств этих фрагментов. Фрагменты антитела против C1q могут также быть выделены из фаговых библиотек антитела, как обсуждается выше. Альтернативно, фрагменты Fab'-SH могут быть непосредственно извлечены из *E.coli* и химически сочетаться с образованием фрагментов F(ab')₂ (Carter et al., Bio/Technology 10:163-167 (1992)). В соответствии с еще одним подходом, фрагменты F(ab')₂ могут быть выделены напрямую из культуры рекомбинантных клеток-хозяев. Получение фрагментов антител Fab и F(ab')₂ с увеличенным временем полужизни *in vivo* описаны в патенте США № 5869046. В других вариантах осуществления, антитело выбора представляет собой одноцепочечный фрагмент Fv (scFv). См. WO 93/16185; патент США № 5571894 и патент США № 5587458. Фрагмент антитела против C1q, против C1g или против C1q может также представлять собой "линейное антитело", например, как описано в патенте США 5641870. Такие линейные фрагменты антител могут быть моноспецифическими или биспецифическими.

(6) Биспецифические и полиспецифические антитела.

Биспецифические антитела (BsAbs) представляют собой антитела, которые обладают специфичностями связывания по меньшей мере для двух различных эпитопов, включая эпитопы на одном и том же или еще одном белке (например, один или несколько белков C1q настоящего раскрытия). Альтернативно, одна часть BsAb может иметь плечо для связывания с целевым антигеном C1q, и еще одна другая часть может комбинироваться с плечом, которое связывается со вторым белком. Такие антитела могут быть произведены из непроцессированных антител или фрагментов антител (например, биспецифических антител F(ab')₂).

Способы получения биспецифических антител известны в данной области. Традиционное получение непроцессированных биспецифических антител основано на коэкспрессии двух пар - тяжелая цепь/легкая цепь иммуноглобулина, где две цепи имеют различные специфичности. Millstein et al., Nature, 305:537-539 (1983). Вследствие случайного распределения тяжелых и легких цепей иммуноглобулинов эти гибридомы (квадромы) продуцируют потенциальную смесь из 10 различных молекул антител, из которых только одна имеет корректную биспецифическую структуру. Очистка корректной молекулы, которую обычно проводят посредством стадий аффинной хроматографии, является достаточно затруднительной, и выходы продукты являются низкими. Аналогичные методики раскрыты в WO 93/08829 и в Traunecker et al., EMBO J., 10:3655-3659 (1991).

В соответствии с отличным подходом переменные домены антитела с желательными специфичностями связывания (участками комбинирования антитело-антиген) гибридизируют с последовательностями константных доменов иммуноглобулина. Гибридизация может проводиться с константным доменом тяжелой цепи иммуноглобулина, содержащим по меньшей мере часть шарнирных, C_H2 и C_H3 областей. В нескольких вариантах осуществления, константная область первой тяжелой цепи (C_H1), содержащая участок, необходимый для связывания легкой цепи, присутствует в по меньшей мере одном из гибридов. ДНК, кодирующие гибриды тяжелой цепи иммуноглобулина и, если желательно, легкой цепи иммуноглобулина, вводят в отдельные векторы экспрессии, и котрансфицируют в подходящий организм-хозяин. Данный подход предоставляет высокую гибкость при подборке взаимных долей трех полипептидных фрагментов в вариантах осуществления, когда неравные отношения трех полипептидных цепей, применяемых в конструкции, обеспечивают оптимальные выходы. Однако является возможным вводить кодирующие последовательности для двух или всех трех полипептидных цепей в один вектор экспрессии, когда экспрессия по меньшей мере двух полипептидных цепей в равных отношениях приводит к высоким выходам, или, когда отношения не имеют конкретного значения.

В нескольких вариантах осуществления данного подхода, биспецифические антитела составлены из тяжелой цепи гибридного иммуноглобулина с первой специфичностью связывания в одном плече, и пары тяжелой цепь-легкая цепь гибридного иммуноглобулина (обеспечивающей вторую специфичность связывания) в другом плече. Было обнаружено, что эта асимметричная структура способствует отделению желательного биспецифического соединения от нежелательных комбинаций цепей иммуноглобули-

на, так как присутствие легкой цепи иммуноглобулина только в половине биспецифических молекул обеспечивает простой путь разделения. Этот подход раскрыт в WO 94/04690. Дополнительные подробности генерирования биспецифических антител, см., например, Suresh et al., *Methods in Enzymology* 121: 210 (1986).

В соответствии с еще одним другим подходом, описанным в WO 96/27011 или патенте США № 5731168, область контакта между парой молекул антител может быть сконструирована, чтобы максимизировать процентное содержание гетеродимеров, которые извлекают из культуры рекомбинантных клеток. Область контакта может содержать по меньшей мере часть области C_H3 константного домена антитела. В этом методе одну или несколько малых аминокислотных боковых цепей из области контакта первой молекулы антитела заменяют на более крупные боковые цепи (например, тирозиновые или триптофановые). Компенсаторные "полости" идентичного или сходного размера с крупными боковыми цепью(цепями) создают на поверхности контакта второй молекулы антитела посредством замены крупных аминокислотных боковых цепей на более мелкие такие цепи (например, аланиновые или треониновые). Это предоставляет механизм для увеличения выхода гетеродимера по сравнению с другими нежелательными конечными продуктами, такими как гомодимеры.

Технологии генерации биспецифических антител из фрагментов антител был описан в литературе. Например, биспецифические антитела могут быть получены, с использованием химического связывания. Brennan et al., *Science* 229:81 (1985) описывают методику, в которой интактные антитела протеолитически расщепляют для генерации фрагментов F(ab')₂. Эти фрагменты восстанавливают в присутствии дитиолового комплексообразователя арсенита натрия, чтобы стабилизировать вицинальные дитиолы и предотвратить образование межмолекулярного дисульфида.

Генерируемые фрагменты Fab' затем преобразуют в тионитробензоатные (TNB) производные. Одно из Fab'-TNB производных затем повторно преобразуют в Fab'-TNB производное для образования биспецифического антитела. Полученные биспецифические антитела могут применяться в качестве средств для селективной иммобилизации ферментов.

Фрагменты Fab' могут быть непосредственно извлечены из *E. coli* и химически сочетаться с образованием биспецифических антител. Shalaby et al., *J. Exp. Med.* 175: 217-225 (1992) описывает получение молекул полностью гуманизированного биспецифического антитела F(ab')₂. Каждый фрагмент Fab' раздельно секретировался из *E. coli* и подвергался направленному химическому сочетанию *in vitro* для образования биспецифического антитела. Биспецифическое антитело, образованное таким образом, обладало способностью связываться с клетками, сверхэкспрессирующими рецептор ErbB2, и нормальными человеческими Т-клетками, а также запускать литическую активность человеческих цитотоксических лимфоцитов против мишеней человеческой опухоли молочной железы.

Были также описаны различные методы получения и изолирования бивалентных фрагментов антител непосредственно из культуры рекомбинантных клеток. Например, бивалентные гетеродимеры были получены с использованием лейциновых застёжек. Kostelny et al., *J. Immunol.*, 148(5):1547-1553 (1992). Пептиды с лейциновыми застёжками из белков Fos и Jun связывали с Fab' частями двух различных антител посредством слияния генов. Гомодимеры антитела восстанавливали в шарнирной области с образованием мономеров и затем повторно окисляли с образованием гетеродимеров антитела. Технология "дитела", описанная Hollinger et al., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA*, 90: 6444-6448 (1993) обеспечила альтернативный механизм для получения биспецифических/бивалентных фрагментов антитела. Фрагменты содержат вариабельный домен тяжелой цепи (V_H), соединенный с вариабельным доменом легкой цепи (V_L) посредством линкера, который является слишком коротким, чтобы обеспечить образование пары между двумя доменами на той же цепи. Соответственно, домены V_H и V_L одного фрагмента принуждают образовывать пару с комплементарными доменами V_L и V_H одного другого фрагмента, таким образом образуя два антигенсвязывающих участка. Еще одна другая стратегия для получения биспецифических/бивалентных фрагментов антитела посредством применения одноцепочечных Fv (sFv) димеров также была изложена. См. Gruber et al., *J. Immunol.*, 152:5368 (1994).

Предусмотрены антитела с более чем двумя валентностями. Например, могут быть получены триспецифические антитела. Tutt et al., *J. Immunol.* 147:60 (1991).

Иллюстративные биспецифические антитела могут связываться с двумя различными антигенами. В нескольких вариантах осуществления биспецифическое антитело связывается с первым антигеном, C1q, и вторым антигеном способствующим прохождению через гематоэнцефалический барьер. В данной области известны многочисленные антигены, которые способствуют прохождению через гематоэнцефалический барьер (см., например, Gabathuler R., *Approaches to transport therapeutic drugs across blood-brain barrier to treat brain diseases, Neurobiol. Dis.* 37 (2010) 48-57). Такие вторые антигены включают, без ограничения, трансферриновый рецептор (TR), инсулиновый рецептор (HIR), рецептор инсулин-подобного фактора роста (IGFR), белки 1 и 2, относящиеся к рецепторам липопротеинов низкой плотности (LPR-1 и 2), рецептор дифтерийного токсина, включающий CRM197 (нетоксический мутант дифтерийного токсина), антитела ламы с единственным доменом, такие как TMEM 30(A) (Flippase), домены белковой трансдукции, такие как TAT, Syn-B, или пенетратин, поли-аргинин или в целом положительно заряженные пептиды, и ангиопептиды, такие как ANG1005 (см., например, Gabathuler, 2010).

(7) Мультивалентные антитела.

Мультивалентное антитело может быть интернализировано (и/или катаболизировано) быстрее, чем бивалентное антитело клеткой, экспрессирующей антиген, с которым связываются антитела. Антитела против C1q настоящего раскрытия или их фрагменты антител могут представлять собой мультивалентные антитела (которые отличаются от класса IgM) с тремя или более антигенсвязывающими участками (например, тетравалентные антитела), которые могут легко продуцироваться посредством рекомбинантной экспрессии нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептидные цепи антитела. Мультивалентное антитело может содержать домен димеризации и три или более антигенсвязывающих участков. В нескольких вариантах осуществления, домен димеризации содержит область Fc или шарнирную области. В такой ситуации антитело будет содержать область Fc и три или более антигенсвязывающих участков, аминоконцевые к области Fc. В нескольких вариантах осуществления, мультивалентное антитело в данном документе содержит от трех до приблизительно восьми, и в нескольких вариантах осуществления, четыре антигенсвязывающих участка. Мультивалентное антитело содержит по меньшей мере одну полипептидную цепь (а в нескольких вариантах осуществления две полипептидных цепи), где полипептидная цепь или цепи содержат два или более переменных домена. Например, полипептид цепь или цепи могут содержать VD1-(X1)n-VD2-(X2)n-Fc, где VD1 представляет собой первый переменный домен, VD2 представляет собой второй переменный домен, Fc представляет собой одну полипептидную цепь области Fc, X1 и X2 представляют аминокислоту или полипептид, и n равно 0 или 1. Аналогично, полипептидная цепь или цепи могут содержать цепь V_H-C_H1-гибкий линкер-V_H-C_H1-область Fc; или цепь V_H-C_H1-V_H-C_H1-область Fc. Мультивалентное антитело в данном описании может дополнительно содержать по меньшей мере два (а в нескольких вариантах осуществления четыре) полипептидов переменного домена легкой цепи. Мультивалентное антитело в данном описании может, например, содержать от приблизительно двух до приблизительно восьми полипептидов переменного домена легкой цепи. Полипептиды переменного домена легкой цепи, предусмотренные здесь, содержат переменный домен легкой цепи и, необязательно, дополнительно содержат CL домен.

(8) Гетероконъюгатные антитела.

Гетероконъюгатные антитела также включены в объем настоящего раскрытия. Гетероконъюгатные антитела составлены из двух ковалентно соединенных антител (например, антител против C1q настоящего раскрытия или фрагментов этих антител). Например, одно из антител в гетероконъюгате может быть сочетано с авидином, другое с биотином. Такие антитела были, например, предложены для нацеливания клеток иммунной системы на нежелательные клетки, Патент США № 4676980, и применялись для лечения ВИЧ-инфекции. Международные Публикации № WO 91/00360, WO 92/200373 и EP 0308936. Предусматривают, что антитела могут быть получены *in vitro* с использованием известных способов в синтетической химии белка, включающих способы, в которых применяют сшивающие агенты. Например, иммунотоксины могут быть построены с использованием реакции дисульфидного обмена или посредством образования тиоэфирной связи. Примеры подходящих реагентов для данной цели включают иминотиолат и метил-4-меркаптобутиримидат и реагенты, раскрытые, например, в патенте США № 4676980. Гетероконъюгатные антитела могут быть получены с использованием любых удобных методов сшивки. Подходящие сшивающие агенты хорошо известны в данной области, и раскрыты в патенте США № 4676980, вместе с рядом методов сшивки.

(9) Конструирование эффекторной функции.

Желательным также может быть модифицировать антитело против C1q настоящего раскрытия, чтобы модифицировать эффекторную функцию антитела и/или увеличить его время полужизни в сыворотке. Например, участок связывания Fc-рецептора на константной области может быть модифицирован или подвергнут мутации, чтобы удалить или снизить аффинность связывания с некоторыми Fc-рецепторами, такими как FcγRI, FcγRII и/или FcγRIII. В нескольких вариантах осуществления, эффекторная функция ослабляется при удалении N-гликозилирования области Fc (например, в CH 2 домене IgG) антитела. В нескольких вариантах осуществления, эффекторная функция ослабляется посредством модификации областей, таких как 233-236, 297 и/или 327-331 человеческих IgG, как описано в PCT WO 99/58572 и Armour et al., *Molecular Immunology* 40: 585-593 (2003); Reddy et al., *J. Immunology* 164:1925-1933 (2000).

Константная область против-комплементных антител, описанных в данном документе, может также быть модифицирована, чтобы ослабить активацию комплемента. Например, комплементная активация IgG антител после связывания компонента C1 комплемента может быть снижена посредством мутации аминокислотных остатков в константной области в C1-связывающем мотиве (например, C1q-связывающем мотиве). Сообщалось, что мутация Ala для каждого из D270, K322, P329, P331 человеческого IgG1 значительно снижает способность антитела связываться с C1q и активировать комплемент. Для мышиного IgG2b, C1q-связывающий мотив составляет остатки E318, K320, и K322. Idusogie et al. (2000) *J. Immunology* 164:4178-4184; Duncan et al. (1988) *Nature* 322: 738-740. Так как C1s-связывающий мотив E318, K320, и K322, идентифицированный для мышиного IgG2b предполагается общим для других изотипов антитела (Duncan et al. (1988) *Nature* 322:738-740), C1q-связывающая активность для IgG2b может быть отменена при замене любого одного из трех установленных остатков на остаток, имеющий несоответствующую функциональность в его боковой цепи. Не является необходимым заменять ионные

остатки только на Ala для отмены C1q-связывания. Также возможно применять другие алкил-замещенные неионные остатки, такие как Gly, Ile, Leu или Val, или такие ароматические неполярные остатки, как Phe, Tyr, Trp и Pro вместо любого одного из трех остатков, чтобы отменить C1q-связывание. В дополнение, также возможно использовать такие полярные неионные остатки как Ser, Thr, Cys, и Met вместо остатков 320 и 322, но не 318, чтобы отменить C1s-связывающую активность. Дополнительно, удаление углеводных модификаций области Fc необходимо, чтобы связывание комплемента могло предотвратить активацию комплемента. Гликозилирование консервативного аспарагина (Asn-297) на CH2 домене тяжелых цепей IgG является существенным для эффекторных функций антитела (Jefferis et al. (1998) *Immunol Rev* 163:59-76). Модификация гликана Fc изменяет конформацию IgG и снижает аффинность Fc для связывания комплементного белка C1q и эффекторного клеточного рецептора FcR (Alhorn et al. (2008) *PLoS ONE* 2008; 3: e1413). Полное удаление гликана Fc отменяет CDC и ADCC. Дегликозилирование может выполняться с использованием гликозидазных ферментов, например эндогликозидазы S (EndoS), 108 кДа фермента, кодируемого геном *endoS Streptococcus pyogenes*, который селективно расщепляет аспарагин-связанные гликаны на тяжелой цепи всех подклассов IgG, без оказания действия на другие классы иммуноглобулинов или другие гликопротеины (Collin et al. (2001) *EMBO J.* 2001;20:3046-3055).

Чтобы увеличить время полужизни в сыворотке антитела, можно ввести эпитоп связывания рецептора реутилизации в антитело (особенно, фрагмент антитела), как описано в патенте США 5739277. Как используют в данном описании, термин "эпитоп связывания рецептора реутилизации" относится к эпитопу области Fc молекулы IgG (например, IgG₁, IgG₂, IgG₃ или IgG₄), которая отвечает за увеличение времени полужизни в сыворотке *in vivo* молекулы IgG.

(10) Другие модификации аминокислотной последовательности.

Также предусматриваются модификации аминокислотных последовательностей антител против C1q настоящего раскрытия или фрагментов этих антител. Например, может быть желательным улучшить аффинность связывания и/или другие биологические свойства антител или фрагментов антител. Варианты аминокислотных последовательностей антител или фрагментов антител получают посредством введения соответствующих нуклеотидных изменений в нуклеиновую кислоту, кодирующую антитела или фрагменты антител, или посредством пептидного синтеза. Такие модификации включают, например, делеции, и/или вставки в, и/или замены остатков внутри аминокислотных последовательностей антитела. Любую комбинацию из делеции, вставки и замены проводят, чтобы продвигаться к конечной конструкции, при условии, что конечная конструкция обладает желательными характеристиками (т.е. способностью к связыванию или взаимодействовать физически с белком C1q настоящего раскрытия). Изменения аминокислот также могут менять посттрансляционные процессы антитела, такие как изменение числа или положения участков гликозилирования.

Применимый метод для идентификации некоторых остатков или областей антитела против C1q, которые являются предпочтительными местоположениями для мутагенеза, называют "сканирующей аланином мутагенез", как описано Cunningham and Wells в *Science*, 244:1081-1085 (1989). В этом методе, остаток или группу целевых остатков идентифицируют (например, заряженные остатки, такие как arg, asp, his, lys, и glu) и заменяют на нейтральную или отрицательно заряженную аминокислоту (наиболее предпочтительно, аланин или полиаланин), чтобы воздействовать на взаимодействие аминокислот с целевым антигеном. Эти расположения аминокислот, демонстрирующие функциональную чувствительность к заменам, затем уточняют посредством введения дополнительных или других вариантов на участках замены или для них. Таким образом, в то время как участок для введения вариации аминокислотной последовательности является предварительно определенным, природа мутации *per se* не нуждается в предварительном определении. Например, для анализа эффективности мутации по данному участку, аланин-сканирующий или разупорядоченный мутагенез проводят на целевых кодоне или области, и экспрессированные варианты антитела скринируют на желательную активность.

Вставки аминокислотных последовательностей включают амино- ("N") и/или карбокси- ("C") концевые гибриды в интервале длины от одного остатка до полипептидов, содержащих сто или более остатков, а также вставки внутри последовательностей из одиночных или множества аминокислотных остатков. Примеры концевых вставок включают антитело с N-концевым метионильным остатком или антитело, гибридное с цитотоксическим полипептидом. Другие варианты вставок в молекулу антитела включают гибридизацию по N- или C-концом антитела с ферментом или полипептидом, который увеличивает время полужизни в сыворотке антитела.

Еще одним другим типом варианта является вариант аминокислотной замены. Эти варианты имеют по меньшей мере один аминокислотный остаток в молекуле антитела, замененный на отличающийся остаток. Участки, представляющие наибольший интерес, для заместительного мутагенеза, включают гипервариабельные области, но также предусматриваются изменения FR. Консервативные замены показаны в табл. А ниже под заголовком "предпочтительные замены". Если такие замены приводят к изменению биологической активности, тогда больше существенных изменений, обозначенных как "иллюстративные замены" в табл. А, или, как дополнительно описано ниже при ссылке на классы аминокислот, может быть введено, и получено больше продуктов, для скрининга.

Таблица А. Аминокислотные замены

Исходный остаток	Иллюстративные замены	Предпочтительные замены
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; норлейцин	Leu
Leu (L)	норлейцин; 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; норлейцин	leu

Существенные модификации биологических свойств антитела осуществляют посредством выбора замен, которые значительно отличаются по их воздействию на поддержание: (а) структуры полипептидного скелета в области замены, например, в виде листа или спиральной конформации, (b) заряда или гидрофобности молекулы на целевом участке или (c) объем боковой цепи. Природные остатки разделяют на группы, на основании общих свойств боковых цепей:

- (1) гидрофобные: норлейцин, met, ala, val, leu, ile;
- (2) нейтральные гидрофильные: cys, ser, thr;
- (3) кислые: asp, glu;
- (4) основные: asn, gln, his, lys, arg;
- (5) остатки, которые влияют на ориентацию цепи: gly, pro; и
- (6) ароматические: trp, tyr, phe.

Неконсервативные замены вызывают обмен элемента одного из этих классов на другой класс.

Любой цистеиновый остаток, не вовлеченный в поддержание должной конформации антитела, также может быть заменен, обычно на серин, для улучшения окислительной стабильности молекулы и предотвращения aberrантной сшивки. Напротив, цистеиновая связь (связи) может быть добавлена к антителу для улучшения его стабильности (конкретно, где антитело представляет собой фрагмент антитела, такой как фрагмент Fv).

В нескольких вариантах осуществления, заменяющий вариант включает в себя замену одного или нескольких остатков гипервариабельной области родительского антитела (например, гуманизированного или человеческого антитела против C1q). Как правило, полученные в результате вариант(ы), выбранные для дополнительной разработки, будут иметь улучшенные биологические свойства относительно родительского антитела, из которого они генерируются. Удобный путь для генерации таких заменяющих вариантов включает в себя созревание аффинности с использованием фагового отображения. Вкратце, некоторые участки гипервариабельной области (например, 6-7 участков) подвергаются мутации для генерации всех возможных аминокислотных замен на каждом участке. Варианты антитела, таким образом генерируемые, отображают моновалентным образом из нитевидных частиц фагов в виде гибридов с продуктом гена III M13, упакованного внутри каждой частицы. Фаг-отображенные варианты затем подвергаются скринингу на их биологическую активность (например, аффинность связывания), как раскрыто в данном документе. Чтобы идентифицировать кандидатные участки гипервариабельной области для модификации, аланин-

сканирующий мутагенез может выполняться для идентификации остатков гипервариабельной области, значительно способствующих связыванию с антиген. Альтернативно, или дополнительно, может быть благоприятно анализировать кристаллическую структуру комплекса антиген-антитело, чтобы идентифицировать точки контакта между антителом и антигеном (например, белок C1q настоящего раскрытия). Такие контактные остатки и соседние остатки являются кандидатами для замены в соответствии со способами, разработанными в данном документе. Как только такие варианты генерируют, панель вариантов подвергают скринингу, как описано в данном документе, и антитела с превосходными свойствами в одном или нескольких соответствующих аналитических тестах могут быть отобраны для дополнительной разработки.

В еще одном другом типе аминокислотного варианта антитела изменяют исходную матрицу гликозилирования антитела. Под изменением подразумевают делецию одного или несколько углеводных фрагментов, обнаруженных в антителе, и/или добавление одного или нескольких участков гликозилирования, которые не присутствуют в антителе.

Гликозилирование антител обычно является либо N-связанным или O-связанным. N-связанное относится к присоединению углеводного фрагмента к боковой цепи аспарагинового остатка. Трипептидные последовательности аспарагин-X-серин и аспарагин-X-треонин, где X является любой аминокислотой за исключением пролина, являются последовательностями распознавания для ферментативного присоединения углеводного фрагмента к аспарагиновой боковой цепи. Таким образом, присутствие любой из этих трипептидных последовательностей в полипептиде создает потенциальный участок гликозилирования. O-связанное гликозилирование относится к присоединению одного из сахаров, N-ацетилгалактозамина, галактозы или ксилозы к гидроксикарбонильной группе, наиболее часто серину или треонину, несмотря на то что могут также использоваться 5-гидроксипролин или 5-гидроксиллизин.

Присоединение участков гликозилирования к антителу удобным образом выполняют посредством изменения аминокислотной последовательности, таким образом, что она содержит одну или несколько из вышеописанных трипептидных последовательностей (для N-связанных участков гликозилирования). Изменение может также проводиться посредством присоединения, одного или нескольких остатков серина или треонина к последовательности исходного антитела или замены на них (для O-связанных участков гликозилирования).

Молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие варианты аминокислотных последовательностей антитела против IgE, получают различными способами, известными в данной области. Эти способы включают, но не ограничены перечисленными, выделение из природного источника (в случае природных вариантов аминокислотной последовательности), или получение посредством олигонуклеотид-опосредованного (или сайт-направленного) мутагенеза, мутагенеза ПЦР и кассетного мутагенеза более ранее полученной вариантной или невариантной версии антител (например, антитела против C1q настоящего раскрытия) или фрагментов антитела.

(11) Другие модификации антитела.

Антитела против C1q настоящего раскрытия, или фрагменты этих антител могут быть дополнительно модифицированы, чтобы содержать дополнительные небелковые фрагменты, которые известны в данной области и являются легкодоступными. В нескольких вариантах осуществления, фрагменты, подходящие для дериватизации антитела, представляют собой водорастворимые полимеры. Неограничивающие примеры водорастворимых полимеров включают, но не ограничены перечисленным, полиэтиленгликоль (ПЭГ), сополимеры этиленгликоля/пропиленгликоля, карбоксиметилцеллюлозу, декстран, поливинилловый спирт, поливинилпирролидон, поли-1,3-диоксолан, поли-1,3,6-триоксан, сополимер этилен/малеиновый ангидрид, полиаминокислоты (либо гомополимеры или статистические сополимеры) и декстран или поли(н-винил пирролидон)полиэтиленгликоль, гомополимеры полипропиленгликоля, сополимеры пропиленоксида/этиленоксида, полиоксиэтилированные полиолы (например, глицерин), поливинилловый спирт и их смеси. Пропиональдегид полиэтиленгликоля может иметь преимущества при производстве вследствие его устойчивости в воде. Полимер может иметь любую молекулярную массу и может быть разветвленным или неразветвленным. Число полимеров, присоединенных к антителу, может варьироваться, и, если присоединено более одного полимера, полимеры могут представлять собой одинаковые или различные молекулы. Как правило, число и/или тип полимеров, используемых для дериватизации, может определяться на основе учета факторов включающих, но не ограниченных ими, конкретные свойства или функции антитела, подлежащие улучшению, если производное антитела будет применяться в терапии при определенных условиях, и т.д. Такие методы и другие подходящие лекарственные формы раскрыты в Remington: Science and Practice of Pharmacy, 20th Ed., Alfonso Gennaro, Ed., Philadelphia College of Pharmacy and Science (2000).

Нуклеиновые кислоты, векторы и клетки-хозяева.

Антитела против C1q настоящего раскрытия могут быть получены с применением рекомбинантных методов и композиций, например, как описано в патенте США № 4816567. В нескольких вариантах осуществления, предоставлены изолированные нуклеиновые кислоты, имеющие нуклеотидную последовательность, кодирующую любые антитела против C1q настоящего раскрытия. Такие нуклеиновые кислоты могут кодировать аминокислотную последовательность, содержащую VL и/или аминокислотную по-

следовательность, содержащую VN антитела против C1q (например, легкие и/или тяжелые цепи антитела). В нескольких вариантах осуществления, предоставлены один или несколько векторов (например, векторов экспрессии), содержащие такие нуклеиновые кислоты. В нескольких вариантах осуществления, также предоставлена клетка-хозяин, содержащая такую нуклеиновую кислоту. В нескольких вариантах осуществления, клетка-хозяин содержит (например, была им трансдуцирована): (1) вектор, содержащий нуклеиновую кислоту, которая кодирует аминокислотную последовательность, содержащую VL антитела, и аминокислотную последовательность, содержащую VN антитела, или (2) первый вектор, содержащий нуклеиновую кислоту, которая кодирует аминокислотную последовательность, содержащую VL антитела, и второй вектор, содержащий нуклеиновую кислоту, которая кодирует аминокислотную последовательность, содержащую VN антитела. В нескольких вариантах осуществления, клетка-хозяин является эукариотной, например клеткой яичника китайского хомяка (CHO) или лимфоидной клеткой (например, YO, NS0, клеткой Sp20).

Предоставлены способы получения антитела против C1q настоящего раскрытия. В нескольких вариантах осуществления, способ включает культивирование клетки-хозяина настоящего раскрытия, содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую антитело против C1q, в условиях, подходящих для экспрессии антитела. В нескольких вариантах осуществления, антитело в последующем извлекают из клетки-хозяина (или культуральной среды клетки-хозяина). См. также пример 1.

Для рекомбинантного продуцирования антитела против C1q настоящего раскрытия, нуклеиновую кислоту, кодирующую антитело против C1q, изолируют и вводят в один или несколько векторов для дальнейшего клонирования и/или экспрессии в клетке-хозяине. Такую нуклеиновую кислоту можно легко изолировать и секвенировать с использованием общепринятых методик (например, посредством использования олигонуклеотидных зондов, которые обладают способностью специфически связываться с генами, кодирующими тяжелые и легкие цепи антитела).

Подходящие векторы, содержащие последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую любое из антител против C1q настоящего раскрытия, или их фрагментные полипептиды (включая антитела), описанные в данном документе, включают, без ограничения, векторы клонирования и векторы экспрессии. Подходящие векторы клонирования могут быть построены в соответствии со стандартными методами, или могут быть выбраны из большого числа векторов клонирования, доступных в области. В то время как отобранный вектор клонирования может видоизменяться в соответствии с клеткой-хозяином, предназначенной для использования, применимые векторы клонирования, как правило, имеют способность к саморепликации, могут обладать единственной мишенью для конкретной рестрикционной эндонуклеазы, и/или могут нести гены для маркера, который может применяться при селекции клонов, содержащих вектор. Подходящие примеры включают плазмиды и бактериальные вирусы, например pUC18, pUC19, Bluescript (например, pBS SK+) и его производные, mpl8, mpl9, pBR322, pMB9, ColE1, PCR1, RP4, фаговые ДНК, и челночные векторы, такие как pSA3 и pAT28. Эти и многие другие векторы клонирования являются доступными от промышленных поставщиков, таких как BioRad, Strategene и Invitrogen.

Векторы экспрессии, как правило, представляют собой реплицируемые полинуклеотидные конструкции, которые содержат нуклеиновую кислоту настоящего раскрытия. Вектор экспрессии может быть реплицируемым в клетках-хозяевах либо в виде эписом или как интегральная часть хромосомальной ДНК. Подходящие векторы экспрессии включают, но не ограничены перечисленным, плазмиды, вирусные векторы, включающие аденовирусы, адено-ассоциированные вирусы, ретровирусы, космиды и вектор(ы) экспрессии, раскрытые в публикации PCT № WO 87/04462. Векторные компоненты могут обычно включать, но не ограничены перечисленным, одно или несколько из следующих: сигнальную последовательность; точку начала репликации; один или несколько маркерных генов; подходящие элементы контроля транскрипции (такие как промоторы, энхансеры и терминатор). Для экспрессии (т.е. трансляции), также обычно требуются один или несколько элементов контроля трансляции, такие как участки связывания рибосом, участки инициации трансляции и терминирующие кодоны.

Векторы, содержащие нуклеиновые кислоты, представляющие интерес, могут быть введены в клетку-хозяина посредством любого из ряда соответствующих средств, включающих электропорацию, трансфекцию с использованием хлорида кальция, хлорида рубидия, фосфата кальция, DEAE-декстрана или других веществ; бомбардировку микрочастицами; липофекцию; и инфекцию (например, где вектор является возбудителем инфекции, такой как вирус коровьей оспы). Выбор вводимых векторов или полинуклеотидов будет часто зависеть от признаков клетки-хозяина. В нескольких вариантах осуществления, вектор содержит нуклеиновую кислоту, содержащую одну или несколько аминокислотных последовательностей, кодирующих антитело против C1q настоящего раскрытия.

Подходящие клетки-хозяева для клонирования или экспрессии векторов, кодирующих антитело, включают прокариотные или эукариотные клетки. Например, антитела против C1q настоящего раскрытия могут быть продуцированы в бактериях, в частности, когда гликозилирование и Fc-эффекторная функция не являются необходимыми. По экспрессии фрагментов антител и полипептидов в бактериях (например, патенты США № 5648237, 5789199, и 5840523; и Charlton, *Methods in Molecular Biology*, Vol. 248 (B.K.C. Lo, ed., Human Press, Totowa, NJ, 2003), pp. 245-254, описывающих экспрессию фрагментов

антител в *E.coli*). После экспрессии антитело может быть изолировано из пасты бактериальных клеток в растворимой фракции и может быть дополнительно очищено.

В дополнение к прокариотам эукариотные микроорганизмы, такие как мицелиальные грибы или дрожжи, также являются подходящими в качестве клонирующих или экспрессирующих хозяев для векторов, кодирующих антитело, включая штаммы грибов и дрожжей, чьи пути гликозилирования были "гуманизированы", что приводило в результате к продуцированию антитела с частично или полностью человеческой матрицей гликозилирования (например, Gerngross, *Nat. Biotech.* 22:1409-1414 (2004); и Li et al., *Nat. Biotech.* 24:210-215 (2006)).

Подходящие клетки-хозяева для экспрессии гликозилированного антитела могут также быть получены из многоклеточных организмов (беспозвоночных и позвоночных). Примеры клеток беспозвоночных включают клетки растений и насекомых. Были идентифицированы многочисленные бакуловирусные штаммы, которые могут применяться в совокупности с клетками насекомых, конкретно для трансфекции клеток *Spodoptera frugiperda*. Культуры растительных клеток могут также использоваться в качестве хозяев (например, патенты США № 5959177; 6040498; 6420548; 7125978 и 6417429 описывающие технологию PLANTIBODIES™ для продуцирования антител в трансгенных растениях).

Клетки позвоночных могут также применяться в качестве хозяев. Например, могут быть применены линии клеток млекопитающих, которые являются приспособленными для роста в суспензии. Другие примеры применимых линий клеток-хозяев млекопитающих представляют собой линию CV1 клеток почки обезьяны, трансформированную SV40 (COS-7); человеческую эмбриональную линию клеток почки (293 или 293 клетки, как описано, например, in Graham et al., *J. Gen Virol.* 36:59 (1977)); клетки почки детенышей хомяка (ВНК); мышинные клетки Сертоли (ТМ4 клетки, как описано, например, в Mather, *Biol. Reprod.* 23:243-251 (1980)); клетки почки обезьяны (CV1); клетки почки Африканской зеленой обезьяны (VERO-76); человеческие клетки карциномы шейки матки (HELA); клетки почки собаки (MDCK); клетки печени крыс линии Буффало (BRL 3A); клетки легкого человека (W138); клетки печени человека (Hep G2); мышинные клетки опухоли молочной железы (MMT 060562); клетки TRI, как описано, например, в Mather et al., *Annals N.Y. Acad. Sci.* 383:44-68 (1982); клетки MRC 5; и клетки FS4. Другие применимые линии клеток-хозяев млекопитающих включают клетки яичника китайского хомяка (CHO), включающие клетки DHFR-CHO (Urlaub et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4216 (1980)); и клеточные линии шелкомоты, такие как Y0, NS0 и Sp2/0. Обзор некоторых линий клеток-хозяев млекопитающих, подходящих для продуцирования антитела, см., например, Yazaki and Wu, *Methods in Molecular Biology*, Vol. 248 (B.K.C. Lo, ed., Human Press, Totowa, NJ), pp. 255-268 (2003).

Фармацевтические композиции.

Антитела против С1q настоящего раскрытия могут вводиться в различные лекарственные формы для терапевтического применения (например, посредством введения) или при производстве лекарственного средства (например, для лечения или предотвращения нейродегенеративного заболевания или аутоиммунного заболевания) посредством комбинирования антител с соответствующими фармацевтически приемлемыми носителями или разбавителями, и могут быть составлены в препараты в твердых, полутвердых, жидких или газообразных формах. Примеры таких лекарственных форм включают, без ограничения, таблетки, капсулы, порошки, гранулы, мази, растворы, суппозитории, инъекции, средства для ингаляции, гели, микросферы и аэрозоли. Фармацевтические композиции могут включать, в зависимости от лекарственной формы, желательные, фармацевтически приемлемые, нетоксические носители или разбавители, которые являются средами, обычно используемыми для составления фармацевтических композиций для введения животным или людям. Разбавитель выбирают таким образом, чтобы он не оказывал воздействия на биологическую активность комбинации. Примеры таких разбавителей включают, без ограничения, дистиллированную воду, забуференную воду, физиологический раствор, PBS, раствор Рингера, раствор декстрозы, и раствор Хэнкса. Фармацевтическая композиция или лекарственная форма настоящего раскрытия может дополнительно включать другие носители, адъюванты или нетоксические, нетерапевтические, неиммуногенные стабилизаторы, эксципиенты и т.п. Композиции могут также включать дополнительные вещества для аппроксимации физиологических условий, такие как регулирующие рН и забуферивающие средства, средства, регулирующие токсичность, увлажняющие средства и детергенты.

Фармацевтическая композиция настоящего раскрытия может также включать любой из разнообразных стабилизаторов, таких как, например, антиоксидант. Когда фармацевтическая композиция включает полипептид, полипептид может находиться в виде комплексов с различными хорошо известными соединениями, которые увеличивают стабильность полипептида *in vivo*, или иным образом усиливают его фармакологические свойства (например, увеличивают время полужизни полипептида, снижают его токсичность и увеличивают растворимость или захват). Примеры таких модификаций или комплексобразующих средств включают, без ограничения, сульфат, глюконат, цитрат и фосфат. Полипептиды композиции могут также находиться в виде комплексов с молекулами, которые увеличивают их показатели *in vivo*. Такие молекулы включают, без ограничения, углеводы, полиамины, аминокислоты, другие пептиды, ионы (например, натрия, калия, кальция, магния, марганца) и липиды.

Дополнительные примеры лекарственных форм, которые являются подходящими для различных типов введения, можно найти в Remington's *Pharmaceutical Sciences*, Mace Publishing Company, Philadel-

phia, PA, 17th ed. (1985). В качестве короткого обзора методов доставки лекарственных средств, см., Langer, Science 249:1527-1533 (1990).

Для перорального введения, активный ингредиент может вводиться в твердых дозированных формах, таких как капсулы, таблетки и порошки, или в жидких дозированных формах, таких как эликсиры, сиропы и суспензии. Активные компонент(ы) могут быть инкапсулированы в желатиновые капсулы вместе с неактивными ингредиентами и порошкообразными носителями, такими как глюкоза, лактоза, сахароза, маннит, крахмал, целлюлоза или производные целлюлозы, стеарат магния, стеариновая кислота, сахарин натрия, тальк, карбонат магния. Примерами дополнительных неактивных ингредиентов, которые могут добавляться для обеспечения желательных цвета, вкуса, стабильности, емкости забуферивания, дисперсии или других известных желательных признаков, являются красный оксид железа, силикагель, лаурилсульфат натрия, диоксид титана и съедобные белые чернила. Аналогичные разбавители могут применяться для получения прессованных таблеток. Как таблетки, так и капсулы могут производиться в виде продуктов с замедленным высвобождением для обеспечения непрерывного высвобождения лекарственного средства в течение периода часов. Прессованные таблетки могут быть покрыты сахаром или покрыты пленкой, чтобы маскировать любой неприятный вкус и защитить таблетку от атмосферы, или покрыты энтеросолюбильным покрытием для селективной дезинтеграции в желудочно-кишечном тракте. Жидкие дозированные формы для перорального введения могут содержать пигмент и ароматизатор для увеличения восприятия пациента.

Лекарственные формы, подходящие для парентерального введения, включают водные и неводные, изотонические стерильные инъекционные растворы, которые могут содержать антиоксиданты, буферы, бактериостатики и растворенные вещества, которые придают лекарственной форме изотоничность с кровью предназначенного реципиента и водные и неводные стерильные суспензии, которые могут включать суспендирующие средства, солюбилизаторы, загустители, стабилизаторы и консерванты.

Компоненты, применяемые для составления фармацевтических композиций, предпочтительно имеют высокую частоту и по существу не содержат потенциально вредных контаминантов (например, по меньшей мере, степень чистоты Национального Продовольствия (NF), обычно, по меньшей мере, аналитическую степень чистоты, и, более типично, по меньшей мере, фармацевтическую степень чистоты). Кроме того, композиции, предназначенные для применения *in vivo*, обычно являются стерильными. В случае, если данное соединение должно быть синтезировано перед применением, полученный в результате продукт в типичном случае не содержит по существу потенциально токсических средств, конкретно любых эндотоксинов, которые могут присутствовать во время процесса синтеза или очистки. Композиции для парентерального введения также являются стерильными, по существу изотоническими и изготовленными в условиях GMP.

Лекарственные формы могут быть оптимизированы для удерживания и стабилизации в черепе или центральной нервной системе. Когда агент вводит внутрь черепной коробки, для средства является желательным удерживаться в коробке и не диффундировать или иначе проходить через гематоэнцефалический барьер. Методы стабилизации включают сшивки, мультимеризацию или связывание с группами, такими как полиэтиленгликоль, полиакриламид, нейтральные белковые носители и т.д., чтобы достигнуть увеличения молекулярной массы.

Другие стратегии для увеличения удерживания включают включение антитела, такого как антитело против C1q настоящего раскрытия, в биodeградируемый или биоразлагаемый имплантат. Скорость высвобождения терапевтически активного средства контролируется скоростью транспорта через полимерную матрицу и биodeградацией имплантата. На перемещение лекарственного средства через полимерный барьер также будут оказывать воздействие растворимость соединения, гидрофильность полимера, степень сшивки полимера, расширение полимера при поглощении воды, таким образом, чтобы сделать полимерный барьер более проницаемым для лекарственного средства, геометрия имплантата и т.п. Имплантаты имеют линейные размеры, соразмерные размеру и форме области, выбранной в качестве участка имплантации. Имплантаты могут представлять собой частицы, листы, пластыри, бляшки, волокна, микрокапсулы и т.п. и могут иметь любой размер или форму, совместимые с выбранным участком вставки.

Имплантаты могут быть сплошными, т.е. имеющими активное средство, гомогенно распределенное по полимерной матрице, или инкапсулированными, где резервуар активного средства инкапсулирован полимерной матрицей. Выбор полимерной композиции для использования будет изменяться вместе с участком введения, желательным периодом лечения, переносимостью пациента, природой заболевания, подлежащего лечению и т.п. Характеристики полимеров будут включать биodeградируемость на участке имплантации, совместимость со средством, представляющим интерес, простоту инкапсулирования, время полужизни в физиологическом окружении.

Биodeградируемые полимерные композиции, которые могут использоваться, могут представлять собой органические сложные эфиры или простые эфиры, которые при деградации приводят к физиологически приемлемым продуктам деградации, включающим мономеры. Могут найти применение ангидриды, амиды, сложные ортоэфиры или т.п., сами по себе или в комбинации с другими мономерами. Полимеры будут являться конденсационными полимерами. Полимеры могут быть сшитыми или несшитыми. Конкретный интерес представляют полимеры гидроксифатических карбоновых кислот, либо го-

мо- или сополимеры, и полисахариды. Включенными в число сложных полиэфигов, представляющих интерес, являются полимеры D-молочной кислоты, L-молочной кислоты, рацемической молочной кислоты, гликолевой кислоты, поликапрлактон и их комбинации. При использовании L-лактата или D-лактата получают медленно биodeградирующий полимер, в то время как деградация существенно увеличивается в случае рацемата. Соплимеры гликолевой и молочной кислоты представляют особый интерес, где скорость биodeградации контролируют посредством отношения гликолевой кислоты к молочной кислоте. Наиболее быстро деградирующий сополимер имеет примерно равные количества гликолевой и молочной кислот, где гомополимер в равной степени является более устойчивым к деградации. Отношение гликолевой кислоты к молочной кислоте также будет воздействовать на хрупкость имплантата, где более эластичный имплантат является желательным для более крупных геометрий. В ряду полисахаридов, представляющих интерес, находятся альгинат кальция и функционализированные целлюлозы, особенно, сложные эфиры карбоксиметилцеллюлозы, характеризующиеся как нерастворимые в воде, имеющие молекулярную массу приблизительно от 5 до 500 кДа и т.д. Биodeградируемые гидрогели могут также использоваться в имплантатах рассматриваемого изобретения. Гидрогели обычно представляют собой сополимерный материал, характеризующиеся способностью впитывать жидкость. Иллюстративные биodeградируемые гидрогели, которые могут использоваться, описаны у Heller в: *Hydrogels in Medicine and Pharmacy*, N.A. Peppes ed., Vol. III, CRC Press, Boca Raton, Fla., 1987, pp 137-149.

Фармацевтические дозировки.

Фармацевтические композиции настоящего раскрытия, содержащие антитело против C1q настоящего раскрытия, могут применяться (например, вводиться индивидууму, нуждающемуся в лечении антителом против C1q, такому как человеческий индивидуум) в соответствии с известными методами, такими как внутривенное введение в виде болюса, или посредством непрерывной инфузии в течение периода времени, посредством внутримышечного, внутривентриального, внутриспинального, внутриспинального, интраспинального, подкожного, внутрисуставного, внутрисиновиального, интраокулярного, перорального, местного или ингаляционного путей.

Дозировки и желательная концентрация лекарственного средства фармацевтических композиций настоящего раскрытия могут варьировать в зависимости от конкретного предполагаемого применения. Определение соответствующих дозировки или пути введения находится в пределах квалификации рядового специалиста в области. Эксперименты на животных обеспечивают надежное руководство к действию для определения эффективных доз для человеческой терапии. Межвидовое приведение эффективных доз может выполняться, следуя принципам, описанным в Mordenti J. и 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.

Для введения *in vivo* любого из антител против C1q настоящего раскрытия, нормальные количества дозировок могут варьировать от приблизительно 10 нг/кг до приблизительно 100 мг/кг массы тела индивидуума или более в день, в зависимости от пути введения. В нескольких вариантах осуществления, количество дозы составляет приблизительно от 1 до 10 мг/кг/день. Для повторных введений в течение нескольких дней или более, в зависимости от тяжести заболевания, расстройства или состояния подлежащего лечению, лечение поддерживают до достижения желательного подавления симптомов.

Иллюстративный режим дозирования может включать введение первоначальной дозы антитела против C1q, равной приблизительно 2 мг/кг, сопровождаемое еженедельным поддержанием дозой, равной приблизительно 1 мг/кг каждую другую неделю. Могут быть применимы другие режимы дозировки в зависимости от схемы фармакокинетического распада, которой желает достигнуть терапевт. Например, в данном документе предусмотрено дозирование индивидуума от одного до двадцати одного раза в неделю. В некоторых вариантах осуществления может применяться дозирование в интервале от приблизительно 3 мкг/кг до приблизительно 2 мг/кг (такое как приблизительно 3 мкг/кг, приблизительно 10 мкг/кг, приблизительно 30 мкг/кг, приблизительно 100 мкг/кг, приблизительно 300 мкг/кг, приблизительно 1 мг/кг, или приблизительно 2 мг/кг). В некоторых вариантах осуществления, частота дозирования составляет три раза в день, дважды в день, однократно в день, однократно каждый другой день, один раз еженедельно, однократно каждые две недели, однократно каждые четыре недели, однократно каждые пять недель, однократно каждые шесть недель, однократно каждые семь недель, однократно каждые восемь недель, однократно каждые девять недель, однократно каждые десять недель, или однократно ежемесячно, однократно каждые два месяца, однократно каждые три месяца или дольше. Прогресс терапии легко подвергается мониторингу общепринятыми методами и аналитическими тестами. Режим дозирования, включающий вводимое антитело против C1q, может варьировать с течением времени независимо от применяемой дозы.

Дозировки для конкретного антитела против C1q могут быть определены эмпирически у индивидуумов, которым давали одно или несколько введений антитела против C1q. Индивидуумам дают инкрементные дозы антитела против C1q. Чтобы оценить эффективность действия антитела против C1q, любой клинический симптом нейродегенеративного расстройства, воспалительного нарушения или аутоиммунного расстройства может подвергаться мониторингу.

Введение антитела против C1q настоящего раскрытия может быть непрерывным или дробным в за-

всисмости, например, от физиологического состояния реципиента, независимо от того, является ли цель введения терапевтической или профилактической, и других факторов, известных квалифицированным практическим специалистам. Введение антитела против C1q может быть по существу непрерывным в течение предварительно выбранного периода времени или может проводиться последовательно с разделенными дозами.

Руководство, касающееся конкретных дозировок и способов доставки, представлено в литературе; см., например, патенты США № 4657760; 5206344; или 5225212. В объеме изобретения входит, что различные лекарственные формы будут эффективными для различных видов лечения и различных расстройств, и то, что для введения, предназначенного для лечения конкретного органа или ткани, может обязательно требоваться доставка, способом, отличающимся от способа доставки для другого органа или ткани. Кроме того, дозировки могут вводиться посредством одного или нескольких отдельных введений или посредством непрерывной инфузии. Для повторных введений в течение нескольких дней или дольше в зависимости от состояния лечение продолжают до наступления желательного подавления симптомов заболевания. Однако могут быть применимы другие режимы дозировки. Прогресс этой терапии легко подвергается мониторингу общепринятыми методами и аналитическими тестами.

Терапевтические применения.

Настоящее раскрытие предоставляет антитела против C1q и их антигенсвязывающие фрагменты, которые могут связываться и нейтрализовать биологическую активность C1q. Эти антитела против C1q являются применимыми для предотвращения, снижения риска или лечения ряда заболеваний, ассоциированных с активацией комплемента, включающих, без ограничения, нейродегенеративные расстройства, воспалительные нарушения и аутоиммунные расстройства. Соответственно, как раскрыто в данном документе, антитела против C1q настоящего раскрытия могут применяться для лечения, предотвращения или снижения риска заболевания, ассоциированного с активацией комплемента, включающего, без ограничения, нейродегенеративные расстройства, воспалительные нарушения и аутоиммунные расстройства у индивидуума. В нескольких вариантах осуществления, индивидуум имеет такое заболевание. В нескольких вариантах осуществления, индивидуум является человеком.

Нейродегенеративные расстройства, которые могут подвергаться лечению антителами против C1q данного раскрытия, включают расстройства, ассоциированные с потерей соединения нервов или синапсов, включая CF1-зависимую потерю синапсов. Такие расстройства могут включать, без ограничения, болезнь Альцгеймера, боковой амиотрофический склероз, рассеянный склероз, глаукому, миотоническую дистрофию, синдром Дауна, болезнь Паркинсона и болезнь Хантингтона. При некоторых нейродегенеративных расстройствах потеря синапсов является зависимой от рецептора 3 комплемента (CR3)/C3 или рецептора комплемента CR1. При некоторых нейродегенеративных расстройствах потеря синапсов является ассоциированной с зависимым от патологической активности синаптическим прунингом. При некоторых расстройствах синапсы подвергаются фагоцитозу микроглией. Соответственно, антитела против C1q настоящего раскрытия могут применяться для лечения, предотвращения или улучшения одного или нескольких симптомов нейродегенеративного расстройства настоящего раскрытия. В нескольких вариантах осуществления, настоящее раскрытие предоставляет способы лечения, предотвращения или улучшения одного или нескольких симптомов у индивидуумов, имеющих нейродегенеративное расстройство настоящего раскрытия, посредством введения антитела против C1q настоящего раскрытия, чтобы, например, ингибировать взаимодействие между C1q и аутоантителом, таким как аутоантитело против ганглиозида, взаимодействие C1q и C1r и/или взаимодействие C1q и C1s.

Воспалительные или аутоиммунные заболевания, которые могут подвергаться лечению антителами против C1q данного раскрытия, включают, без ограничения, ревматоидный артрит (RA), острый респираторный дистресс-синдром (ARDS), отдаленное повреждение ткани после ишемии и реперфузии, активацию комплемента во время операции на сердце в условиях искусственного кровообращения, дерматомиозит, пемфигус, волчаночный нефрит и результирующий гломерулонефрит и васкулит, сердечно-легочное шунтирование, индуцированную кардиоплегией эндотелиальную дисфункцию, мембранозно-пролиферативный гломерулонефрит типа II, нефропатию IgA, острую почечную недостаточность, криоглобулинемию, антифосфолипидный синдром, дегенеративные заболевания желтого пятна, такие как возрастная дегенерация желтого пятна (AMD), хороидальную неоваскуляризацию (CNV), увеит, диабетическую и другие относящиеся к ишемии ретинопатии, эндофтальмит и другие внутриглазные неоваскулярные заболевания, такие как диабетический отек желтого пятна, патологическая миопия, болезнь фон Гиппеля-Линдау, гистоплазмоз глаз, нейромиеелит зрительного нерва (NMO), окклюзия центральной вены сетчатки (CRVO), неоваскуляризация роговицы, неоваскуляризация сетчатки, а также аллотрансплантацию, сверхострое отторжение, гемодиализ, хронический окклюзионный легочный дистресс-синдром (COPD), астму и аспирационную пневмонию. В нескольких вариантах осуществления, аутоиммунное заболевание могут дополнительно включать, без ограничения, синдром Гийена-Барре, тяжелую миастению, сахарный диабет первого типа, тиреоидит Хашимото, болезнь Аддисона, Целиакию, болезнь Крона, злокачественную анемию, обыкновенную пузырчатку, витилиго, аутоиммунные гемолитические анемии, паранеопластические синдромы, васкулитное заболевание, ревматическую полимиалгию, темпоральный артериит и гранулематоз Вегенера.

При аутоиммунных заболеваниях, таких как нейромиелит зрительного нерва (NMO), аутоантитела активируют систему комплемента. У пациентов с NMO классический путь комплемента запускается посредством связывания аутоантитела, такого как AQP4-нацеленное аутоантитело, с его аутоантигеном, AQP4. AQP4, таким образом, активирует классический путь активации комплемента. На первой стадии этого процесса активации фактор комплемент C1q связывается с иммунным комплексом аутоантитело-аутоантиген. Аутоантитела могут включать природные антитела, такие как сывороточные антитела из пациентов с NMO (обычно называемые NMO-IgG) или моноклональные антитела, такие как rAb-53.

Соответственно, антитела против C1q настоящего раскрытия могут применяться для лечения, предотвращения или улучшения одного или нескольких симптомов воспалительного или аутоиммунного заболевания настоящего раскрытия. В нескольких вариантах осуществления, настоящее раскрытие предоставляет способы лечения, предотвращения или улучшения одного или нескольких симптомов у индивидуумов, имеющих воспалительное или аутоиммунное заболевание настоящего раскрытия, посредством введения антитела против C1q настоящего раскрытия чтобы, например, ингибировать взаимодействие между C1q и аутоантителом, таким как аутоантитело против ганглиозида, взаимодействие C1q и C1r и/или взаимодействие C1q и C1s.

Метаболические заболевания, которые могут подвергаться лечению антителами против C1q, включают, без ограничения, диабет, такой как диабет типа II, и ожирение. *In vitro* и *in vivo* модели метаболических нарушений, которые могут использоваться для тестирования антител против C1q, хорошо известны в данной области. Соответственно, антитела против C1q настоящего раскрытия могут применяться для лечения, предотвращения или улучшения одного или нескольких симптомов метаболического заболевания настоящего раскрытия. В нескольких вариантах осуществления, настоящее раскрытие предоставляет способы лечения, предотвращения или улучшения одного или нескольких симптомов у индивидуумов, имеющих метаболическое заболевание настоящего раскрытия, посредством введения антитела против C1q настоящего раскрытия чтобы, например, ингибировать взаимодействие между C1q и аутоантителом, таким как аутоантитело против ганглиозида, взаимодействие C1q и C1r и/или взаимодействие C1q и C1s.

Комбинированные терапии.

Антитела настоящего раскрытия могут применяться, без ограничения, в комбинации с любым дополнительным лечением нейродегенеративных расстройств, воспалительных нарушений и/или аутоиммунных расстройств.

В нескольких вариантах осуществления, антитело против C1q данного раскрытия вводят в терапевтически эффективных количествах в комбинации со вторым антителом против фактора комплемента (например, нейтрализующим антителом против фактора комплемента), таким как антитело против C1s или антитело против C1r, или вторым антителом против C1q. В нескольких вариантах осуществления, антитело против C1q данного раскрытия вводят в терапевтически эффективных количествах со вторым и третьим нейтрализующим антителом против фактора комплемента, таким как второе антитело против C1q, антитело против C1s и/или антитело против C1r.

В нескольких вариантах осуществления, антитела против C1q данного раскрытия вводят в комбинации с ингибитором антитело-зависимой клеточной цитотоксичности (ADCC). Ингибиторы ADCC могут включать, без ограничения, растворимые ингибирующие рецепторы клеток NK, такие как Ig-подобные рецепторы (KIRs) клеток-киллеров, которые распознают HLA-A, HLA-B или HLA-C и C-типа лектиновые CD94/NKG2A гетеродимеры, которые распознают HLA-E (см., например, Lopez-Botet M., T. Bellon, M. Llano, F. Navarro, P. Garcia & M. de Miguel. (2000), спаренные ингибиторные и запускающие рецепторы NK-клеток для молекул класса HLA I. *Hum. Immunol.* 61: 7-17; Lanier L.L. (1998) Follow leader: NK cell receptors for classical и non classical MHC class I. *Cell* 92: 705-707.), и кадмий (см., например, *Immunopharmacology* 1990; Volume 20, Pages 73-8).

В нескольких вариантах осуществления, антитела данного раскрытия вводят в комбинации с ингибитором альтернативного пути активации комплемента. Таки ингибиторы могут включать, без ограничения, антитела, блокирующие фактор B, антитела, блокирующие фактор D, растворимые, мембранно-связанные, меченые или гибридно-белковые формы CD59, DAF, CR1, CR2, C1ru или Комстатин-подобные пептиды, которые блокируют C3, непептидные антагонисты C3aR, такие как SB 290157, фактор из яда кобры или неспецифические ингибиторы комплемента, такие как нафамостата мезилат (FUTHAN; FUT-175), апротинин, монокарбоновая кислота K-76 (MX-1) и гепарин (см., например, T.E. Mollnes & M. Kirschfink, *Molecular Immunology* 43 (2006) 107-121). В нескольких вариантах осуществления, антитела данного раскрытия вводят в комбинации с ингибитором взаимодействия между аутоантителом и его аутоантигеном. Такие ингибиторы могут включать очищенные растворимые формы аутоантигена, или миметиков антигена, таких как пептид или РНК-производные мимотопы, включающие мимотопы антигена AQP4. Альтернативно, такие ингибиторы могут включать блокирующие агенты, которые распознают аутоантиген и предотвращают связывание аутоантитела без запуска классического пути комплемента. Такие блокирующие агенты могут включать, например, аутоантигенсвязывающие аптамеры РНК или антитела с отсутствием функциональных участков связывания C1q в их Fc-доменах (например, Fab фрагменты или антитело, иным образом сконструированное, чтобы не связывать C1q).

Диагностические применения.

Антитела данного раскрытия или их функциональные фрагменты также имеют диагностическую применимость. Данное раскрытие, следовательно, предоставляет способы применения антител данного раскрытия, или их функциональных фрагментов для диагностических целей, таких как обнаружение С1q у индивидуума или в образцах ткани, полученных от индивидуума. В нескольких вариантах осуществления, индивидуум является человеком. В нескольких вариантах осуществления, индивидуум представляет собой человеческого пациента, страдающего от нейродегенеративного расстройства или воспалительного или аутоиммунного заболевания. В нескольких вариантах осуществления, антитела против С1q данного раскрытия применяют для обнаружения синапсов и потери синапсов. Например, потеря синапсов может быть измерена у индивидуума, страдающего от нейродегенеративного расстройства, такого как болезнь Альцгеймера или глаукома.

В нескольких вариантах осуществления, диагностические способы включают в себя стадии введения антитела против С1q данного раскрытия или его функционального фрагмента индивидууму и обнаружения антитела, связанного с синапсом индивидуума. Связывание антитела с синапсами может быть количественно определено, например, посредством неинвазивных методов, таких как позитронно-эмиссионная томография (ПЭТ), рентгеновская компьютерная томография, однофотонная эмиссионная компьютерная томография (ОФЭКТ), компьютерная томография (КТ) и компьютерная аксиальная томография (КАТ).

В нескольких вариантах осуществления, диагностические способы включают в себя обнаружение синапсов в биологическом образце, таком как биоптат, ткань или клетка. Антитело против С1q или его функциональный фрагмент контактирует с биологическим образцом и связанное с синапсом антитело обнаруживают. Способ обнаружения может включать в себя количественное определение связанного с синапсом антитела. Обнаружение антитела в биологических образцах может проводиться с использованием любого метода, известного в данной области, включающего иммунофлуоресцентную микроскопию, иммуноцитохимию, иммуногистохимию, ELISA, анализ FACS или иммунопреципитацию.

Количественное определение связанных с синапсом антител предоставляет относительное измерение числа синапсов, присутствующих у индивидуума. Обычно, синапсы количественно определяют повторно в течение периода времени. Точная периодичность количественной оценки синапсов зависит от многих факторов, включающих природу нейродегенеративного заболевания, стадию прогрессирования заболевания, терапевтические модальности и многие другие факторы. Повторные измерения обычно показывают прогрессирующую потерю синапсов у индивидуумов, имеющих нейродегенеративное расстройство. Альтернативно, относительные подсчеты синапсов могут подвергаться сравнению в популяциях заболевших индивидуумов и здоровых контрольных индивидуумов в единственный момент времени. У заболевших индивидуумов, проходящих лечение, эффективность лечения можно оценить посредством сравнения степеней потери синапсов у подвергнутых лечению индивидуумов со степенями потери синапсов в контрольной группе. Члены контрольной группы либо не получали никакого лечения или получали контрольное лечение, такое как контролем плацебо.

Наборы.

Данное изобретение также предоставляет наборы, содержащие антитело данного раскрытия или его функциональный фрагмент. Наборы изобретения включают один или несколько контейнеров, содержащих очищенное антитело против С1q данного раскрытия. В нескольких вариантах осуществления, наборы дополнительно включают инструкции по применению в соответствии со способами данного раскрытия. В нескольких вариантах осуществления, эти инструкции содержат описание введения антитела против С1q для лечения или диагностики заболевания, ассоциированного с активацией комплемента включающего, без ограничения нейродегенеративное расстройство (например, болезнь Альцгеймера), воспалительное заболевание, аутоиммунное заболевание и/или метаболическое нарушение в соответствии с любыми способами данного раскрытия. В нескольких вариантах осуществления, инструкции содержат описание того, как обнаружить С1q, например у индивидуума, в образце ткани или в клетке. Набор может дополнительно содержать описание отбора индивидуума, подходящего для лечения, основанного на идентификации того, имеет ли индивидуум заболевание и стадию заболевания.

Инструкции обычно включают информацию по дозировке, режим дозирования и путь введения для назначенного лечения.

Контейнеры могут представлять собой разовые лозы, базовые пакеты (например, многодозовые упаковки) или субъединичные дозы.

Инструкции, поставляемые в наборах изобретения, обычно представляют письменные инструкции на этикетке или листовке-вкладыше в упаковке (например, лист бумаги, включенный в набор), но машиночитаемые инструкции (например, инструкции, содержащиеся на магнитном или оптическом диске запоминающего устройства) также являются приемлемыми.

Этикетка или листовка-вкладыш в упаковке указывает, что композицию применяют для лечения, например, нейродегенеративного заболевания. Инструкции могут быть предоставлены для практической реализации любых из способов, описанных в данном документе.

Наборы данного изобретения находятся в подходящей упаковке. Подходящая упаковка включает,

но не ограничена перечисленным, флаконы, бутылки, склянки, эластичную упаковку (например, герметично закрытый Мулаг или пластиковые мешки) и т.п. Также предусмотрены упаковки для применения в комбинации со специфичным устройством, таким как ингалятор, устройство для назального введения (например, аэрозольный аппарат) или инфузионное устройство, такое как мини-насос. Набор может иметь стерильный порт доступа (например, контейнер может являться мешком для внутривенного раствора или флаконом, имеющим пробку, прокалываемую иглой для подкожной инъекции). Контейнер может также иметь стерильный порт доступ (например, контейнер может являться мешком для внутривенного раствора или флаконом, имеющим пробку, прокалываемую иглой для подкожной инъекции). По меньшей мере одно активное средство в композиции является ингибитором классического пути комплемента. Контейнер может дополнительно содержать второе фармацевтически активное средство.

Наборы могут необязательно предоставлять дополнительные компоненты, такие как буферы и интерпретируемая информация. Обычно, набор содержит контейнер и этикетку или листовку-вкладыш в упаковке (упаковках) на контейнере или ассоциированные с ним.

Данное изобретение будет более полно понятым при ссылке на следующие примеры. Они не должны, однако, рассматриваться как ограничивающие объем изобретения. Все цитирования по всему объему раскрытия явным образом полностью включены в данный документ посредством ссылок.

Примеры

Пример 1. Продуцирование антител против C1q.

Антитело M1 против C1q генерировали в Antibody Solutions Inc. (Sunnyvale CA) посредством иммунизации мышей с выключенным геном C1q, человеческим C1q, используя стандартную иммунизацию мышей и технологии скрининга гибридомы (Milstein C. (1999). *Bioessays* 21: 966-73; Mark Page, Robin Thorpe, *The Protein Protocols Handbook* 2002, Editors: John M. Walker, pp 1111-1113).

Антитела 1C7, 2A1, 3A2 и 5A3 против C1q генерировали в ImmunoPrecise Ltd (Victoria, BC Canada) посредством иммунизации мышей человеческим белком C1q, выделенным в чистом виде из человеческой плазмы (Complement Technology Inc. Tyler Texas, Cat #A-099). Вкратце, самкам мышей BALB/c посредством внутривенной инъекции вводили 25 мкг белка в полном адьювант Фрейнда (CFA) в день 0 и вторичные иммунизации были проведены с использованием 25 мкг фермента C1q в неполном адьюванте Фрейнда (IFA) в дни 21, 42, 52, и конечная внутривенная иммунизация в день 63. Через четыре дня после конечной иммунизации мышей умерщвляли, селезенки удаляли и спленоциты гибридизировали с клеточной линией миеломы SP2/0. Гибридные клетки выращивали в селективных полутвердых средах с гипоксантином-аминоптериним-тимидином (HAT) в течение 10-12 дней и полученные в результате клоны гибридом переносили в 96-луночные планшеты для культур тканей и выращивали в среде HAT, пока титр антитела не становился высоким. Обогащенные антителом супернатанты клонов изолировали и тестировали в аналитической системе ELISA на реактивность с C1q. Положительные клоны изотипировали и культивировали в течение 32 дней (после HAT селекции) для идентификации стабильных экспрессирующих клонов.

Клеточная линия гибридомы, продуцирующая антитело M1 против C1q и называемая мышшиной гибридомой C1q-M1 7788-1(M) 051613, была депонирована в ATCC 6/6/2013 с учетным номером ATCC PTA-120399. Было показано, что M1 специфически связывается с человеческим и мышшиным C1q и нейтрализует биологические функции C1q, такие как комплемент-опосредованный гемолиз (см., например, пример 3).

Пример 2. Антитела против C1q специфически связываются с C1q.

Скрининг ELISA.

Антитела 1C7, 2A1, 3A2, и 5A3 против C1q подвергали скринингу на связывание C1q, используя стандартные методики ELISA.

Вкратце, в день, предшествующий проведению анализа, 96-луночные планшеты для микротитрования покрывали при 0,2 мкг/лунку антигена C1q-фермента в 100 мкл/лунку карбонатного покрывающего буфера pH 9,6 в течение ночи при 4°C. Контрольные лунки покрывали человеческим трансферрином. Далее, планшеты блокировали 3% молочным порошком в PBS в течение 1 ч при комнатной температуре. Затем, супернатанты культуры ткани гибридомы помещали в планшеты при 100 мкл/лунку в течение 1 ч при 37°C при встряхивании. Вторичное антитело (1:10000 козье против мышшиного IgG/IgM(H+L)-HRP) вносили при 100 мкл/лунку в течение 1,5 ч при комнатной температуре при встряхивании. Субстрат ТМВ добавляли при 50 мкл/лунку в течение 5 мин при комнатной температуре в темноте. Реакцию останавливали 50 мкл/лунку 1M HCl и считывания поглощения проводили при длине волны, равной 450 нм.

Четыре супернатанта гибридомы, содержащие антитела 1C7, 2A1, 3A2, и 5A3 против C1q тестировали на связывание с человеческим C1q (фиг. 1). Посредством ELISA все четыре супернатанта показали сильные сигналы связывания в присутствии человеческого C1q, в то время как только фоновые сигналы наблюдали в контрольных лунках, содержащих человеческий трансферрин. Этот эксперимент демонстрировал, что антитела 1C7, 2A1, 3A2 и 5A3 против C1q специфически связываются с человеческим C1q.

Кинетические анализы.

Взаимодействия непроцессированного антитела M1 против C1q с белками человеческого и мышшиного C1q сперва измеряли в кинетическом режиме и впоследствии рассчитывали термодинамические

константы диссоциации. Дополнительно, данные связывания M1 сравнивали с соответствующими данными, полученными с использованием референтного антитела 4A4B11. 4A4B11 описано в патенте США № 4595654. Клеточная линия гибридомы, продуцирующая 4A4B11, является доступной из ATCC (ATCC HB-8327TM).

Взаимодействия C1q-антитело измеряли, используя систему OCTET™ в соответствии со стандартными методиками и инструкциями изготовителя. Вкратце, белки человеческого и мышинного C1q раздельно иммобилизовали на биосенсоре при трех концентрациях (3, 1,0 и 0,33 нМ). Далее, антитело M1 против C1q инъекционно наносили на C1q-покрытый биосенсор при концентрации, равной 2,0 мкг/мл и измеряли константы ассоциации (k_{on}) и константы диссоциации (k_{off}) для антител M1 и 4A4B11 против C1q. Данные были обработаны с помощью нелинейного регрессионного анализа и с использованием программного обеспечения Octet Data Analysis с получение аффинности (K_D) и кинетических параметров ($k_{on/off}$) для взаимодействий M1 и 4A4B11 с человеческим и мышинным C1q соответственно (см. табл. В).

Таблица В. Кинетический анализ M1 и 4A4B11

Антитело	Антиген	K_D (М)	k_{on} (1/Мс)	k_{off} (1/с)
M1	человеческий C1q	$1,28 \cdot 10^{-11}$	$5,18 \cdot 10^6$	$6,31 \cdot 10^{-5}$
M1	мышинный C1q	$3,23 \cdot 10^{-11}$	$1,81 \cdot 10^6$	$5,84 \cdot 10^{-5}$
4A4B11	человеческий C1q	$2,29 \cdot 10^{-11}$	$4,49 \cdot 10^6$	$1,03 \cdot 10^{-4}$
4A4B11	мышинный C1q	Необнаружено	Необнаружено	Необнаружено

В этом ряде экспериментов было показано, что антитело M1 против C1q связывается с белками, как человеческого, так и мышинного C1q с очень высокими аффинностями ($K_D < 10^{-10}$ М). При сравнении было обнаружено, что референтное антитело 4A4B11 связывается с человеческим C1q, в то время как связывание с мышинным C1q было не обнаруживаемым. В то время как аффинности M1 и 4A4B11 для человеческого C1q имели одинаковый порядок величины (т.е. в двухцифровом пикомолярном диапазоне; $K_D \sim 10-30$ пМ), аффинность M1 для мышинного C1q была определена как более высокая приблизительно на четыре порядка величины ($K_D \sim 30$ пМ), чем аффинность 4A4B11 для мышинного C1q ($K_D \sim 40$ нМ).

Антитела M1 и 4A4B11 против C1q не конкурируют за связывание с C1q.

Эксперименты по блокированию проводили, чтобы определить, связываются ли антитела M1 и 4A4B11 против C1q с одинаковыми или перекрывающимися эпитопами человеческого C1q или связываются ли M1 и 4A4B11 с раздельными эпитопами C1q.

С этой целью M1 наносили на биосенсорный чип (BIAcore™) и последовательно осуществляли его контакт с комбинацией человеческого C1q и M1, комбинацией человеческого C1q и 4A4B11, или человеческим C1q по отдельности. Связывание C1q с M1 следовало в течение 10 мин, и диссоциация комплексов M1-C1q последовательно проходила в течение 20 мин. Относительные сигналы связывания регистрировали в конце периодов ассоциации и диссоциации. Таблица С показывает результаты этих экспериментов.

Таблица С. Анализ одновременных взаимодействий M1 и 4A4B11 с человеческим C1q

Сенсорное Ab ID:	Антиген ID:	Раствор Ab ID:	Ответ ассоциации (нМ) @600с	Ответ диссоциации (нМ) @1200с
M1	hC1q	M1	-0,0119	-0,00945
M1	hC1q	4A4B11	0,8213	0,82139
M1	hC1q	Нет (Ag только)	0,4715	0,45137

Было обнаружено, что C1q по отдельности эффективно связывался с иммобилизованным антителом M1 на биосенсорном чипе. Предварительная инкубация C1q с растворимым антителом M1 предотвращала все связывание результирующего комплекса M1-C1q с иммобилизованным M1. Напротив, предварительная инкубация C1q с 4A4B11 не предотвращала взаимодействие результирующего комплекса 4A4B11-C1q с иммобилизованным M1. Более высокие относительные сигналы связывания, наблюдаемые в эксперименте со связыванием, включающем комплекс 4A4B11-C1q, относительно эксперимента со связыванием, включающем C1q по отдельности обусловлено тем фактом, что относительные сигналы связывания коррелируют с молекулярной массой растворимых партнеров связывания и тем, что комплекс 4A4B11-C1q имел более высокую молекулярную массу, чем C1q по отдельности.

Эти результаты демонстрируют, что 4A4B11 не конкурирует с M1 за связывание с C1q. Следова-

тельно, 4A4B11 и M1 могут распознавать отдельные эпитопы на C1q.

Пример 3. Антитела против C1q ингибируют комплемент-опосредованный гемолиз.

Антитела против C1q тестировали в тестах на гемолиз (CH50) для человека и грызунов на предмет их способности нейтрализовать C1q и блокировать его активацию вниз по каскаду комплемента. Анализы гемолиза CH50 проводили по существу, как описано в Current Protocols in Immunology (1994) Supplement 9 Unit 13.1. Вкратце, 5 микролитров (мкл) человеческой сыворотки (Cedarlane, Burlington, NC), 0,625 мкл сыворотки крыс Вистар, или 2,5 мкл сыворотки мышей разбавляли до 50 мкл GVB буфера (Cedarlane, Burlington, NC) и добавляли к 50 мкл моноклональных антител (1 мкг), разбавленных в GVB буфере. Смесь антитело:сыворотка предварительно инкубировали в течение 30 мин на льду и затем добавляли к 100 мкл клеток EA (2×10^8 /мл) при анализах для крыс и людей, и 4×10^7 /мл при анализах для мышей. Клетки EA генерировали в точности, как установлено в Current Protocols, используя овечью кровь по Alsever's (Cedarlane Cat #CL2581) и гемолизин (Cedarlane Cat #CL9000). Смесь клеток EA, сыворотки и антитела инкубировали в течение 30 мин при 37°C и затем помещали на лед. Следующие 1,2 мл 0,15M NaCl добавляли к смеси, и OD₄₁₂ образца считывали в спектрофотометре, чтобы определить количество лизиса клеток. Процент ингибирования тестируемого антитела определяли относительно контрольного антитела мышинового IgG1 (Abcam ab18447).

Проводили модифицированный анализ CH50 (также называемый анализом гемолиза C1F), который предоставлял ограничивающие количества комплекса C1 из человеческой сыворотки для обеспечения более высокой чувствительности для оценки активности C1 и потенциального ингибирования C1. Вкратце, анализ проводили следующим образом. Сперва, 3×10^7 овечьих эритроцитов (RBC) инкубировали с антителом IgM против овечьих RBC для генерации активированных эритроцитов (клетки EA). Клетки EA затем инкубировали с очищенным белком C4b для создания клеток EAC4b. Клетки EAC4b последовательно инкубировали с разбавленной (1:1000-1:10000) нормальной человеческой сывороткой (NHS), которую предварительно инкубировали с антителом против C1q и контрольными мышинными IgG антителами, или без них, для предоставления ограничивающего количества человеческого C1. Далее, полученные в результате клетки EAC14 инкубировали с очищенным человеческим белком C2 для генерации клеток EAC14b2a. Окончательно, сыворотку морской свинки добавляли в EDTA буфере и инкубировали при 37°C в течение 30 мин. Лизис клеток измеряли в спектрофотометре при длине волны, равной 450 нм.

Сперва, четыре C1q-связывающих антитела (1C7, 2A1, 3A2, и 5A3) тестировали в аналитической системе человеческого CH50 при единственной концентрации (1 мкг) (фиг. 2). Было обнаружено, что все четыре антитела ингибируют гемолиз. Антитело 1C7 против C1q ингибировало гемолиз на более чем 90%, 2A1 ингибировало гемолиз на более чем 40%, 3A2 ингибировало гемолиз на более чем 60%, и 5A3 ингибировало гемолиз на более, чем 50%.

Далее, антитела 1C7 и 3A2 против C1q тестировали в аналитической системе человеческого гемолиза CH50 в формате доза-ответ (фиг. 3). Антитело 4A4B11 против C1q применяли в качестве референтного. Как антитело 1C7, так и антитело 3A2 ингибировали гемолиз CH50 дозозависимым образом. Приблизительно 100 нг антитела 1C7 и приблизительно 200 нг 3A2 требовались для ингибирования 50% наблюдаемого гемолиза (фиг. 3).

Антитело M1 против C1q тестировали на предмет его C1q-нейтрализующей активности в человеческих, мышинных и крысиных аналитических системах CH50 (фиг. 4A-C). Тестирование проводили в формате доза-ответ. Антитело 4A4B11 против C1q применяли в качестве референтного. Было продемонстрировано, что M1 нейтрализует активность C1q в человеческих, мышинных и крысиных аналитических системах гемолиза CH50 дозозависимым образом (фиг. 4A-4C). Напротив, было обнаружено, что 4A4B11 нейтрализует активность C1q только в человеческой аналитической системе CH50, в то время как референтное антитело было неактивным в мышинных и крысиных аналитических системах гемолиза CH50 (до 2 мкг). В человеческой и крысиной аналитических системах гемолиза CH50 M1 ингибировало более чем 90% и до 100% гемолиза (фиг. 4A и 4C); в мышинной аналитической системе M1 ингибировало более чем 50% гемолиза (фиг. 4B). В человеческой аналитической системе CH50, менее чем 125 нг M1 требовалось для достижения 50% ингибирования гемолиза. В мышинной аналитической системе CH50, приблизительно 500 нг M1 требовалось для достижения 50% ингибирования гемолиза. В крысиной аналитической системе CH50, менее чем 16 нг требовалось для достижения 50% ингибирования гемолиза.

Пример 4. Картирование эпитопов для антител 4A4B11 и M1.

Чтобы определить природу эпитопа (т.е. линейную или конформационную), оценивали ингибирование взаимодействия между белком C1Q и антителами 4A4B11 (ANN-001) и M1 (ANN-005) под действием неструктурированных пептидов, генерируемых посредством протеолиза антигена C1q. Если пептиды, генерируемые посредством полного протеолиза антигена, являются способными ингибировать связывание антигена на антителе, взаимодействие не основано на конформации, и эпитоп является линейным. Если пептиды, генерируемые посредством полного протеолиза антигена, являются неспособными ингибировать связывание антигена на антителах 4A4B11 и M1, конформация является необходимой для взаимодействия. На основании данных, описанных подробно ниже, неструктурированные пептиды, генерируемые посредством расщепления нативного C1q, не конкурировали с интактным C1q за связывание с

антителами 4A4B11 (ANN-001) и M1 (ANN-005) (см. фиг. 2), позволяя предположить, что эпитоп C1q для этих антител является комплексным конформационным эпитопом.

Чтобы определить ключевые остатки конформационного эпитопа C1q, который связывается с ANN-001 и ANN-005 на антигене C1Q с высоким разрешением, комплексы антитело/антиген инкубировали с дейтерированными сшивающими агентами и подвергали мультиферментативному протеолитическому расщеплению. После обогащения сшитых пептидов, образцы анализировали масс-спектрометрией высокого разрешения (nLC-Orbitrap MS) и полученные данные анализировали, используя программное обеспечение XQuest. Анализ, описанный ниже, указывает на то, что антитело 4A4B11 (ANN-001) связывается с эпитопом, который включает аминокислоты S202 и K219 человеческого C1QA и Y225 человеческого C1QC, а антитело M1 (ANN-005) связывается с эпитопом, который включает аминокислоту K219 из человеческого C1QA и S185 из человеческого C1QC. См. выравнивание аминокислотных последовательностей человеческого и мышиного C1qA и C1qC, как показано ниже

Выравнивание аминокислотных последовательностей человеческого и мышиного C1qA

MEGPRGWLVLVLAISLASMVTEDLCRAPDGKKGEGAGRRPGRGRPLGKGEQGEFGAPGIR человеческий

METSQGWLVACVLTMTLVVTVVAEDVCRAPNGKDGAPGNPGRPGRPLKGERGEFGAAGIR мышиный

** .:**** *:::*. *:***:****:*. * .*.*** *****:*****.***

TGIQGLKGDQGEFGPSGNPKVGYPGPSGPLGARGIPGIKGTKGSFGNIKQPRPAFSAI человеческий

TGIRGFKGDPGESGPPGKPNVGLPGPSGPLGDSGPGQLKGVKGNPNIIRDQPRPAFSAI мышиный

:*. *.**.*:*.** ***** * *:.**.*.***:*****

RRNPPMGGNVVIFDVTITNQEEPYQNHSGRFVCTVPGYFFTFQVLSQWEICLSIVSSSR человеческий

RQNPMTLGNVVIDKVLTNQESPYQNHTGRFICAVPGFYFNFQVISKWDLCLFIKSSSG мышиный

*:**. *****. *:****. *****:****:*. ****:***. ***-*:::** * **

GQVRRSLGFCDTNKGFLQVVGGMVLQLQGDQVWVEKDPKKGHIYQGSEADSVFSGFL человеческий

GQPRDSLFSNTNKGFLQVLAGGTVLQLRRGDEVWIEKDPKGRYIYQTEADSIYFSGFL мышиный

** * *.*.:.*. *****:*. *****:*. ***** ** :*****:*****:*****

|FPSA человеческий (SEQ ID NO:1)

|FPSA мышиный (SEQ ID NO:14)

Выравнивание аминокислотных последовательностей человеческого и мышиного C1qC

MDVGPSSLPHLGLKLLLLLLLP-LRQANTGCYGI PGMPGLPGAPGKDGIDGLPGPKGE человеческий

MVVGPSQPCCGLCLLLLFLALPLRSQASAGCYGI PGMPGMPGAPGKDGHDGLQGPKGE мышиный

* ****. ** ** *****:*. **.*. :*****:*****:*** *****

PGIPAIPIGIRPKGQKGEPLGHPGKNGPMGPPGMPGVPGPMGIPGEPGEEGRYKQKQFQ человеческий

PGIPAVPGRTRPKGQKGEPCMPGHRGKNGPRGTSGLPGDPCPRGPPGEPGVEGRYKQKQHQ мышиный

*****.* *****:*. ***** * *:.** ** * ***** ***** *

SVFTVTRQTHQPPAPNSLIRFNAVLTNPQGDYDTSTGKFTCKVPGLYYFVYHASHTANLC человеческий

SVFTVTRQTTQYPEANALVRFNSVVTNPQGHYNPSTGKFTCEVPGLYYFVYYSHTANLC мышиный

***** * * .*:*.***:*. *****. *: . *****:*****:*****:*****

VLLYRSGVKVVTFCGHTSKTNQVNSGGVLLRLQVGEVWLVAVNDYDMVGIQGSDSVFSG человеческий

VHLNLNLARVASFCDHMFNSKQVSSGGVLLRLQRGDEVWLVAVNDYNGMVGIEGNSVFSG мышиный

* * . .:*.:.*. * :::*. ***** * ;****;**** .*****:*.*****

FLLFPD человеческий (SEQ ID NO:3)

FLLFPD мышиный (SEQ ID NO:15)

1) Идентификация комплексов C1q/антитело посредством масс-спектрометрии.

Комплексы C1q/антитело генерировали посредством смешивания эквимольных растворов антигена C1q и антитела (4 мкМ в 5 мкл каждый). Один мкл полученной смеси смешивали с 1 мкл матрицы, составленной из матрицы перекристаллизованной синапиновой кислоты (10 мг/мл) в смеси ацетонитрил/вода (1:1, об./об.), ТФУ 0,1% (набор K200 MALDI). После смешивания 1 мкл каждого образца наносили в виде пятна на пластину MALDI (SCOUT 384). После кристаллизации при комнатной температуре пластину вводили в масс-спектрометр MALDI и немедленно анализировали. Анализ повторяли в трех повторностях. Фиг. 5 показывает наличие антигена, антитела и комплексов антиген/антитело для C1q/4A4B11 (фиг. 5А) и C1q/M1 (фиг. 5В). Пики присутствуют при предсказанных молекулярных массах мономерного антитела (~150 кДа) и мономера C1q (~460 кДа), и имеется комплекс 1:1, антитела:антиген присутствующий при ~615 кДа.

2) Неструктурированные пептиды C1q, генерируемые при протеолизе, не конкурируют за связывание C1q с антителом.

Чтобы определить, могут ли комплексы C1q/антитело конкурировать с пептидами, антиген C1q расщепляли иммобилизованным пепсином. 25 мкл антигена с концентрацией 10 мкМ смешивали с 5 мкМ иммобилизованного пепсина и инкубировали при комнатной температуре в течение 30 мин. После прохождения времени инкубации образец центрифугировали и супернатант отбирали пипеткой. Окончание протеолиза контролировали масс-спектрометрией High-Mass MALDI в линейном режиме. Пепсиновый протеолиз оптимизировали, чтобы получить большое количество пептида в диапазоне 1000-3500 Да. Далее, 5 мкл пептидов антигена, генерируемых при протеолизе, смешивали с 5 мкл ANN-001 или ANN-005 (8 мкМ) и инкубировали при 37°C в течение 6 ч. После инкубации ANN-001 или ANN-005 с пептидами антигена C1Q, 5 мкл смеси смешивали с 5 мкл антигена C1Q (4 мкМ), таким образом, что окончательная смесь содержала 2/2/2,5 мкМ антигена C1Q/4A4B11 или M1/пептидов антигена C1Q.

МС анализ MALDI ToF выполняли, применяя модуль взаимодействия CovalX's HM3 со стандартным азотным лазером и фокусировкой на различных диапазонах масс от 0 до 2000 кДа. Для анализа, применяли следующие параметры масс-спектрометра: линейный и положительный режим; ионный источник 1: 20 кВ; ионный источник 2: 17 кВ; импульсная экстракция ионов: 400 нс; для HM3: напряжение усиления: 3,14 кВ; напряжение усиления: 3,14 кВ; ускоряющее напряжение: 20 кВ.

Для калибровки прибора применяли внешнюю калибровку с использованием кластеров инсулина, БСА и IgG. Для каждого образца анализировали 3 пятна (300 лазерных импульсов на пятно). Представленный спектр соответствует сумме 300 лазерных импульсов. Данные МС анализировали, применяя программное обеспечение для анализа комплекс Tracker, версия 2,0 (CovalX Inc).

Результаты показаны на фиг. 6 и демонстрируют, что пептиды C1q не конкурируют с интактным C1q за связывание с моноклональным антителом ANN-005 (M1).

3) Идентификация конформационных эпитопов для связывания C1q с ANN-001 и ANN-005.

Используя химическую сшивку, масс-спектрометрию типа High-Mass MALDI и масс-спектрометрию nLC-Orbitrap, характеризовали поверхность взаимодействия между антигеном C1Q и двумя моноклональными антителами ANN-001 и ANN-005. 5 мкл образца антигена C1Q (концентрация 4 мкМ) смешивали с 5 мкл образца ANN-001 (концентрация 4 мкМ) или ANN-005 (концентрация 4 мкМ), чтобы получить смесь антитело/антиген с конечной концентрацией 2/2 мкМ. Смесь инкубировали при 37°C в течение 180 мин. На первой стадии 1 мг сшивающего агента Дисукцинилимидилсуберата H12 (DSS-H12) смешивали с 1 мг сшивающего агента Дисукцинилимидилсуберата D12 (DSS-D12). Полученные 2 мг смешивали с 1 мл ДМФА, чтобы получить раствор с 2 мг/мл DSS H12/D12. 10 мкл смеси антитело/антиген, полученные ранее, смешивали с 1 мкл раствора полученного сшивающего агента d0/d12 (2 мг/мл). Раствор инкубировали 180 мин при комнатной температуре, чтобы достичь реакции сшивки. Чтобы облегчить протеолиз, было необходимо восстановить связанный дисульфид, присутствующий в данном белке. Сшитый образец смешивали с 20 мкл бикарбоната аммония (25 мМ, pH 8,3). После смешивания 2,5 мкл DTT (500 мМ) добавляли к раствору. Смесь затем инкубировали 1 ч при 55°C. После инкубации, добавляли 2,5 мкл йодацетамида (1М) перед 1-часовой инкубацией при комнатной температуре в темной комнате. После инкубации, раствор разбавляли 1/5 добавлением 120 мкл буфера, используемого для протеолиза. 145 мкл восстановленного/алкилированного сшитого образца смешивали с 2 мкл трипсина (Sigma, T6567). Протеолитическую смесь инкубировали в течение ночи при 37°C. Для протеолиза α -химотрипсином буфер для протеолиза представлял собой Tris-HCL 100 мМ, CaCl₂ 10 мМ, pH 7,8. 145 мкл восстановленного/алкилированного сшитого комплекса смешивали с 2 мкл 200 мкМ α -химотрипсина и инкубировали в течение ночи при 30°C. Для данного анализа применяли nLC в комбинации с масс-спектрометрией Orbitrap. Сшивающие пептиды анализировали с использованием программного обеспечения Xquest версия 2,0 и stavroх. Идентифицированные пептиды и сшитые аминокислоты указаны в табл. D ниже.

Таблица D. Сшитые пептиды C1q и контактные остатки, необходимые для связывания ANN-001 и ANN-005

Протеаза для расщепления	X-связанный пептид	Субъединица C1q	Контактный остаток	Антитело
Трипсин	GLFQVVSGGMVLQLQQGDQVWVEK (SEQ ID NO:25, остатки 196-219 из SEQ ID NO:1)	C1qA	K219	ANN-001
Трипсин	FQVVSGGMVLQL (SEQ ID NO:26, остатки 198-209 из SEQ ID NO:1)	C1qA	S202	ANN-001
Химотрипсин	YDMVGIQGSDSVFSGF (SEQ ID NO:21, остатки 225-240 из SEQ ID NO:3)	C1qC	Y225	ANN-001
Трипсин	GLFQVVSGGMVLQLQQGDQVWVEK (SEQ ID NO:25, остатки 196-219 из SEQ ID NO:1)	C1qA	K219	ANN-005
Химотрипсин	RSGVKVVT (SEQ ID NO:24, остатки 184-192 из SEQ ID NO:3)	C1qC	S185	ANN-005

4) Последовательности переменного домена легкой цепи и тяжелой цепи антитела M1.

С использованием стандартных методов определяли аминокислотные последовательности и последовательности нуклеиновых кислот, кодирующие переменный домен легкой цепи и переменный и переменный домен тяжелой цепи антитела M1.

Аминокислотная последовательность переменного домена легкой цепи антитела M1 представляет собой

DVQITQSPSYLAASPGETITIN**CRASKSINKYLA**WYQEKPGKTNKLLI**YSGSTLQS**GIPSRFSG
SGSGTDFTLTISSELEPEDFAMYY**COQHNEYPLT**FGAGTKLELK (SEQ ID NO:4).

Гипервариабельные области (HVR) переменного домена легкой цепи отображаются в тексте жирным и подчеркнутым шрифтом. В нескольких вариантах осуществления, HVR-L1 переменного домена легкой цепи M1 имеет последовательность RASKSINKYLA (SEQ ID NO:5), HVR-L2 переменного домена легкой цепи M1 имеет последовательность SGSTLQS (SEQ ID NO:6) и HVR-L3 переменного домена легкой цепи M1 имеет последовательность QQHNEYPLT (SEQ ID NO:7).

Аминокислотная последовательность переменного домена тяжелой цепи антитела M1 представляет собой

QVQLQQPGAELVKPGASVKLSCKSS**GYHFTSYWMH**WVKQRPQGLEWIG**VIHPNSGSINYNEKF**
ESKATLTVDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCAGERDSTEVLPMDYWGQGTSVTVSS (SEQ ID NO:8).

Гипервариабельные области (HVR) переменного домена тяжелой цепи отображаются в тексте жирным и подчеркнутым шрифтом. В нескольких вариантах осуществления, HVR-H1 переменного домена тяжелой цепи M1 имеет последовательность GYHFTSYWMH (SEQ ID NO:9), HVR-H2 переменного домена тяжелой цепи M1 имеет последовательность VIHPNSGSINYNEKFES (SEQ ID NO:10) и HVR-H3 переменного домена тяжелой цепи M1 имеет последовательность ERDSTEVLPM (SEQ ID NO:11).

Было определено, что последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей переменный домен легкой цепи, является

GATGTCCAGATAACCCAGTCTCCATCTTATCTTGCTGCATCTCCTGGAGAAACCATTTACTATTA
ATTGCAGGGCAAGTAAGAGCATTAACAAATATTTAGCCTGGTATCAAGAGAAACCTGGGAAAAC
TAATAAGCTTCTTATCTACTCTGGATCCACTTTGCAATCTGGAATTCATCAAGGTTTCAGTGGC
AGTGGATCTGGTACAGATTTCACTCTCACCATCAGTAGCCTGGAGCCTGAAGATTTTGAATGT
ATTACTGTCAACAACATAATGAATACCCGCTCACGTTCCGGTCTGGGACCAAGCTGGAGCTGAA
A (SEQ ID NO:12).

Было определено, что последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей переменный домен тяжелой цепи, является

CAGGTCCAACCTGCAGCAGCCTGGGGCTGAGCTGGTAAAGCCTGGGGCTTCAGTGAAGTTGTCCCT
 GCAAGTCTTCTGGCTACCATTTACCAGCTACTGGATGCACTGGGTGAAGCAGAGGCCTGGACA
 AGGCCTTGAGTGGATTGGAGTGATTCATCCTAATAGTGGTAGTATTAAC TACAATGAGAAGTTC
 GAGAGCAAGGCCACACTGACTGTAGACAAATCCTCCAGCACAGCCTACATGCAACTCAGCAGCC
 TGACATCTGAGGACTCGGCGGTCTATTATTGTGCAGGAGAGAGATTCTACGGAGGTTCTCCC
 TATGGACTACTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCA (SEQ ID NO:13).

Несмотря на то что приведенное выше изобретение было описано довольно подробно путем иллюстрирования и примеров с целью ясности понимания, описания и примеры не должны рассматриваться как ограничивающие объем изобретения. Раскрытие всей патентной и научной литературы, цитируемой в данном описании, явным образом полностью включено посредством ссылки.

Депонирование материалов.

Следующие материалы были депонированы в соответствии с Будапештским договором в Американской коллекции типовых культур, Патентный депозитарий ATCC, 10801 University Blvd., Manassas, Va. 20110-2209, USA (ATCC)

ID образца	Изотип	Дата депонирования	Учетный номер ATCC
Мышиная гибридома C1qM1 7788-1 (M) 051613, продуцирующая антитело против C1q M1	IgG1, каппа	6/6/2013	PTA-120399

Клеточная линия гибридомы, продуцирующей антитело M1 (мышинная гибридома C1qM1 7788-1(M) 051613), была депонирована в ATCC при условиях, которые гарантируют, что доступ к культуре будет обеспечен во время рассмотрения патентной заявки и в течение периода, равного 30 годам, или 5 годам после самого недавнего запроса, или в течение срока действия патента, вне зависимости от того, какой из них является длиннее. Депозит будет заменен, если депозит станет нежизнеспособным в течение этого периода. Депозит является доступным, как требуется в соответствии с иностранными патентными законами, в странах, где подаются дубликаты рассматриваемой заявки, или ее продолжение. Однако следует понимать, что доступность депозитария не составляет лицензию для практической реализации рассматриваемого изобретения с умалением патентных прав, предоставленных государственным органом.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Антитело, или фрагмент антитела, которое специфически связывается с белком C1q, где антитело содержит

- HVR-L1 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:5;
- HVR-L2 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:6; и
- HVR-L3 с аминокислотной последовательностью из SEQ ID NO:7; и
- HVR-H1 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:9;
- HVR-H2 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:10; и
- HVR-H3 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:11.

2. Антитело по п.1, в котором переменный домен легкой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:4.

3. Антитело по п.1 или 2, в котором переменный домен тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:8.

4. Антитело по любому из пп.1-3, которое специфически связывается как с C1q человека, так и с C1q мыши; или C1q крысы; или с C1q человека, с C1q мыши и с C1q крысы.

5. Антитело по любому из пп.1-4, у которого константа диссоциации (KD) для C1q человека и C1q мыши находится в интервале от менее чем примерно 30 нМ до менее чем примерно 100 пМ; или константа диссоциации (KD) для C1q человека и C1q мыши меньше примерно 30 нМ; или константа диссоциации (KD) для C1q человека и C1q мыши меньше примерно 20 нМ; или константа диссоциации (KD) для C1q человека и C1q мыши меньше примерно 10 нМ; или константа диссоциации (KD) для C1q человека и C1q мыши меньше примерно 5 нМ; или константа диссоциации (KD) для C1q человека и C1q мыши меньше примерно 1 нМ; или константа диссоциации (KD) для C1q человека и C1q мыши меньше примерно 100 пМ.

6. Антитело по любому из пп.1-5, которое специфически связывается с C1q и нейтрализует его биологическую активность, где указанная биологическая активность представляет собой:

- (1) связывание C1q с аутоантителом;
- (2) связывание C1q с C1r;
- (3) связывание C1q с C1s;

- (4) связывание C1q с фосфатидилсеринном;
- (5) связывание C1q с пентраксином-3;
- (6) связывание C1q с С-реактивным белком (CRP);
- (7) связывание C1q с глобулярным рецептором C1q (gC1qR);
- (8) связывание C1q с рецептором 1 комплемента (CR1);
- (9) связывание C1q с β -амилоидом; или
- (10) связывание C1q с кальретикулином; и/или
- (11) активацию классического пути активации комплемента;
- (12) активацию антитело- и комплементзависимой цитотоксичности;
- (13) гемолиз CH50, например CH50 человека, мыши и/или крысы;
- (14) потерю синапсов;
- (15) продуцирование антител В-клетками;
- (16) созревание дендритных клеток;
- (17) пролиферацию Т-клеток;
- (18) продуцирование цитокинов;
- (19) активацию микроглии;
- (20) реакцию Артюса;
- (21) фагоцитоз синапсов или нервных окончаний; или
- (22) активацию клеток, экспрессирующих рецептор 3 комплемента (CR3/C3).

7. Антитело по п.6, которое способно к нейтрализации по меньшей мере 50%, например при дозе, равной менее чем 200 нг/мл, менее чем 100 нг/мл, менее чем 50 нг/мл или менее чем 20 нг/мл, или по меньшей мере 80%, или по меньшей мере 90% гемолиза CH50.

8. Антитело по любому из пп.1-7, которое представляет собой мышинное антитело или гуманизованное или химерное антитело.

9. Моноклональное антитело M1 мыши против C1q человека, продуцируемое клеточной линией гибридомы с номером доступа ATCC PTA-120399 или ее потомством, где антитело содержит

- HVR-L1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:5;
- HVR-L2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:6; и
- HVR-L3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:7;
- HVR-H1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:9;
- HVR-H2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:10; и
- HVR-H3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:11.

10. Антитело по любому из пп.1-9, которое относится к классу IgG.

11. Антитело по п.10, которое имеет изотип IgG₁, IgG₂, IgG₃ или IgG₄.

12. Антитело по любому из пп.1-11, которое является фрагментом антитела.

13. Антитело по п.12, где фрагмент антитела представляет собой фрагмент Fab, F(ab')₂ или Fab'.

14. Антитело по любому из пп.12, 13, где фрагмент антитела специфически связывается с C1q и нейтрализует его биологическую активность.

15. Антитело по любому из пп.12-14, где фрагмент антитела обладает улучшенным проникновением в мозг по сравнению со своим соответствующим полноразмерным антителом; и/или фрагмент антитела обладает более коротким временем полужизни по сравнению со своим соответствующим полноразмерным антителом.

16. Полинуклеотид, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую антитело, или ее фрагмент, по любому из пп.1-15.

17. Клетка-хозяин, содержащая последовательность нуклеиновой кислоты по п.16.

18. Клетка гибридомы с номером доступа PTA-120399 в ATCC или ее потомство, которая продуцирует антитело по любому из пп.1-8.

19. Фармацевтическая композиция для лечения или профилактики заболевания, связанного с активацией комплемента, содержащая антитело, или его фрагмент, по любому из пп.1-15 и фармацевтически приемлемый носитель.

20. Способ лечения или профилактики заболевания, связанного с активацией комплемента, у индивидуума, включающий стадию введения терапевтически эффективной дозы антитела, или его фрагмента, по любому из пп.1-15.

21. Способ по п.20, где заболевание, связанное с активацией комплемента, представляет собой нейродегенеративное расстройство.

22. Способ по п.21, где

нейродегенеративное расстройство связано с потерей синапсов или потерей нервных соединений; и/или

нейродегенеративное расстройство связано с потерей синапсов, зависимой от рецептора комплемента 3(CR3)/C3 или рецептора комплемента CR1; и/или

нейродегенеративное расстройство связано с зависимым от патологической активности синаптическим прунингом; и/или

нейродегенеративное расстройство связано с фагоцитозом синапсов микроглией; и/или
нейродегенеративное расстройство выбрано из группы, состоящей из болезни Альцгеймера, бокового амиотрофического склероза, рассеянного склероза, глаукомы, миотонической дистрофии, синдрома Дауна, болезни Паркинсона и болезни Хантингтона.

23. Способ по п.20, где заболевание, связанное с активацией комплемента, представляет собой воспалительное заболевание, аутоиммунное заболевание или метаболическое нарушение.

24. Способ по п.23, где воспалительное заболевание, аутоиммунное заболевание или метаболическое нарушение выбрано из группы, состоящей из диабета, ожирения, ревматоидного артрита (RA), острого респираторного дистресс-синдрома (ARDS), отдаленного повреждения ткани после ишемии и реперфузии, активации комплемента во время операции на сердце в условиях искусственного кровообращения, дерматомиозита, пемфигуса, волчаночного нефрита и результирующего гломерулонефрита и васкулита, сердечно-легочного шунтирования, индуцированной кардиоплегией эндотелиальной дисфункции, мембранозно-пролиферативного гломерулонефрита типа II, нефропатии IgA, острой почечной недостаточности, криоглобулинемии, антифосфолипидного синдрома, дегенеративных заболеваний желтого пятна, возрастной дегенерации желтого пятна (AMD), хороидальной неоваскуляризации (CNV), увеита, диабетической ретинопатии, относящейся к ишемии ретинопатии, эндофтальмита, внутриглазного неоваскулярного заболевания, диабетического отека желтого пятна, патологической миопии, болезни фон Гиппеля-Линдау, гистоплазмоза глаз, нейромиеелита зрительного нерва (NMO), окклюзии центральной вены сетчатки (CRVO), неоваскуляризации роговицы, неоваскуляризации сетчатки, алло-трансплантации, сверхострого отторжения, гемодиализа, хронического окклюзионного легочного дистресс-синдрома (COPD) астмы и аспирационной пневмонии.

25. Способ по п.23, где заболевание, связанное с активацией комплемента, представляет собой аутоиммунное заболевание, выбранное из группы, состоящей из тяжелой миастении, сахарного диабета первого типа, тиреоидита Хашимото, болезни Аддисона, целиакии, болезни Крона, злокачественной анемии, обыкновенной пузырчатки, витилиго, аутоиммунных гемолитических анемий, паранеопластических синдромов, васкулитного заболевания, ревматической полимиалгии, темпорального артериита и гранулематоза Вегенера.

26. Набор для лечения или профилактики заболевания, связанного с активацией комплемента, где набор отличается тем, что содержит антитело, или его фрагмент, по любому из пп.1-14.

27. Набор по п.26, где заболевание, связанное с активацией комплемента, представляет собой нейродегенеративное расстройство.

28. Набор по п.27, где

нейродегенеративное расстройство связано с потерей синапсов или потерей нервных соединений; и/или

где нейродегенеративное расстройство связано с потерей синапсов, зависимой от рецептора комплемента 3(CR3)/C3 или рецептора комплемента CR1; и/или

где нейродегенеративное расстройство связано с зависимым от патологической активности синаптическим прунингом; и/или

где нейродегенеративное расстройство связано с фагоцитозом синапсов микроглией; и/или

где нейродегенеративное расстройство выбрано из группы, состоящей из болезни Альцгеймера, бокового амиотрофического склероза, рассеянного склероза, глаукомы, миотонической дистрофии, синдрома Дауна, болезни Паркинсона и болезни Хантингтона.

29. Набор по п.26, где заболевание, связанное с активацией комплемента, представляет собой воспалительное заболевание, аутоиммунное заболевание или метаболическое нарушение.

30. Набор по п.29, где воспалительное заболевание, аутоиммунное заболевание или метаболическое нарушение выбрано из группы, состоящей из диабета, ожирения, ревматоидного артрита (RA), острого респираторного дистресс-синдрома (ARDS), отдаленного повреждения ткани после ишемии и реперфузии, активации комплемента во время операции на сердце в условиях искусственного кровообращения, дерматомиозита, пемфигуса, волчаночного нефрита и результирующего гломерулонефрита и васкулита, сердечно-легочного шунтирования, индуцированной кардиоплегией эндотелиальной дисфункции, мембранозно-пролиферативного гломерулонефрита типа II, нефропатии IgA, острой почечной недостаточности, криоглобулинемии, антифосфолипидного синдрома, дегенеративных заболеваний желтого пятна, возрастной дегенерации желтого пятна (AMD), хороидальной неоваскуляризации (CNV), увеита, диабетической ретинопатии, относящейся к ишемии ретинопатии, эндофтальмита, внутриглазного неоваскулярного заболевания, диабетического отека желтого пятна, патологической миопии, болезни фон Гиппеля-Линдау, гистоплазмоза глаз, нейромиеелита зрительного нерва (NMO), окклюзии центральной вены сетчатки (CRVO), неоваскуляризации роговицы, неоваскуляризации сетчатки, алло-трансплантации, сверхострого отторжения, гемодиализа, хронического окклюзионного легочного дистресс-синдрома (COPD), астмы и аспирационной пневмонии.

31. Набор по п.29, где заболевание, связанное с активацией комплемента, представляет собой аутоиммунное заболевание, выбранное из группы, состоящей из тяжелой миастении, сахарного диабета первого типа, тиреоидита Хашимото, болезни Аддисона, целиакии, болезни Крона, злокачественной анемии,

обыкновенной пузырчатки, витилиго, аутоиммунных гемолитических анемий, паранеопластических синдромов, васкулитного заболевания, ревматической полимиалгии, темпорального артериита и гранулематоза Вегенера.

32. Диагностический набор для обнаружения нейрональных синапсов и/или количественного измерения нейрональных синапсов, отличающийся тем, что содержит антитело по любому из пп.1-15 и листовку-вкладыш в упаковке.

33. Способ обнаружения нейрональных синапсов и/или количественного измерения нейрональных синапсов у индивидуума, где способ включает:

а) введение антитела по любому из пп.1-15 индивидууму; и

б) обнаружение и/или количественное измерение антитела, связанного с синапсами, таким образом обнаруживая и/или количественно измеряя синапсы у индивидуума.

34. Способ по п.33, где антитело, связанное с синапсами, обнаруживают, используя методы визуализации, выбранные из группы, состоящей из позитронно-эмиссионной томографии (ПЭТ), рентгеновской компьютерной томографии, однофотонной эмиссионной компьютерной томографии (ОФЭКТ), компьютерной томографии (КТ) и компьютерной аксиальной томографии (КАТ).

35. Способ по п.33 или 34, где индивидуум страдает нейродегенеративным заболеванием или аутоиммунным заболеванием.

36. Способ измерения эффективности лечения нейродегенеративного заболевания и аутоиммунного заболевания, включающий:

а) введение антитела по любому из пп.1-15 индивидууму; и

б) количественное измерение антитела, связанного с нейрональными синапсами, таким образом измеряя количество нейрональных синапсов у индивидуума,

где количественное измерение нейрональных синапсов у индивидуума повторяют в течение периода времени и потерю нейрональных синапсов у индивидуума обнаруживают с течением времени,

где снижение потери нейрональных синапсов с течением времени является, например, показателем эффективности лечения нейродегенеративного заболевания или аутоиммунного заболевания.

37. Способ обнаружения синапсов в биологическом образце, где способ включает:

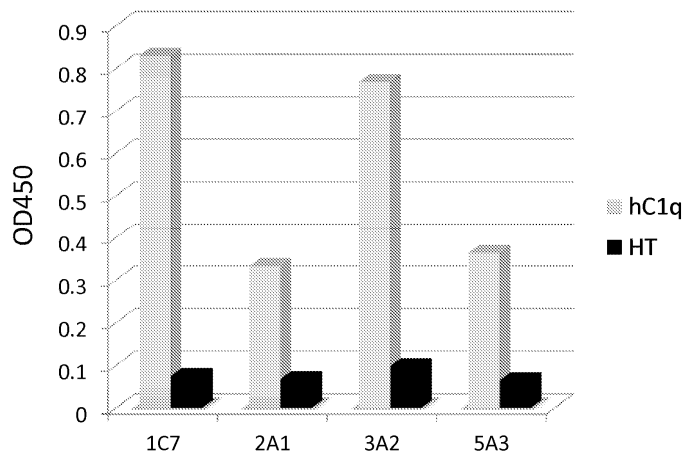
а) взятие биологического образца у индивидуума;

б) приведение биологического образца в контакт с антителом по любому из пп.1-15; и

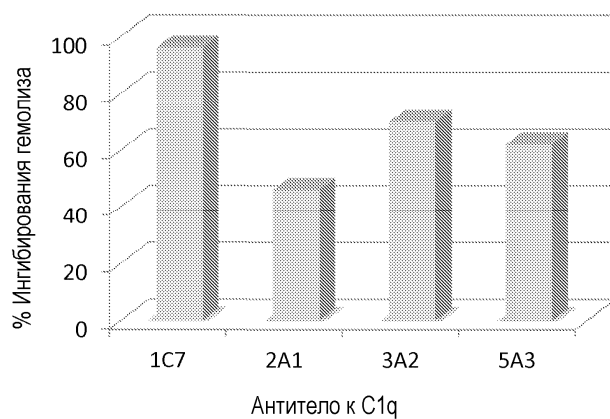
с) обнаружение антитела, связанного с синапсами, таким образом обнаруживая синапсы в биологическом образце.

38. Способ по п.37, где биологический образец содержит биоптат, ткань или клетку.

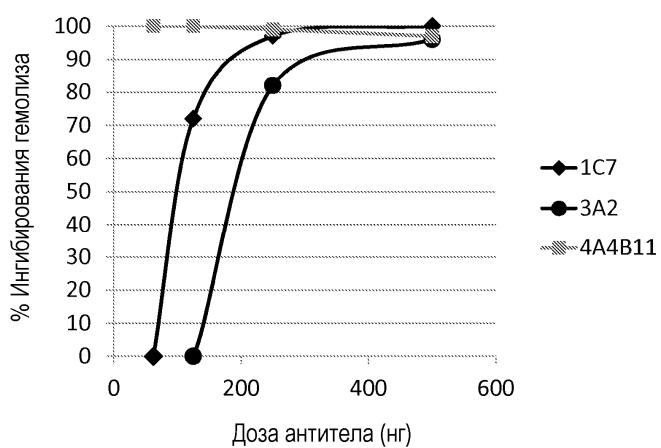
39. Способ по п.37 или 38, где антитело обнаруживают посредством иммунофлуоресцентной микроскопии, иммуноцитохимии, иммуногистохимии, ELISA, анализа методом FACS или иммунопреципитации.



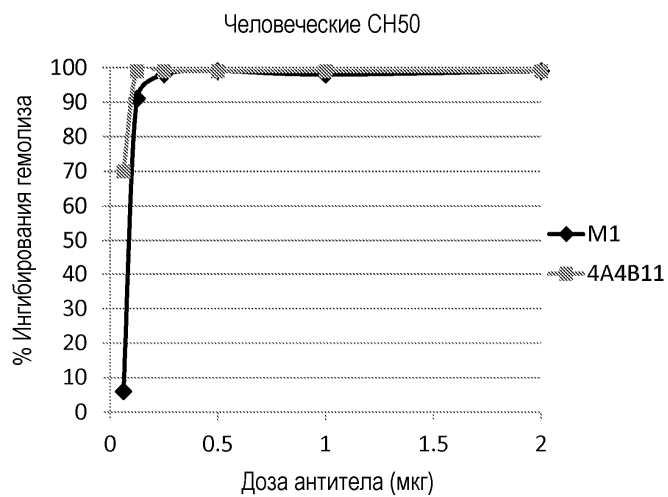
Фиг. 1



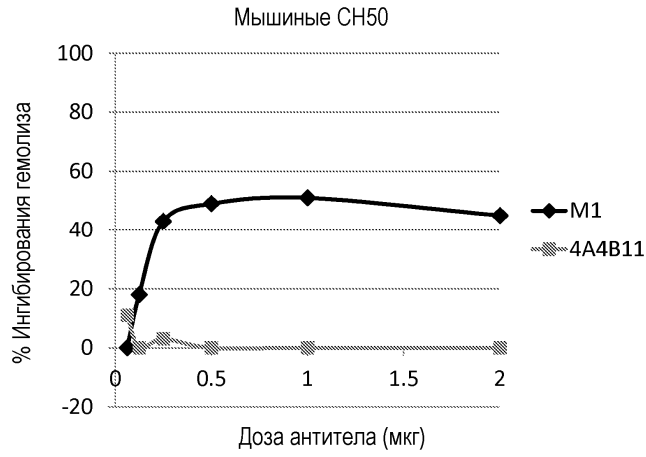
Фиг. 2



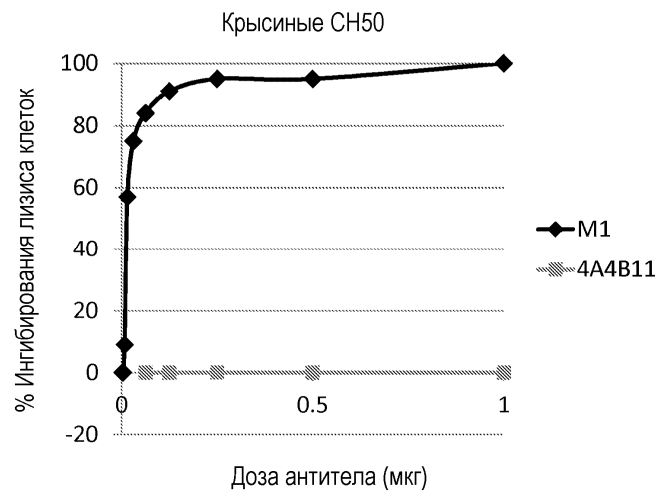
Фиг. 3



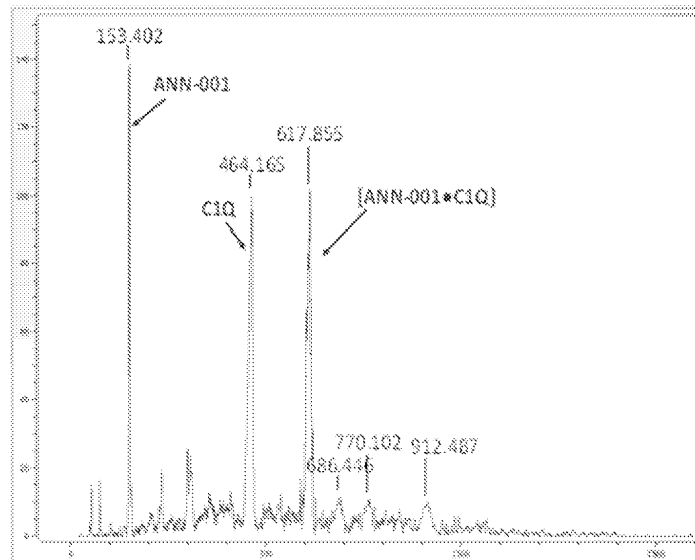
Фиг. 4А



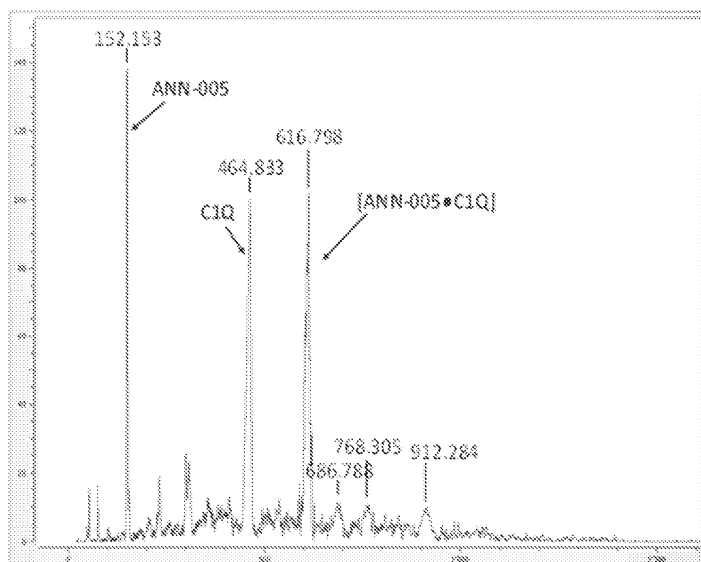
Фиг. 4В



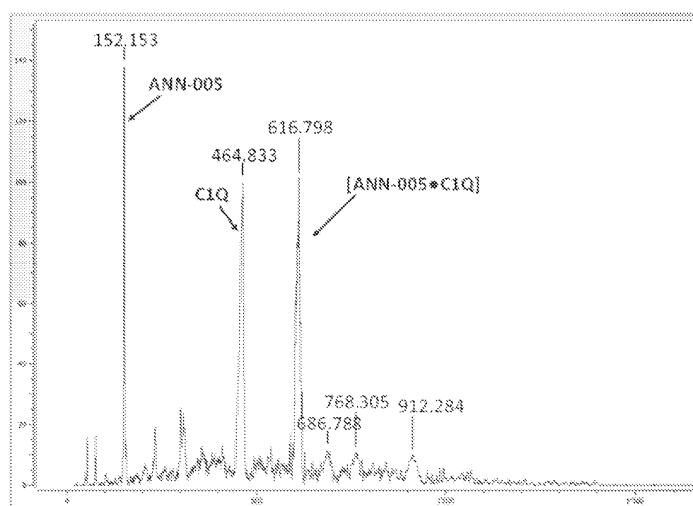
Фиг. 4С



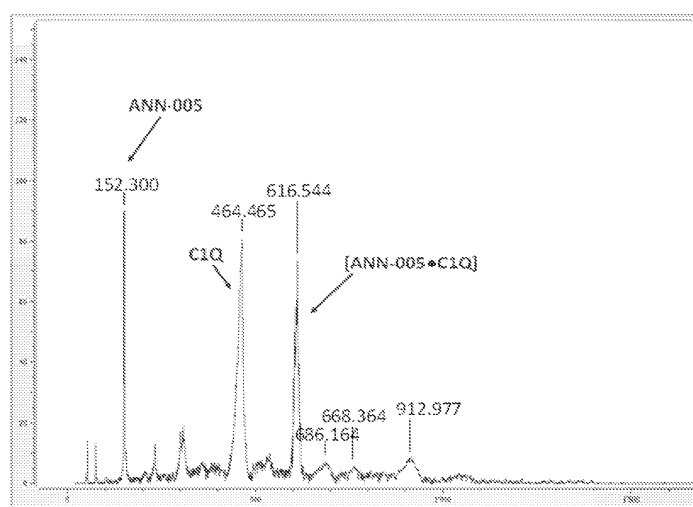
Фиг. 5А



Фиг. 5B



Фиг. 6A



Фиг. 6B

