



(21) 申请号 202180032987.3

(22) 申请日 2021.05.05

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 115996752 A

(43) 申请公布日 2023.04.21

(30) 优先权数据
63/020,245 2020.05.05 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2022.11.03

(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/US2021/030930 2021.05.05

(87) PCT国际申请的公布数据
W02021/242493 EN 2021.12.02

(83) 生物保藏信息
PTA-120399 2013.06.06

(73) 专利权人 J·大卫格莱斯顿研究所-根据
J·大卫格莱斯顿遗嘱的遗嘱信
托

地址 美国加利福尼亚州

专利权人 安尼艾克松股份有限公司

(72) 发明人 J·T·帕斯 S·桑卡拉纳拉亚南
T·耶德诺克

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

专利代理师 缪策 甘玲

(51) Int.Cl.

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 25/08 (2006.01)

G01N 33/532 (2006.01)

(56) 对比文件

CN 105682740 A, 2016.06.15

Season K. Wyatt et al..Enhanced
classical complement pathway activation
and altered phagocytosis signaling
molecules in human epilepsy.《Experimental
neurology》.2017,第295卷第184-193页.

Nicole D. Schartz et al..Status
epilepticus triggers long-lasting
activation of complement C1q-C3
signaling in the hippocampus that
correlates with seizure frequency in
experimental epilepsy.《Neurobiology of
disease》.2018,第109(Pt A)卷第163-173页.

Stephanie S Holden et al..Complement
factor C1q mediates sleep spindle loss
and epileptic spikes after mild brain
injury.《Science》.2021,第373卷(第6560期),
文章号ebj2685.

审查员 柳一夫

权利要求书3页 说明书74页
序列表28页 附图69页

(54) 发明名称

用于治疗癫痫的组合物和方法

(57) 摘要

本公开总体上涉及预防癫痫、降低发生癫痫
的风险或治疗癫痫的方法,所述方法包括向受试
者施用经典补体途径的抑制剂。

1. 抗C1q抗体用于制造用于预防创伤性脑损伤(TBI)诱发的癫痫、降低发生创伤性脑损伤(TBI)诱发的癫痫的风险或治疗创伤性脑损伤(TBI)诱发的癫痫的药物的应用,其中所述抗C1q抗体包括:

轻链可变结构域,所述轻链可变结构域包含具有SEQ ID NO:5的氨基酸序列的HVR-L1、具有SEQ ID NO:6的氨基酸的HVR-L2和具有SEQ ID NO:7的氨基酸的HVR-L3;以及

重链可变结构域,所述重链可变结构域包含具有SEQ ID NO:9的氨基酸序列的HVR-H1、具有SEQ ID NO:10的氨基酸的HVR-H2和具有SEQ ID NO:11的氨基酸的HVR-H3。

2. 如权利要求1所述的应用,其中所述TBI诱发的癫痫是创伤后癫痫。

3. 如权利要求1或2所述的应用,其中所述药物用于在发作期间或发作后的前4周内施用。

4. 如权利要求1或2所述的应用,其中所述药物用于在发作期间或发作后的第一周内施用。

5. 如权利要求1或2所述的应用,其中所述药物用于在发作期间或发作后的24小时内施用。

6. 如权利要求1或2所述的应用,其中所述药物用于在发作期间或发作后的1、2、3、4、5或6小时内施用。

7. 如权利要求1或2所述的应用,其中所述抗C1q抗体抑制由发作诱导的突触损失。

8. 如权利要求1或2所述的应用,其中所述药物用于向患有缺氧性脑损伤、脑感染、中风或遗传综合征的受试者施用。

9. 如权利要求8所述的应用,其中所述脑感染为脑炎、脑膜炎、内侧颞叶硬化症或脑肿瘤。

10. 如权利要求8所述的应用,其中所述抗C1q抗体抑制由创伤性脑损伤、缺氧性脑损伤、脑感染、中风或遗传综合征诱导的突触损失。

11. 如权利要求8所述的应用,其中所述药物用于在创伤性脑损伤、缺氧性脑损伤、脑感染或中风期间或之后的前4周内施用。

12. 如权利要求8所述的应用,其中所述药物用于在创伤性脑损伤、缺氧性脑损伤、脑感染或中风期间或之后的第一周内施用。

13. 如权利要求8所述的应用,其中所述药物用于在创伤性脑损伤、缺氧性脑损伤、脑感染或中风期间或之后的24小时内施用。

14. 如权利要求8所述的应用,其中所述药物用于在创伤性脑损伤、缺氧性脑损伤、脑感染或中风期间或之后的1、2、3、4、5或6小时内施用。

15. 如权利要求1或2所述的应用,其中所述抗C1q抗体抑制C1q与自身抗体之间或C1q与C1r之间或C1q与C1s之间的相互作用。

16. 如权利要求1或2所述的应用,其中所述抗C1q抗体促进从循环或组织中清除C1q。

17. 如权利要求1或2所述的应用,其中所述抗C1q抗体具有范围介于100nM至0.005nM或小于0.005nM的解离常数(K_D)。

18. 如权利要求1或2所述的应用,其中所述抗C1q抗体以范围介于20:1至1.0:1或小于1.0:1的结合化学计量结合C1q。

19. 如权利要求18所述的应用,其中所述抗C1q抗体以范围介于6:1至1.0:1或小于1.0:

1的结合化学计量结合C1q。

20.如权利要求19所述的应用,其中所述抗C1q抗体以范围介于2.5:1至1.0:1或小于1.0:1的结合化学计量结合C1q。

21.如权利要求1或2所述的应用,其中所述抗C1q抗体特异性结合至C1q并中和C1q的生物活性。

22.如权利要求21所述的应用,其中所述生物活性是(1)C1q与自身抗体的结合,(2)C1q与C1r的结合,(3)C1q与C1s的结合,(4)C1q与IgM的结合,(5)C1q与IgG的结合,(6)C1q与磷脂酰丝氨酸的结合,(7)C1q与正五聚蛋白-3的结合,(8)C1q与C-反应蛋白(CRP)的结合,(9)C1q与球状C1q受体(gC1qR)的结合,(10)C1q与补体受体1(CR1)的结合,(11)C1q与 β -淀粉样蛋白的结合,(12)C1q与钙网蛋白的结合,(13)C1q与凋亡细胞的结合,或(14)C1q与B细胞的结合。

23.如权利要求21所述的应用,其中所述生物活性是(1)经典补体活化途径的活化,(2)抗体和补体依赖性细胞毒性的活化,(3)CH50溶血,(4)突触损失,(5)B细胞抗体产生,(6)树突细胞成熟,(7)T细胞增殖,(8)细胞因子产生,(9)小胶质细胞活化,(10)免疫复合物形成,(11)突触或神经末梢的吞噬作用,(12)补体受体3(CR3/C3)表达细胞的活化或(13)神经炎症。

24.如权利要求23所述的应用,其中CH50溶血包括人、小鼠、大鼠、狗、恒河猴和/或食蟹猴CH50溶血。

25.如权利要求23所述的应用,其中所述抗C1q抗体能够中和50%至90%的CH50溶血。

26.如权利要求23所述的应用,其中所述抗C1q抗体能够以小于150ng/ml、小于100ng/ml、小于50ng/ml或小于20ng/ml的剂量中和至少50%的CH50溶血。

27.如权利要求1或2所述的应用,其中所述抗C1q抗体是单克隆抗体、多克隆抗体、重组抗体、人源化抗体、嵌合抗体、多特异性抗体或其抗原结合片段。

28.如权利要求27所述的应用,其中所述抗原结合片段是Fab片段、Fab'片段、F(ab')₂片段、Fv片段或单链抗体分子。

29.如权利要求1或2所述的应用,其中所述抗C1q抗体偶联到标记基团。

30.如权利要求29所述的应用,其中所述标记基团是光学标记、放射性同位素、放射性核素、酶促基团、生物素基基团、核酸或酶。

31.如权利要求30所述的应用,其中所述光学标记是荧光标记。

32.如权利要求30所述的应用,其中所述核酸是寡核苷酸。

33.如权利要求1或2所述的应用,其中所述抗C1q抗体包含轻链可变结构域,所述轻链可变结构域包含与选自SEQ ID NO:4和35-38的氨基酸序列具有约95%同源性的氨基酸序列,并且其中所述轻链可变结构域包含具有SEQ ID NO:5的氨基酸序列的HVR-L1、具有SEQ ID NO:6的氨基酸的HVR-L2和具有SEQ ID NO:7的氨基酸的HVR-L3。

34.如权利要求33所述的应用,其中所述轻链可变结构域包含选自SEQ ID NO:4和35-38的氨基酸序列。

35.如权利要求1或2所述的应用,其中所述抗C1q抗体包含重链可变结构域,所述重链可变结构域包含与选自SEQ ID NO:8和31-34的氨基酸序列具有约95%同源性的氨基酸序列,并且其中所述重链可变结构域包含具有SEQ ID NO:9的氨基酸序列的HVR-H1、具有SEQ

ID NO:10的氨基酸的HVR-H2和具有SEQ ID NO:11的氨基酸的HVR-H3。

36.如权利要求35所述的应用,其中所述重链可变结构域包含选自SEQ ID NO:8和31-34的氨基酸序列。

37.如权利要求27所述的应用,其中所述抗原结合片段包含SEQ ID NO:39的重链Fab片段和SEQ ID NO:40的轻链Fab片段。

用于治疗癫痫的组合物和方法

[0001] 关于联邦政府资助研究的声明

[0002] 本发明是在政府支持下由ARMY/MRMC授予的W81XWH-16-1-0576项目下完成的。政府对本发明享有一定的权利。

[0003] 相关申请

[0004] 本专利申请要求2020年5月5日提交的美国临时专利申请第63/020,245号的优先权,所述美国临时专利申请在此通过引用以其整体并入。

[0005] 序列表

[0006] 本申请含有以ASCII格式以电子形式提交并在此通过引用以其整体并入的序列表。所述ASCII副本创建于2021年5月3日,命名为ANH-01025_SL.txt,且大小为41,770字节。

背景技术

[0007] 癫痫是一种常见的神经学病症,并且已经被鉴定为具有神经细胞损伤或损失的最普遍的神经学病症之一。根据世界卫生组织的估计,全世界大约有5000万人受到癫痫的影响,并且接近80%的受影响个体居住在发展中国家。每十个人中就有一个人在正常寿命期间至少会有一次癫痫发作,并且这些中的三分之一会发展成癫痫。虽然所有年龄组都可能受到癫痫发作的影响,但该病症在年轻人和老年人中最为普遍。癫痫是美国最常见的严重神经学病症之一,并且通常需要长期治疗。每年,美国有150,000人被新诊断为患有癫痫。

[0008] 尽管最近有抗癫痫药物(依佐加滨、普瑞巴林、左乙拉西坦、拉莫三嗪、托吡酯、丙戊酸盐、卢非酰胺、加巴喷丁、卡马西平、氯硝西泮、奥卡西平、苯巴比妥和苯妥英)可用,但可用的治疗选项不足以有效预防或治疗疾病,并且发作仍然难以完全根除;约三分之一的患者仍然有无法控制的发作,并且甚至更大比例患有至少一种抗惊厥药相关的副作用(例如情绪变化、嗜睡或步态不稳)。另外,尽管发作代表癫痫最显著的特征,但许多癫痫患者发展成神经学或精神病学疾病(记忆或认知障碍,抑郁.....)。例如,内侧颞叶癫痫通常伴有记忆缺陷,这可能是由于海马系统损伤和/或脑炎症。

[0009] 虽然癫痫的治疗在过去十年中有所发展,但可用的治疗选项集中在防止发作上,而当前的药物治疗可能无法治愈或甚至改善疾病的进程。目前可用的抗癫痫药物似乎不是抗癫痫发生的。这可能是由于事实上目前的剂以机制上不适当的方式起作用以预防疾病进展。因此,本领域需要预防和治疗癫痫的新疗法。

发明内容

[0010] 本公开总体上涉及通过抑制补体活化(例如通过抑制经典补体途径)来预防癫痫、降低发生癫痫的风险或治疗癫痫的方法。

[0011] 本公开总体上涉及通过抑制经典补体活化例如通过抑制补体因子C1q、C1r或C1s,例如通过施用抗体诸如单克隆抗体、嵌合抗体、人源化抗体、抗体片段、抗体衍生物等(其结合一种或多种这些补体因子)来预防癫痫、降低发生癫痫的风险或治疗癫痫(所述癫痫例如特发性全身性癫痫、特发性部分性癫痫、症状性全身性癫痫或症状性部分性癫痫)的方法。

[0012] 在一些实施方案中,抑制补体因子诸如C1q、C1r或C1s的活性以阻断经典补体途径的活化并减缓或预防癫痫(诸如特发性全身性癫痫、特发性部分性癫痫、症状性全身性癫痫或症状性部分性癫痫)。经典补体途径的抑制使凝集素和替代补体途径保持完整,以执行其正常的免疫功能。本文公开了与中和癫痫(诸如特发性全身性癫痫、特发性部分性癫痫、症状性全身性癫痫或症状性部分性癫痫)中的补体因子(例如C1q、C1r或C1s)相关的方法。

[0013] 在一个方面,本公开提供了预防癫痫、降低发生癫痫的风险或治疗癫痫的方法(所述癫痫诸如特发性全身性癫痫、特发性部分性癫痫、症状性全身性癫痫或症状性部分性癫痫(例如颞叶癫痫)),其提供了包括向受试者施用经典补体途径的抑制剂。

[0014] 还提供了许多实施方案,这些实施方案可以应用于本文描述的本发明的任何方面。例如,在一些实施方案中,抑制剂在发作期间或发作后的前4周内、在发作期间或发作后的第一周内、在发作期间或发作后的24小时内、或者在发作期间或发作后的1、2、3、4、5或6小时内施用。在一些实施方案中,抑制剂抑制由发作诱导的突触损失。在一些实施方案中,将抑制剂施用于患有创伤性脑损伤、缺氧性脑损伤、脑感染、中风或遗传综合征的患者。脑感染可能是脑炎、脑膜炎、内侧颞叶硬化症或脑肿瘤。癫痫可由创伤性脑损伤、缺氧性脑损伤、脑感染、中风或遗传综合征诱发。癫痫可以是TBI诱发的癫痫。在一些实施方案中,抑制剂抑制由创伤性脑损伤、缺氧性脑损伤、脑感染、中风或遗传综合征诱导的突触损失。在一些实施方案中,抑制剂在创伤性脑损伤、缺氧性脑损伤、脑感染或中风发作期间或发作后的前4周内;在创伤性脑损伤、缺氧性脑损伤、脑感染或中风发作期间或发作后的第一周内;在创伤性脑损伤、缺氧性脑损伤、脑感染或中风发作期间或发作后的24小时内;或者在创伤性脑损伤、缺氧性脑损伤、脑感染或中风发作期间或发作后的1、2、3、4、5或6小时内施用。

[0015] 在一些实施方案中,经典补体途径的抑制剂是C1q抑制剂。例如,C1q抑制剂可以是抗体、适体、反义核酸或基因编辑剂。在一些实施方案中,抗体是抗C1q抗体。在一些实施方案中,抗C1q抗体抑制C1q与自身抗体之间或C1q与C1r之间或C1q与C1s之间的相互作用。在一些实施方案中,抗C1q抗体促进从循环或组织中清除C1q。在一些实施方案中,抗体是具有范围介于100nM至0.005nM或小于0.005nM的解离常数(KD)的抗C1q抗体。在一些实施方案中,抗体是以范围介于20:1至1.0:1或小于1.0:1的结合化学计量结合C1q、以范围介于6:1至1.0:1或小于1.0:1的结合化学计量结合C1q、或以范围介于2.5:1至1.0:1或小于1.0:1的结合化学计量结合C1q的抗C1q抗体。在一些实施方案中,抗体特异性结合并中和C1q的生物活性,诸如(1)C1q与自身抗体的结合,(2)C1q与C1r的结合,(3)C1q与C1s的结合,(4)C1q与IgM的结合,(5)C1q与IgG的结合,(6)C1q与磷脂酰丝氨酸的结合,(7)C1q与正五聚蛋白-3的结合,(8)C1q与C-反应蛋白(CRP)的结合,(9)C1q与球状C1q受体(gC1qR)的结合,(10)C1q与补体受体1(CR1)的结合,(11)C1q与 β -淀粉样蛋白的结合,(12)C1q与钙网蛋白的结合,(13)C1q与凋亡细胞的结合,或(14)C1q与B细胞的结合。生物活性的另一个实例是(1)经典补体活化途径的活化,(2)抗体和补体依赖性细胞毒性的活化,(3)CH50溶血,(4)突触损失,(5)B细胞抗体产生,(6)树突细胞成熟,(7)T细胞增殖,(8)细胞因子产生,(9)小胶质细胞活化,(10)免疫复合物形成,(11)突触或神经末梢的吞噬作用,(12)补体受体3(CR3/C3)表达细胞的活化或(13)神经炎症。在一些实施方案中,CH50溶血包括人、小鼠、大鼠、狗、恒河猴和/或食蟹猴CH50溶血。在一些实施方案中,在小于150ng/ml、小于100ng/ml、小于50ng/ml或小于20ng/ml的剂量下,抗体能够中和至少约50%至至少约90%的CH50溶血,或中和至少50%的

CH50溶血。

[0016] 抗体可以是单克隆抗体、多克隆抗体、重组抗体、人源化抗体、嵌合抗体、多特异性抗体、抗体片段或其抗体衍生物,诸如Fab片段、Fab'片段、F(ab')₂片段、Fv片段、双体抗体或单链抗体分子。抗体可以与标记基团偶联,诸如光学标记、放射性同位素、放射性核素、酶促基团、生物素基基团、核酸、寡核苷酸、酶或荧光标记。

[0017] 在一些优选的实施方案中,抗体包含轻链可变结构域,所述轻链可变结构域包含具有SEQ ID NO:5的氨基酸序列的HVR-L1、具有SEQ ID NO:6的氨基酸的HVR-L2和具有SEQ ID NO:7的氨基酸的HVR-L3。类似地,在一些优选的实施方案中,抗体包含重链可变结构域,所述重链可变结构域包含具有SEQ ID NO:9的氨基酸序列的HVR-H1、具有SEQ ID NO:10的氨基酸的HVR-H2和具有SEQ ID NO:11的氨基酸的HVR-H3。在一些实施方案中,抗体包含轻链可变结构域,所述轻链可变结构域包含与选自SEQ ID NO:4和35-38的氨基酸序列具有至少约95%同源性的氨基酸序列,并且其中轻链可变结构域包含具有SEQ ID NO:5的氨基酸序列的HVR-L1、具有SEQ ID NO:6的氨基酸的HVR-L2和具有SEQ ID NO:7的氨基酸的HVR-L3。在一些实施方案中,轻链可变结构域包含选自SEQ ID NO:4和35-38的氨基酸序列。在一些实施方案中,抗体包含重链可变结构域,所述重链可变结构域包含与选自SEQ ID NO:8和31-34的氨基酸序列具有至少约95%同源性的氨基酸序列,并且其中所述重链可变结构域包含具有SEQ ID NO:9的氨基酸序列的HVR-H1、具有SEQ ID NO:10的氨基酸的HVR-H2和具有SEQ ID NO:11的氨基酸的HVR-H3。在一些实施方案中,所述重链可变结构域包含选自SEQ ID NO:8和31-34的氨基酸序列。在其它优选的实施方案中,抗体片段包含SEQ ID NO:39的重链Fab片段和SEQ ID NO:40的轻链Fab片段。

[0018] 在其他实施方案中,经典补体途径的抑制剂是C1r抑制剂。在一些实施方案中,C1r抑制剂是抗体、适体、反义核酸或基因编辑剂。在一些实施方案中,抗体是抗C1r抗体。在一些实施方案中,抗C1r抗体抑制C1r与C1q之间或C1r与C1s之间的相互作用,或者其中抗C1r抗体抑制C1r的催化活性,或其抑制原-C1r加工成活性蛋白酶。在一些实施方案中,抗体是具有范围介于100nM至0.005nM或小于0.005nM的解离常数(KD)的抗C1r抗体。在一些实施方案中,抗体是以范围介于20:1至1.0:1或小于1.0:1、范围介于6:1至1.0:1或小于1.0:1、或范围介于2.5:1至1.0:1或小于1.0:1的结合化学计量结合C1r的抗C1r抗体。在一些实施方案中,抗C1r抗体促进从循环或组织中清除C1r。

[0019] 在其他实施方案中,经典补体途径的抑制剂是C1s抑制剂。C1s抑制剂可以是抗体、适体、反义核酸或基因编辑剂。在一些实施方案中,抗体是抗C1s抗体。在一些实施方案中,抗C1s抗体抑制C1s与C1q之间、或C1s与C1r之间、或C1s与C2或C4之间的相互作用,或者其中抗C1s抗体抑制C1s的催化活性,或其抑制原-C1s加工成活性蛋白酶,或其与活化形式的C1s结合。在一些实施方案中,抗体是具有范围介于100nM至0.005nM或小于0.005nM的解离常数(KD)的抗C1s抗体。在一些实施方案中,抗体是以范围介于20:1至1.0:1或小于1.0:1、范围介于6:1至1.0:1或小于1.0:1、或范围介于2.5:1至1.0:1或小于1.0:1的结合化学计量结合C1s的抗C1s抗体。在一些实施方案中,抗C1s抗体促进从循环或组织中清除C1s。

[0020] 在其它实施方案中,经典补体途径的抑制剂是抗C1复合物抗体,任选地其中抗C1复合物抗体抑制C1r或C1s活化或阻止它们作用于C2或C4的能力,例如,抗C1复合物抗体与C1复合物内的组合表位结合,其中所述组合表位包含C1q和C1s两者的氨基酸;C1q和C1r两

者的氨基酸;C1r和C1s两者的氨基酸;或C1q、C1r和C1s中的每一者的氨基酸。抗体可以是单克隆抗体。在一些实施方案中,抗体抑制C4的切割而不抑制C2的切割,或抑制C2的切割而不抑制C4的切割。

[0021] 在一些实施方案中,抗体结合哺乳动物C1q、C1r或C1s,或结合人C1q、C1r或C1s。在一些实施方案中,抗体结合哺乳动物C1复合物。

[0022] 在一些实施方案中,抗体是小鼠抗体、人抗体、人源化抗体或嵌合抗体。在一些实施方案中,抗体是选自Fab、Fab'-SH、Fv、scFv和F(ab')₂片段的抗体片段。在一些实施方案中,抗体是识别第一抗原和第二抗原的双特异性抗体。例如,第一抗原可以选自C1q、C1r和C1s,并且第二抗原可以是促进跨血脑屏障转运的抗原。第二抗原可以是转铁蛋白受体(TR)、胰岛素受体(HIR)、胰岛素生长因子受体(IGFR)、低密度脂蛋白受体相关蛋白1和2(LPR-1和2)、白喉毒素受体、CRM197、美洲驼单结构域抗体、TMEM 30(A)、蛋白质转导结构域、TAT、Syn-B、穿膜素、聚精氨酸肽、血管肽肽或ANG1005。

[0023] 在一些实施方案中,抗体抑制经典补体活化途径的量范围介于至少30%至至少99.9%。在一些实施方案中,抗体抑制由C1q结合启动的替代补体活化途径。在一些实施方案中,抗体抑制替代补体活化途径的量范围介于至少30%至至少99.9%。在一些实施方案中,抗体抑制补体依赖性细胞介导的细胞毒性(CDCC),例如,抗体抑制补体依赖性细胞介导的细胞毒性(CDCC)活化途径的量范围介于至少30%至至少99.9%。在一些实施方案中,抗体抑制自身抗体和补体依赖性细胞介导的细胞毒性(CDCC)。

[0024] 在一些实施方案中,方法进一步包括施用选自抗C1q抗体、抗C1r抗体和抗C1s抗体的二级抗体。在一些实施方案中,方法进一步包括向受试者施用治疗有效量的抗体依赖性细胞毒性(ADCC)的抑制剂。在一些实施方案中,方法进一步包括向受试者施用治疗有效量的经典补体活化途径的抑制剂。在一些实施方案中,方法进一步包括向受试者施用治疗有效量的替代补体活化途径的抑制剂。在一些实施方案中,方法进一步包括向受试者施用治疗有效量的自身抗体与其相应自身抗原之间的相互作用的抑制剂。

[0025] 在另一方面,一种确定受试者因创伤性脑损伤、缺氧性脑损伤、脑感染、中风或遗传综合征而发生癫痫的风险的方法,其提供了包括:(a)向受试者施用抗C1q、抗C1r或抗C1s抗体,其中抗C1q、抗C1r或抗C1s抗体与可检测标记偶联;(b)检测可检测标记以测量受试者中C1q、C1r或C1s的量或位置;以及(c)将C1q、C1r或C1s中的一种或多种的量或位置与参照进行比较,其中基于C1q、C1r或C1s中的一种或多种的量或位置与参照的比较来表征发生癫痫的风险。在一些实施方案中,脑感染是脑炎、脑膜炎、内侧颞叶硬化症或脑肿瘤。可检测标记可以包括核酸、寡核苷酸、酶、放射性同位素、生物素或荧光标记。在一些实施方案中,抗体是选自Fab、Fab'-SH、Fv、scFv和F(ab')₂片段的抗体片段。

[0026] 在一些实施方案中,抗C1q抗体包含轻链可变结构域,所述轻链可变结构域包含具有SEQ ID NO:5的氨基酸序列的HVR-L1、具有SEQ ID NO:6的氨基酸的HVR-L2和具有SEQ ID NO:7的氨基酸的HVR-L3。在一些实施方案中,抗C1q抗体包含重链可变结构域,所述重链可变结构域包含具有SEQ ID NO:9的氨基酸序列的HVR-H1、具有SEQ ID NO:10的氨基酸的HVR-H2和具有SEQ ID NO:11的氨基酸的HVR-H3。在一些实施方案中,抗C1q抗体包含轻链可变结构域,所述轻链可变结构域包含与选自SEQ ID NO:4和35-38的氨基酸序列具有至少约95%同源性的氨基酸序列,并且其中轻链可变结构域包含具有SEQ ID NO:5的氨基酸序列

的HVR-L1、具有SEQ ID NO:6的氨基酸的HVR-L2和具有SEQ ID NO:7的氨基酸的HVR-L3。在一些实施方案中,轻链可变结构域包含选自SEQ ID NO:4和35-38的氨基酸序列。在一些实施方案中,抗C1q抗体包含重链可变结构域,所述重链可变结构域包含与选自SEQ ID NO:8和31-34的氨基酸序列具有至少约95%同源性的氨基酸序列,并且其中所述重链可变结构域包含具有SEQ ID NO:9的氨基酸序列的HVR-H1、具有SEQ ID NO:10的氨基酸的HVR-H2和具有SEQ ID NO:11的氨基酸的HVR-H3。在一些实施方案中,所述重链可变结构域包含选自SEQ ID NO:8和31-34的氨基酸序列。

[0027] 在一些实施方案中,癫痫是特发性全身性癫痫、特发性部分性癫痫、症状性全身性癫痫或症状性部分性癫痫(例如,颞叶癫痫)。在一些实施方案中,症状性全身性癫痫或症状性部分性癫痫由创伤性脑损伤诱发。

附图说明

[0028] 图1A-1E描绘了在mTBI后三周,损伤的皮层和功能性连接的丘脑显示出慢性炎症和神经元损失。图1A-1B显示了小鼠冠状脑剖面的示意图,显示了受控皮层冲击的部位和深度(图1A)以及S1皮层和nRT和VB丘脑区域的位置(图1B)。冲击器直径为3mm,冲击深度为0.8mm,到达右侧躯体感觉皮层。图1C显示了对C1q染色的mTBI小鼠的代表性冠状脑剖面。海马体中的双侧C1q表达是典型的生理条件,并且在假手术和mTBI小鼠中都存在。图1D显示了S1(上图)、VB和nRT(中图)的特写图像,以及nRT(下图)的共聚焦图像,其对C1q、神经元标记物NeuN、星形胶质细胞标志物GFAP和小胶质细胞/巨噬细胞标记物IBA1染色。右S1皮层的损伤部位用星号标记。nRT中的箭头指示共聚焦图像的位置。比例尺,300 μ m(上图/中图)和20 μ m(下图)。图1E显示了假手术和mTBI小鼠中同侧和对侧区域之间荧光比率的定量。数据代表从最小值到最大值的所有点,采用曼-惠特尼检验,并且 $\alpha=0.05$ (* $p<0.05$,** $p<0.01$)。分析包括每组五至七只小鼠(n =每只小鼠三个切片,每个区域一个图像)。

[0029] 图2A-2I描绘了在mTBI后三周,与损伤皮层同侧的nRT显示出神经元损失和改变的IPSC和EPSC特性。图2A-2C显示了nRT的高倍冠状图像,显示了“头”、“体”和“尾”的划分(图2A),以及整个同侧nRT的神经元计数的量化(图2B)或每个细分的神经元计数的量化,归一化为假手术组的中值(图2C)。神经元计数数据代表平均值 $\pm$ SEM,采用曼-惠特尼检验, $\alpha=0.05$ (* $p<0.05$,** $p<0.01$)。分析包括每组六只小鼠(n =平均每只小鼠三个切片)。图2D-2E显示了来自假手术和mTBI小鼠中代表性nRT神经元的自发IPSC记录(图2D),以及来自四只假手术小鼠的13只后nRT神经元和来自六只mTBI组小鼠的22只后nRT神经元的频率和振幅分布(图2E)。IPSC数据代表平均值 $\pm$ SEM,采用曼-惠特尼检验分析,并且 $\alpha=0.05$ (* $p<0.05$)。图2F-2G显示了来自假手术和mTBI小鼠中代表性nRT神经元的自发EPSC记录(图2F),以及来自六只假手术小鼠的11只后nRT神经元和来自七只mTBI小鼠的九只后nRT神经元的频率和振幅分布(图2G)。插图显示了来自假手术和mTBI小鼠的单个nRT神经元的平均EPSC迹线,以相同的比例绘制。EPSC数据代表采用曼-惠特尼检验分析的平均值 $\pm$ SEM, $\alpha=0.05$ (* $p<0.05$)。图2H显示了具有假手术(左图)和mTBI(右图)的Thy1-GCaMP6f小鼠的冠状脑剖面的代表性图像(损伤部位用星号标记)。下图显示了从皮层到VB和nRT的投影终端。比例尺,1mm(上图)和500 μ m(下图)。在 $n=6$ 只mTBI小鼠中观察到从皮层到VB和nRT的投影终端减少(用箭头标记)。图2I显示了假手术和mTBI小鼠中同侧和对侧区域之间Thy1-GCaMP荧光

比率的定量。数据代表从最小值到最大值的所有点,采用曼-惠特尼检验,并且 $\alpha=0.05$ (* $p<0.05$, ** $p<0.01$)。分析包括五只假手术小鼠和六只mTBI小鼠 (n =每只小鼠三个切片,每个区域一个图像)。

[0030] 图3A-3H描绘了单核RNA测序显示小胶质细胞是mTBI后三周丘脑中C1q的来源。图3A描绘了显示丘脑组织解剖位置的冠状脑剖面的示意图。图3B、3C和3E显示了通过细胞类型谱系(图3B)、细胞核C1qa表达(图3C)或C4b表达(图3E)着色的单核($n=4,908$ 个假手术细胞, $n=4,338$ 个mTBI细胞,数据清理后)的一致流形逼近和投影(UMAP)投影。图8A中描述的谱系标志物。使用填补渲染着色。上面显示了归一化的表达比例,0-最大,每个小图都有最大值。图3D和3F显示了来自假手术和mTBI小鼠的聚类3(寡核苷酸3,图9E)的小胶质细胞核中C1qa表达(图3D)和少突胶质细胞核中C4b表达(图3F)的小提琴图,采用Wilcoxon秩和检验分析($n.s.$ =无统计学差异)。分析结合了两种技术重复,共同代表九只假手术小鼠和十只mTBI小鼠。每个点代表一个单核。图3G和3H显示了大量细胞质RNA中C1qa(图3E)和C4b(图3H)转录物的RT-qPCR定量。每个点代表从一个重复中提取的大量RNA(n =两个生物库,每个点代表 n =三个技术重复)。第一个重复包括五只假手术小鼠和六只mTBI小鼠,并且第二个重复包括四只假手术小鼠和四只mTBI小鼠。

[0031] 图4A-4C显示mTBI后三周,抗C1q抗体减少了慢性炎症和神经元损失。图4A和4B显示了来自mTBI组小鼠的代表性冠状脑剖面(图4A)和特写(图4B)的S1(上图)、VB和nRT(下图),所述mTBI组小鼠用抗C1q抗体治疗并对C1q、NeuN、GFAP和IBA1染色。右S1皮层的损伤部位用星号标记。比例尺,1mm(A),500 μ m(B)。图4C显示了在对照和抗体处理的假手术和mTBI小鼠中同侧和对侧区域之间nRT神经元计数和荧光比率的定量。数据代表从最小值到最大值的所有点,采用曼-惠特尼检验,并且 $\alpha=0.05$ (* $p<0.05$, ** $p<0.01$)。分析包括每组六至八只小鼠 (n =每只小鼠三个切片,每个区域一个图像)。

[0032] 图5A-5H描绘了慢性记录的mTBI组小鼠在不同的ECoG频带上显示出改变的功率。图5A显示了假手术小鼠(左图)和在mTBI的前24小时内在相同时间点mTBI小鼠(右图)的代表性10分钟光谱图,覆盖有来自同侧S1的ECoG迹线。mTBI组光谱图显示电记录发作,而假手术光谱图显示正常的ECoG活动。颜色条代表功率(mV²/Hz)。图5B显示了假手术小鼠(左图)和mTBI小鼠(右图)的代表性七天光谱图,显示了mTBI后两至三周不同频带的功率。每30分钟对功率频带进行一次采样。颜色条代表功率(mV²/Hz)。图5C、5E、和5G显示了在mTBI后第一周(图5C)、第三周(图5E)和第11周(图5G)平均的假手术和mTBI的ECoG活动的功率谱密度。C中的插图显示了来自代表性假手术和mTBI小鼠的功率谱密度图的实例。详细信息参见方法。图5D、5F和5H显示了mTBI后第一周(图5D)、第三周(图5F)和第11周(图5H)各频带平均功率的双因素方差分析。每个点代表一只小鼠的功率。数据代表记录的所有小鼠,用双因素方差分析(* $p<0.05$, ** $p<0.01$),即使它们在实验终点之前死亡或电池耗尽。 n =七只假手术小鼠,11只mTBI小鼠。一只小鼠在mTBI后两天内死亡。在mTBI后的第一周记录剩余的小鼠,然后每隔一周记录,直到mTBI后的第十一周。 $\delta=1-4\text{Hz}$, $\theta=5-8\text{Hz}$, $\alpha=9-12\text{Hz}$, $\sigma=13-15\text{Hz}$, $\beta=16-30\text{Hz}$, $\gamma=31-50\text{Hz}$ 。

[0033] 图6A-6E显示,在患有mTBI的小鼠中,抗C1q抗体对ECoG光谱特征具有适度的影响。图6A显示了对照处理的小鼠(左图)和抗体处理的小鼠(右图)的实例光谱图(上图)和直方图(下图),显示了mTBI后一个月在不同频带上的功率。每30分钟对功率频带进行一次采样。

颜色条代表功率(mV²/Hz)。图6B和6D显示了mTBI后第一周(图6B)或第三周(图6D)平均的对照处理和抗体处理的mTBI组群的ECoG活动的功率谱密度。插图显示了来自代表性的对照处理的mTBI组小鼠和抗体处理的mTBI组小鼠的功率谱密度图的实例。图6C和6E显示了mTBI后第一周(图6C)和第三周(图6E)各频段平均功率的双因素方差分析。每个点代表一只小鼠的功率。数据代表记录的所有小鼠,用双因素方差分析,即使它们在治疗结束前死亡。 $n=7$ 只对照处理的小鼠,七只抗体处理的小鼠。 $\delta=1-4\text{Hz}$, $\theta=5-8\text{Hz}$, $\alpha=9-12\text{Hz}$, $\sigma=13-15\text{Hz}$, $\beta=16-30\text{Hz}$, $\gamma=31-50\text{Hz}$ 。

[0034] 图7A-7I显示了来自TBI病患者的死后脑组织在TBI病后八天显示慢性炎症。图7A显示了来自一例对照患者的死后脑组织的HLA-DR染色,HLA-DR是在小胶质细胞和巨噬细胞中表达的MHC II类细胞表面受体的标志物。病例信息:男性,78岁。比例尺,1cm。图7B显示了一例TBI患者死后对HLA-DR的脑组织染色。病例信息:男性,79岁;跌倒意外,损伤严重程度(GCS):中度,CT:脑水肿;无癫痫(TBI后:八天);基于最近一次临床评估,没有神经系统疾病史,也没有认知能力下降的证据;无原发性神经退行性病变的证据,无创伤诱发的弥漫性轴索损伤的证据。比例尺,1cm。图7C显示与(图7A)相同,但对GFAP染色。比例尺,1cm。图7D显示与(图7B)相同,但对GFAP染色。比例尺,1cm。图7E显示与(图7A)相同,但对C1q染色。比例尺,1cm。图7F-7I显示与(图7B)相同,但对C1q染色。比例尺,1cm(图7F-7G)和40 μm (图7H-7I)。

[0035] 图8A-8C显示,在mTBI后三周,单核RNA测序没有显示假手术和mTBI丘脑组织之间表达的主要差异。图8A显示了用于定义图3B中每聚类的关键谱系基因的小提琴图。图8B显示了假手术和mTBI细胞核的UMAP图,通过重复着色(rep 1: $n=5$ 只假手术小鼠, $n=6$ 只mTBI小鼠,rep 2: $n=4$ 只假手术小鼠, $n=4$ 只mTBI小鼠)。图8C显示了在A)中定义的每个谱系中假手术($n=4,908$)和mTBI($n=4,338$)丘脑组织收集的细胞核的百分比。重复之间每个谱系的回收是相似的。每个点代表一个生物重复。

[0036] 图9A-9H显示了在mTBI后三周在丘脑组织中发现的主要补体标志物是C1qa和C4b。图9A显示了假手术和mTBI中的小胶质细胞中的Apoe和Cst3以及星形胶质细胞中的Apoe和C1u的表达水平,采用Wilcoxon秩和检验分析(调整后的p值显示在每个小提琴图上方)。图9B显示了来自假手术和mTBI丘脑组织的描绘的细胞的主要谱系中补体系统组分的小提琴图。图9C显示了少突胶质细胞谱系的亚聚类。图9D显示了与(图9C)中相同的UMAP,通过C4b表达,用填补渲染着色。图9E显示了采用Wilcoxon秩和检验分析的假手术和mTBI少突胶质细胞亚聚类中C4b表达的小提琴图。C4b在少突胶质细胞聚类3(Oligo 3)中差异表达。分析结合了两种技术重复,共同代表九只假手术小鼠和十只mTBI小鼠。每个点代表一个单核。图9F显示了与(图9C)中相同的UMAP,通过与成熟少突胶质细胞相关的Kirrel3和Opalin、与分化中的少突胶质细胞相关的Enpp6和与少突胶质细胞成熟相关的alarmin Il33的表达着色。图9G显示了从大量细胞质RNA中提取的RNA中C2表达的RT-qPCR。每个点代表从一个重复中提取的大量RNA($n=2$ 个生物库,每个点代表 $n=3$ 个技术重复)。第一个重复包括五只假手术小鼠和六只mTBI小鼠,并且第二个重复包括四只假手术小鼠和四只mTBI小鼠。图9H显示了总结来自核RNA-seq数据和细胞质RNA qPCR的所有补体蛋白表达的表。

[0037] 图10A-10G描述了单核RNA测序显示丘脑GABA能神经元内的表达梯度,但在假手术和mTBI小鼠之间几乎没有差异。图10A显示了所有描绘的细胞核(假手术和mTBI)的UMAP,通过Slc17a6(左图)和Slc17a7(右图)表达,用填补渲染着色。选择虚线圆圈内的细胞核来亚

聚类GABA能神经元。图10B显示了通过新的亚聚类着色的来自A)的GABA能神经元的UMAP投影。图10C显示了九只假手术小鼠和十只mTBI组小鼠中GABA能神经元细胞核总数中的每个亚聚类的百分比。每个点代表两个生物重复中的一个 (rep 1:n=五只假手术小鼠,n=六只mTBI小鼠,rep 2:n=四只假手术小鼠,n=四只mTBI小鼠)。图10D显示了(上图)通过Ecel1和Spp1表达着色,用填补着色的UMAP投影。“重叠”图结合了左边的两个组,两个基因之间的细胞核有很强的重叠。(下图)与上图相同,通过Sst和Pvalb表达着色。灰色圆圈代表没有表达的细胞核。图10E显示了(图10B)中来自亚聚类的Slc17a7、Gad2、Pvalb和Sst的小提琴图。图10F显示了GABA能神经元亚聚类中与神经元功能相关的几个基因的热图。每个基因的大类在右边标注。颜色代表比例表达,归一化为所有子聚类的平均值。亚聚类在粘附和引导分子的表达方面有所不同,其与轴突引导和生长有关,所述粘附和引导分子包括钙粘蛋白(Cdh12、Cdh13、Cdh18)和原钙粘蛋白家族中的基因,脑信号蛋白基因(Sema5b、Sema3e)和肝配蛋白受体家族基因(Epha5、Epha6)。亚聚类在谷氨酸受体(Gria1、Grin2a、Grik4)、细胞外基质蛋白(Col12a1、Col25a1)和细胞信号分子(诸如Nrg1,一种被认为调节Pvalb阳性神经元的表皮生长因子家族成员)的表达方面也有所不同。图10G显示了假手术和mTBI小鼠之间跨所有GABA能神经元差异表达的基因的火山图。灰线表示显著性截断标准。标记选择数量的线粒体基因。

[0038] 图11A-11B显示了在mTBI后四个月,受损的皮层和功能性连接的丘脑显示出慢性炎症和神经元损失。图11A显示了对C1q、NeuN、GFAP和IBA1染色的S1(上图)、VB和nRT(中图)的特写图像,以及nRT(下图)的共焦图像。右S1皮层的损伤部位用星号标记。nRT中的箭头指示共焦图像的位置。比例尺,300 μ m(上图/中图)和20 μ m(下图)。图11B显示了假手术小鼠和TBI小鼠中同侧区域和对侧区域之间荧光比率的定量。数据代表从最小值到最大值的所有点,采用曼-惠特尼检验,并且 $\alpha=0.05$ (* $p<0.05$,** $p<0.01$)。分析包括每组四至六只小鼠(n=每只小鼠一至三个切片,每个区域一个图像)。

[0039] 图12A-12C描绘了在mTBI后三周,C1q-/-小鼠显示炎症和神经元损失减少。图12A显示了来自TBI C1q-/-小鼠的代表性冠状脑剖面,对GFAP、IBA1和NeuN染色。右S1皮层的损伤部位用星号标记。比例尺,1mm。图12B显示了对GFAP、IBA1和NeuN染色的S1(上图)、VB和nRT(下图)的特写图像。右S1皮层的损伤部位用星号标记。比例尺,500 μ m。图12C显示了假手术和TBI C1q-/-小鼠中同侧和对侧区域之间的荧光比率和nRT神经元计数的定量。数据代表从最小值到最大值的所有点,采用曼-惠特尼检验,并且 $\alpha=0.05$ (* $p<0.05$,** $p<0.01$)。分析包括每组四至六只小鼠(n=每只小鼠一至三个切片,每个区域一个图像)。

[0040] 图13A-13D显示了血浆和脑PK/PD,其显示在抗C1q药物治疗的假手术小鼠和TBI小鼠中存在游离药物和减少的C1q。图13A显示了在用两剂量的100mg/kg抗C1q或同种型对照抗体治疗TBI组和假手术小鼠后,使用夹心ELISA测量游离药物、C1q-游离和C1q-总量的血浆水平。虚线显示定量下限。图13B-13D显示了使用夹心ELISA在同侧(上图)和对侧(下图)的脑裂解物中测量的游离药物(图13B)、C1q-游离(图13C)和C1q-总量(图13D)的水平。未经处理的小鼠是阴性对照。虚线显示定量下限。数据代表从最小值到最大值的所有点,在TBI对照和TBI抗C1q之间采用曼-惠特尼检验,并且 $\alpha=0.05$ (* $p<0.05$,** $p<0.01$,*** $p<0.001$,*** $p<0.0001$)。分析包括每组三至15只小鼠。

[0041] 图14A-14D显示了患有mTBI的小鼠在 θ 至 α 频率范围内具有自发性癫痫样事件,其

与mTBI后四周的丘脑爆发时间锁定。图14A显示了体内实验记录位置的示意图。左图, ECoG记录地点和mTBI位置显示在小鼠头骨上。右图, 单侧植入nRT的钨深部电极的大致位置。图14B显示了来自皮层记录部位的代表性ECoG迹线和来自nRT的多单位迹线, 显示了自发性癫痫样事件。图14C显示了功率谱分析, 其显示了来自假手术和TBI小鼠同侧S1皮层的基线ECoG信号的前15分钟内跨不同频带的平均功率。图14D显示了周期图, 其显示了从代表性假手术小鼠和TBI小鼠的同侧S1皮层的基线ECoG信号的前15分钟获得的跨频率的功率。数据代表平均值 $\pm$ SEM, 采用曼-惠特尼检验分析, 并且 $\alpha=0.05$ (* $p<0.05$, ** $p<0.01$)。分析包括每组12至14只小鼠。

[0042] 图15A-15D显示了抗C1q抗体对患有mTBI的小鼠的ECoG功率具有慢性疾病改善作用。图15A显示了对照处理的小鼠(左图)和抗体处理的小鼠(右图)的实例光谱图(上图)和直方图(下图), 显示了TBI后2.5个月(即治疗结束后四周)在不同频带上的功率。每30分钟对功率频带进行一次采样。图15B显示了在TBI后的第一天, 在不同频带上采样的对照处理和抗体处理的队列的累积分布函数。我们在每次记录开始的前24小时内采样了48个点。图15C显示与B相同, 但在TBI后三周。我们在每次记录开始的15.25-20.1天之间采样了232个点。图15D显示与B相同, 但在TBI后9-15周。我们在每次记录开始的104.6天到110天之间采样了296个点。数据代表记录的所有小鼠, 即使它们在治疗结束前死亡。一只对照处理的小鼠和一只抗体处理的小鼠在TBI后三周内死亡, 两只对照处理的小鼠在TBI后六周内死亡, 在TBI后记录其余的小鼠至少九周。在24小时时, $n=7$ 只对照处理的小鼠, 七只抗体处理的小鼠。在第三周时, $n=7$ 只对照处理的小鼠, 七只抗体处理的小鼠。在9-15周时, $n=7$ 只对照处理的小鼠, 四只抗体处理的小鼠。 $\delta=1-4\text{Hz}$, $\theta=5-8\text{Hz}$, $\alpha=9-12\text{Hz}$, $\sigma=13-15\text{Hz}$, $\beta=16-30\text{Hz}$, $\gamma=31-50\text{Hz}$ 。ns= $p>0.05$ 。

[0043] 图16A-16D显示抗C1q抗体在mTBI后三周恢复睡眠梭状波减少。图16A显示了在mTBI后三周来自假手术和mTBI小鼠的代表性ECoG记录。迹线代表带通(BP)滤波的ECoG。水平线: 显示检测到的梭状波。箭头指示癫痫棘波。图16B显示了与图16A相同的用同种型对照或抗C1q抗体处理的mTBI小鼠。图16C显示了在12小时窗口内检测到的同侧ECoG中的睡眠梭状波与对侧ECoG中的睡眠梭状波的比率。数据代表平均值 $\pm$ SEM, 采用曼-惠特尼秩和检验分析, 并且 $\alpha=0.05$ (* $p<0.05$, ** $p<0.01$)。分析包括 $n=6$ 只假手术小鼠, $n=9$ 只mTBI小鼠(左); $n=7$ 只对照处理的mTBI小鼠, $n=7$ 只抗体处理的mTBI小鼠(右)。图16D显示了(图16C)中小鼠对侧和同侧ECoG中的睡眠梭状波的频率、归一化振幅和持续时间。数据代表使用Kruskal-Wallis秩方差单向分析、所有成对多重比较程序(Holm-Sidak方法)分析的平均值 $\pm$ SEM, $\alpha=0.05$ (* $p<0.05$, ** $p<0.01$)。灰线代表了每只小鼠的对侧和同侧数据。

[0044] 图17A-17E显示了抗C1q抗体减少了mTBI后三周出现的局灶性癫痫棘波。图17A显示了在mTBI后三周来自假手术和mTBI小鼠的代表性ECoG记录。水平虚线表示棘波检测阈值。垂直红线指示检测到的棘波。图17BA显示了与图17A相同的用同种型对照或抗C1q抗体处理的mTBI小鼠。A-B的迹线来自NREM睡眠的发作。图17C显示了在12小时窗口内检测到的癫痫棘波的数量。数据代表平均值 $\pm$ SEM, 采用曼-惠特尼秩和检验分析 (* $p<0.05$, ** $p<0.01$)。插图: 来自mTBI小鼠的平均癫痫棘波显示在(B)中($n=592$ 个棘波; 平均值(黑色) $\pm$ SD(灰色))。分析包括 $n=6$ 只假手术小鼠, $n=9$ 只mTBI小鼠(左); $n=7$ 只对照处理的mTBI小鼠, $n=6$ 只抗体处理的mTBI小鼠。图17D-17E显示了来自图17C中小鼠的癫痫棘波的数量

相对于睡眠梭状波的比率。单个点代表每只小鼠,误差条代表两个轴上的平均值 $\pm$ SEM。

[0045] 图18显示了睡眠梭状波检测。来自mTBI周围皮层和对侧皮层的同时记录的ECoG信号(黑色)被带通滤波8-15Hz(灰色轨迹),并应用睡眠梭状波检测阈值(Thr.)。所描绘的记录来自mTBI后三周的抗C1q处理的mTBI小鼠(与图17B中的小鼠相同)。

具体实施方式

[0046] 本具体实施方式不应被认为是限制性的,而仅仅是为了说明本发明的一般原理。本具体实施方式的部分标题和总体结构仅为了方便起见,而不旨在限制本发明。

[0047] 据估计,在一生(80岁)中,患癫痫的几率约为3%。在约30%的病例中,存在触发癫痫(症状性癫痫)发生的可鉴定的脑损伤。另有30%的患者被推测为症状性癫痫,尚未鉴定其病因。脑损害,诸如创伤性脑损伤(TBI)、中风、癫痫持续状态和感染/炎症是获得性癫痫的一些原因,获得性癫痫通常在潜伏期后发生,并且经常是进行性的(即,随着时间的推移,发作变得更加频繁和严重)。脑外科手术后的恢复期患者也可能出现癫痫发作。此外,对于约1%的人群,癫痫发作是自发性的,没有任何明显的原因或任何其它神经异常。此类自发性癫痫被称为特发性癫痫,并被认为是遗传性的。

[0048] 癫痫不是一种具体的疾病,甚至不是一种单一的综合征,而是由许多大脑功能病症引起的一大类症候群,这些病症可能继发于多种病理过程。术语惊厥性病症、发作性病症和脑发作用作癫痫的同义词使用,因为它们均指表现为刻板行为改变的大脑功能障碍复发性阵发性发作。癫痫发作被认为是行为的突然变化,是涉及皮层的神经元网络的超同步放电的结果。癫痫发作也可能是正常大脑对短暂功能紊乱的自然响应,因此不一定是癫痫病症的指征。此类发作通常被称为激发性、急性症状性或反应性。

[0049] 一些编码电压门控和配体门控离子通道的蛋白质亚单位的基因与不同形式的癫痫和婴儿癫痫综合征相关。发作不受控制的患者的发病率和死亡率都很高。

[0050] 在癫痫中,脑已经在病理生理学或结构上发生永久性改变,导致异常的超同步神经元放电。反复发作会导致进行性脑损伤。例如,报道了海马体体积随着时间的推移逐渐减小作为发作次数的函数。一些临床和实验数据表明,血脑屏障(BBB)功能的衰竭会触发慢性或急性发作。

[0051] 已经表征了超过四十种类型的癫痫发作,并且这些癫痫发作被分为全身性(在脑的两个半球中发作)和部分性(局灶性;在脑的一个部分中发作)。全身性发作进一步分为失神发作、肌阵挛发作、失张力发作和强直性发作,而部分性发作又分为单纯性发作和复杂性发作。部分性发作约占所有成人病例的百分之六十,颞叶癫痫(TLE)是部分性发作的最常见形式。TLE患者通常有早期风险因素史,诸如热性惊厥、癫痫持续状态和感染。在不受控制的部分性发作开始之前,可能有一段无发作期。存在一些进行性特征,诸如发作频率增加,认知能力下降。

[0052] 癫痫的病因仍然是个谜。然而,有证据表明免疫途径的活化在人类癫痫中起作用,并且这种炎症响应有助于发作的产生和复发以及发作相关的神经元损伤。已知星形胶质细胞通过产生广泛的免疫相关分子而对中枢神经系统的炎症环境有贡献。它们能表达II类主要组织相容性联合抗原,并产生多种趋化因子和细胞因子。这些免疫因子也可能活化小胶质细胞。

[0053] 例如,在颞叶癫痫 (TLE) 患者中,有证据表明海马体内的小胶质细胞活化,这提供了活化免疫反应的证据。在人海马体硬化标本的反应性星形胶质细胞和存活神经元中,核因子 κ B过度表达。此外,IL-1B系统存在显著和持续的活化,涉及活化的神经胶质细胞和神经元细胞。相比之下,在人内侧TLE标本中仅检测到少数适应性免疫细胞 (CD3/CD8阳性T淋巴细胞)。另外,基因表达谱分析也支持人TLE中炎症途径的活化。最近的研究证明,关键炎症因子表达与耐药性内侧TLE患者发作频率之间存在不同的相关性。Toll样受体4 (TLR4—先前在TLE动物模型中显示诱导几种细胞因子转录的炎症关键触发因子) 基因表达与发作频率直接相关,而活化转录因子3 (TLR4的负调节因子) 和IL-8表达与发作频率呈负相关。

[0054] 失调的持续性炎症、血脑屏障损伤和不受控制的发作之间的相互作用会产生一个自我延续的循环,导致不受控制的炎症,从而触发不同癫痫病症 (包括TLE) 的进展。例如,一个关键的炎症介质是补体系统。补体系统是参与免疫反应的蛋白质级联,其由约30种液相且细胞膜相关蛋白质组成。级联反应的活化产物有助于其他炎症介质的产生,因此可以促进炎症部位的组织损伤。尽管补体系统组分的合成主要发生在肝脏,但在病理条件下,神经胶质细胞和神经元都可以表达这些炎症介质。C3a和C5a是响应补体活化而产生的最有效的促炎分子。经典补体级联反应的起始分子C1q识别应激状态下的神经元突触。C1q的活化导致下游补体组分C4b和C3b沉积在突触表面-导致免疫细胞的识别和突触的物理消除。补体系统的活化还导致膜攻击复合物的形成,该复合物通过在磷脂双层中形成孔来损伤或溶解靶细胞。神经元对补体介导的损伤特别敏感。此外,虽然补体因子可能经由渗漏的血脑屏障侵入脑,但一些增加的表达可能源自活化的神经胶质细胞。有趣的是,将膜攻击途径的单个蛋白质 (C5b6、C7、C8和C9) 顺序输注入清醒、自由活动的大鼠的海马中,诱导了行为和电记录的发作以及细胞毒性,表明补体系统在癫痫发生中的作用。

[0055] 此外,创伤性脑损伤 (TBI) 每年影响全球约6900万人,并可导致认知功能障碍、感觉处理困难、睡眠中断,以及如上所述的癫痫的发生。大多这些不良健康后果在TBI后数月或数年出现,是由间接继发性损伤造成的,间接继发性损伤会导致最初冲击的长期后果。

[0056] 虽然TBI严重破坏了大脑皮层,但大多数与TBI相关的失能反映了随着时间的推移而产生的继发性损伤。丘脑很可能是继发性损害的部位,因为它与大脑皮层相互联系。使用不直接损伤皮质下结构的轻度皮质损伤的小鼠模型 (mTBI),我们发现C1q表达的慢性增加,特别是在皮质丘脑回路中。C1q表达增加与神经元损失和慢性炎症共同定位,并与睡眠梭状波的中断和癫痫活动的出现相关。阻断C1q抵消了这些结果中的大部分,显示C1q是mTBI中的疾病调节剂。单核RNA测序证明小胶质细胞是丘脑C1q的来源,它可能作用于少突胶质细胞和星形胶质细胞的子集。皮层通常是主要损伤的部位,因为它直接位于颅骨之下,并且是许多较大回路的组成部分,包括皮层-丘脑-皮层环。这一回路对感觉处理、注意力、认知和睡眠非常重要,所有这些都可能受到TBI的损害。丘脑本身,虽然在TBI中没有急性损伤,但经历了继发性损伤,可能是因为它与大脑皮层的长程相互联系。丘脑中的结构变化与许多长期TBI相关的健康结果 (包括疲劳和认知功能障碍) 有关,TBI患者表现出丘脑核的继发性慢性神经退行性变和炎症。

[0057] 慢性神经炎症是继发性损伤部位的常见特征。但大多数用广谱抗炎剂改善后TBI认知结果的尝试都失败了,可能是因为有許多炎症通路在不同时间同时发挥保护和致病作用。TBI后炎症和损伤的潜在介质是补体途径,其在人和啮齿类动物的脑病变的损伤周围区

域被活化。补体活化导致中枢神经系统损伤中的炎症和神经毒性,并且在患有损伤、癫痫和阿尔茨海默病的人脑中增加。C1q (经典补体级联反应的起始分子) 的异常活化可触发功能性突触的消除,并导致神经退行性疾病的进展。另一方面,C1q参与发育过程中正常的突触修剪,补体系统通过清除细胞碎片并保护中枢神经系统免受感染而在脑内稳态中发挥重要作用。

[0058] 本文提供了在轻度皮质损伤的机械易处理且高度可再现的小鼠模型中发现C1q途径在TBI后对皮质丘脑回路的继发性损伤中的作用。该模型鉴定了诸如治疗窗、炎症表型和继发性损伤程度等因素,这些因素支持了TBI后结局治疗中的靶向方法。

[0059] 我们用来研究TBI后整个躯体感觉皮质丘脑回路的一个强有力的工具是慢性ECoG记录,其具体用于研究创伤后癫痫发生的进展和TBI后长达四个月的皮质节律的变化。在细胞和回路水平使用此类电生理学方法,我们表明TBI改变了丘脑网状核(nRT)神经元的突触特性,并与C1q积累增加有关,C1q积累可能介导皮质丘脑回路中的病理状态,包括宽频带活动增加。

[0060] nRT是TBI后长期继发性损伤的位点

[0061] 先前对严重头部损伤的观察显示了人nRT的神经退行性变(42)。我们的研究表明,即使是轻微的皮质损伤也会导致损伤后三周nRT的神经元损失。这种神经退行性变的原因可能是导致nRT兴奋性中毒的皮层输入损失,nRT可能是由于来自皮层的轴突传入密度高的脆弱的脑区(42)。我们的RNA测序结果还鉴定,在所有GABA能神经元亚聚类中,mTBI丘脑组织中与线粒体功能相关的基因表达增加。该观察指出线粒体介导的细胞死亡是后TBI神经退行性变的另一个潜在机制。

[0062] nRT中神经元的损失可以解释该区域的一些突触变化。特别是,TBI后三周,nRT神经元中IPSC的频率减少。在许多微电路中,减少对GABA能神经元的抑制会导致抑制的净增加。相比之下,nRT中GABA能抑制的损失导致皮质丘脑回路过度兴奋,甚至可以引发癫痫样活动。事实上,nRT内GABA能联系对于协调兴奋性丘脑核的抑制性输出和控制振荡性丘脑活动是重要的,并且它们的损失对皮质丘脑回路是有害的。nRT内GABA能神经元的死亡可能有助于减少nRT内抑制。这种减少的抑制可能导致前馈GABA能抑制的损失,这可能导致增加的发作的易感性,和增加的发生创伤后癫痫活动的可能性。

[0063] 在nRT EPSC中也观察到缺陷,特别是较低的频率和振幅以及较慢的动力学。这些变化类似于在皮质-nRT谷氨酸能突触缺乏GluA4 AMPA受体的癫痫小鼠模型中的发现。这种缺陷导致丘脑中前馈抑制的损失和癫痫活动。因此,nRT EPSC的改变似乎有助于皮质丘脑回路超同步和发作,但可能是由于TBI后nRT的皮质谷氨酸能输入损失所致。

[0064] 鉴于我们在皮质丘脑回路,特别是nRT中发现的变化与癫痫活动和认知缺陷有关,这些结果将该回路确定为治疗长期TBI结果的新的潜在靶点。特别有趣的是,睡眠梭状波在认知功能中起着重要作用。我们的发现将C1q确定为治疗睡眠梭状波和预防mTBI后癫痫棘波的靶点。

[0065] 与nRT神经元不同,皮质神经元,诸如第5层锥体神经元和GABA能快速放电中间神经元,在慢性时间点没有被轻度TBI(mTBI)改变。这些观察结果表明,在皮层TBI后,存在恢复或减少慢性过度兴奋的稳态机制。他们还证实,至少TBI的某些长期结果肯定是由nRT功能障碍引起的,而不仅仅是由皮层损伤引起的。在这方面,有趣的是看到,虽然皮质神经元

在慢性阶段似乎具有正常的兴奋性和突触功能,但ECoG在睡眠梭状波和癫痫棘波中显示出“局部”缺陷。这一观察结果与先前对患有轻度TBI (mTBI) 人的脑磁图研究、对患有重度TBI 人的EEG研究以及对患有重度TBI大鼠的EEG研究一致,这些研究观察到TBI后早期时间点 δ 活动增加。在正常情况下, δ 活动与慢波睡眠、安静觉醒和高级认知功能有关。在损伤的情况下, δ 波与白质病变相关)。因此,轻度TBI (mTBI) 的主要长期影响是在皮质-丘脑-皮质环的丘脑端。鉴于nRT在感觉皮层中产生局部睡眠梭状波的新作用,nRT的继发性损伤可能是至少部分是皮层中睡眠梭状波“局部”损失的原因。

[0066] 慢性C1q作为疾病调节剂

[0067] C1q在正常脑功能中具有充分证明的作用,诸如发育过程中的突触修剪,以及它在几种神经疾病中的参与,包括严重的TBI。此外,在TBI后的长达四个月内,皮质丘脑回路中的C1q表达高度增加。本文公开的研究集中于皮质丘脑回路,并使用电生理学记录提供了mTBI后皮质丘脑回路的第一个功能性特征,并首次证明了mTBI后睡眠梭状波的丧失和癫痫棘波的发生涉及C1q途径。

[0068] 虽然轻度TBI (mTBI) 小鼠没有发生慢性GTCS,以确定阻断C1q是否具有抗发作作用,但观察到了抗C1q抗体的许多其他保护作用,包括减少炎症和神经退行性变,以及恢复TBI后改变的皮质状态,诸如防止睡眠梭状波破坏和癫痫棘波。基于这些观察和先前的文献表明保护性和有害性炎症细胞类型之间的差异,C1q在不同的病理阶段发挥不同的作用。在损伤时,C1q有助于神经胶质瘢痕的形成,从而限制了皮层原发部位的损伤范围。然而,在慢性阶段,C1q增加促进nRT的慢性炎症和继发性神经退行性变。

[0069] 皮层还展现出C1q的增加,但它似乎在该部位或该时间点没有损害作用,或者可能起到抵消性的初始保护作用,因为与丘脑不同,在慢性时间点,假手术和TBI小鼠的皮层中的神经元生理学是相似的。这些发现表明存在一个时间窗,在该时间窗内,抗C1q治疗可以防止对丘脑的继发性损害,而不损害皮层的稳态恢复。

[0070] 我们的RNA测序结果表明,小胶质细胞是C1q以及C4b的星形胶质细胞和少突胶质细胞的主要来源,这一发现可能指向C1q分子本身上游(小胶质细胞)和下游(星形胶质细胞和少突胶质细胞)的其他细胞特异性治疗靶点。C4似乎也介导严重TBI后的损伤,如C4^{-/-}小鼠的运动缺陷减少所示。在我们的测序数据中Hc表达的缺乏表明nRT神经元死亡的机制不是膜攻击复合物介导的裂解,尽管该机制不能仅通过测序方法来确定。

[0071] 本文公开的研究将C1q确定为疾病调节剂,其可以在一定的时间窗内(在该研究中,在损伤后24小时开始治疗)被靶向用于治疗TBI的破坏性结果。丘脑C1q也可以作为一种生物标志物来帮助鉴定那些可能发展为长期继发性损伤的个体。这项研究首次在mTBI后的慢性时间点对皮层和丘脑进行电生理记录,并将nRT中的神经元死亡和IPSC减少鉴定为皮层损伤的慢性结果。此外,通过显示mTBI在nRT中的生理慢性结果,我们将nRT鉴定为治疗TBI后结果(诸如感觉处理改变、睡眠中断和癫痫)的新靶点。

[0072] 尽管这些研究涉及不同免疫途径、TLE和TBI后继发性损伤(如TBI诱发的癫痫等)的作用,本领域需要用于预防和治疗癫痫及其相关进展的新组合物和方法。因此,抑制早期补体活化途径可能是一种有前途的癫痫治疗策略,例如,使用抑制早期补体活化(包括补体活化途径)的抗C1q、抗C1r和抗C1s抗体。抗体可以是单克隆抗体、嵌合抗体、人源化抗体、抗体片段和/或抗体衍生物。

[0073] 中和补体因子诸如C1q、C1r或C1s的活性抑制经典补体活性,并减缓或预防癫痫,诸如特发性全身性癫痫、特发性部分性癫痫、症状性全身性癫痫或症状性部分性癫痫。本文公开了与中和癫痫(诸如特发性全身性癫痫、特发性部分性癫痫、症状性全身性癫痫或症状性部分性癫痫)中的补体因子(例如C1q、C1r或C1s)相关的方法。

[0074] 本公开中提到的所有序列都通过引用并入美国专利号10,316,081、美国专利申请号14/890,811、美国专利号8,877,197、美国专利号9,708,394、美国专利申请号15/360,549、美国专利号9,562,106、美国专利号10,450,382、美国专利号10,457,745,国际专利申请号PCT/US2018/022462,其中每一篇公开的抗体和相关组合物在此通过引用并入。

[0075] 在某些方面,本文公开了预防癫痫、降低发生癫痫的风险或治疗癫痫的方法(所述癫痫诸如特发性全身性癫痫、特发性部分性癫痫、症状性全身性癫痫或症状性部分性癫痫),其包括向受试者施用补体途径的抑制剂。

[0076] 本文公开了一种抑制癫痫(诸如特发性全身性癫痫、特发性部分性癫痫、症状性全身性癫痫或症状性部分性癫痫)的方法,其包括向患者施用抗体(诸如抗C1q抗体、抗C1r抗体或抗C1s抗体)。在某些优选的实施方案中,抗体结合C1q、C1r或C1s并抑制补体活化。抗体可以是单克隆抗体、嵌合抗体、人源化抗体、其抗体片段和/或其抗体衍生物。

[0077] 全长抗体可以通过使用重组DNA工程化技术来制备。此类工程化版本包括例如通过在天然抗体的氨基酸序列中插入、缺失或改变天然抗体可变区而产生的版本。这种类型的特定实例包括含有至少一个CDR和任选的一个或多个来自一种抗体的框架氨基酸以及来自第二种抗体的可变区结构域的剩余部分的那些工程化可变区结构域。编码抗体的DNA可以通过删除编码全长抗体的DNA中除所需部分之外的所有部分来制备。编码嵌合抗体的DNA可以通过重组基本上或专门编码人恒定区的DNA和编码基本上或专门来源于除人以外的哺乳动物的可变区序列的可变区的DNA来制备。编码人源化抗体的DNA可以通过重组编码除基本上或专门来源于相应的人抗体区的互补决定区(CDR)以外的恒定区和可变区的DNA和编码基本上或专门来源于除人以外的哺乳动物的CDR的DNA来制备。

[0078] 编码抗体的DNA分子的合适来源包括表达全长抗体的细胞,例如杂交瘤。例如,抗体可以从表达编码抗体的重链和/或轻链的表达载体的宿主细胞中分离。

[0079] 抗体片段和/或抗体衍生物也可以通过使用重组DNA工程化技术来制备,包括编码抗体可变区和恒定区的DNA的操作和再表达。标准分子生物学技术可用于根据需要修饰、添加或删除更多的氨基酸或结构域。如本文所用的术语“可变”和“恒定”区域仍然涵盖对可变或恒定区域的任何改变。在一些情况下,通过在编码C_H1的链间半胱氨酸的密码子后立即引入终止密码子,使用PCR来产生抗体片段,使得C_H1结构域的翻译在链间半胱氨酸处终止。设计合适的PCR引物的方法是本领域众所周知的,并且抗体C_H1结构域的序列是容易获得的。在一些实施方案中,可以使用定点诱变技术引入终止密码子。

[0080] 本公开的抗体可以衍生自任何抗体同种型(“类”),包括例如IgG、IgM、IgA、IgD和IgE及其亚类,包括例如IgG1、IgG2、IgG3和IgG4。在某些优选的实施方案中,抗体的重链和轻链来自IgG。抗体的重链和/或轻链可以来自鼠IgG或人IgG。在某些其它优选的实施方案中,抗体的重链和/或轻链来自人IgG1。在又其它优选的实施方案中,抗体的重链和/或轻链来自人IgG4。

[0081] 在一些实施方案中,抑制剂是抗体,例如抗C1q抗体、抗C1r抗体或抗C1s抗体。抗

C1q抗体可以抑制C1q与自身抗体之间、或C1q与C1r之间、或者C1q与C1s之间的相互作用。抗C1r抗体可以抑制C1r与C1q之间或C1r与C1s之间的相互作用。抗C1r抗体可以抑制C1r的催化活性,或抗C1r抗体可以抑制原-C1r加工成活性蛋白酶。抗C1s抗体可以抑制C1s与C1q之间、或C1s与C1r之间、或C1s与C2或C4之间的相互作用,或抗C1s抗体可以抑制C1s的催化活性,或其可以抑制原-C1s加工成活性蛋白酶。在一些情况下,抗C1q、抗C1r或抗C1s抗体促使从循环或组织中清除C1q、C1r或C1s。

[0082] 本文公开的抗体可以是例如结合哺乳动物C1q、C1r或C1s,优选人C1q、C1r或C1s的单克隆抗体。抗体可以是小鼠抗体、人抗体、人源化抗体、嵌合抗体、抗体片段或其抗体衍生物。本文公开的抗体也可以跨血脑屏障(BBB)。抗体可以活化BBB受体介导的转运系统,诸如利用胰岛素受体、转铁蛋白受体、瘦素受体、LDL受体或IGF受体的系统。抗体可以是具有足够人类序列的嵌合抗体,其适于施用于人类。抗体可以是糖基化的或非糖基化的;在一些实施方案中,抗体例如,以在CHO细胞中通过翻译后修饰产生的糖基化模式被糖基化。在一些实施方案中,抗体在大肠杆菌(*E. coli*)中产生。

[0083] 抗体可以是识别第一和第二抗原的双特异性抗体,例如,第一抗原选自C1q、C1r和C1s,和/或第二抗原是允许抗体跨血脑屏障的抗原,诸如选自转铁蛋白受体(TR)、胰岛素受体(HIR)、胰岛素生长因子受体(IGFR)、低密度脂蛋白受体相关蛋白1和2(LPR-1和2)、白喉毒素受体、CRM197、美洲驼单结构域抗体、TMEM 30(A)、蛋白质转导结构域、TAT、Syn-B、穿膜素、聚精氨酸肽、血管肽肽或ANG1005。

[0084] 本公开的抗体可以结合并抑制C1q、C1r、C1s或C1的生物活性。例如,(1)C1q与自身抗体的结合,(2)C1q与C1r的结合,(3)C1q与C1s的结合,(4)C1q与磷脂酰丝氨酸的结合,(5)C1q与五聚蛋白-3的结合,(6)C1q与C-反应蛋白(CRP)的结合,(7)C1q与球状C1q受体(gC1qR)的结合,(8)C1q与补体受体1(CR1)的结合,(9)C1q与B-淀粉样蛋白的结合,或(10)C1q与钙网蛋白的结合。在其它实施方案中,C1q的生物活性的另一个实例是(1)经典补体活化途径的活化,(2)抗体和补体依赖性细胞毒性的活化,(3)CH50溶血,(4)突触损失,(5)B细胞抗体产生,(6)树突细胞成熟,(7)T细胞增殖,(8)细胞因子产生,(9)小胶质细胞活化,(10)阿瑟氏反应,(11)突触或神经末梢的吞噬作用,(12)补体受体3(CR3/C3)表达细胞的活化。

[0085] 在一些实施方案中,CH50溶血包括人、小鼠和/或大鼠CH50溶血。在一些实施方案中,抗体能够中和至少约50%至至少约95%的CH50溶血。抗体还能够在小于150ng/ml、小于100ng/ml、小于50ng/ml或小于20ng/ml的剂量下中和至少50%的CH50溶血。

[0086] 测量补体活性的其它体外测定包括用于测量补体活化过程中形成的补体组分或复合物的裂解产物的ELISA测定。通过经典途径进行的补体活化可以通过跟踪血清中C4d和C4的水平来测量。可以在ELISA中通过评估循环中Bb或C3bBbP复合物的水平来测量替代途径的活化。体外抗体介导的补体活化测定也可以用于评估对C3a产生的抑制。

[0087] 本公开的抗体可以是单克隆抗体、多克隆抗体、重组抗体、人源化抗体、嵌合抗体、多特异性抗体、其抗体片段或其衍生物。

[0088] 本公开的抗体也可以是抗体片段,例如Fab片段、Fab'片段、F(ab')₂片段、Fv片段、双体抗体或单链抗体分子。

[0089] 本文公开了向受试者施用第二种试剂,诸如第二种抑制剂的方法。在一些实施方

案中,第二种抑制剂可以是抗体(例如,抗C1q抗体、抗C1r抗体或抗C1s抗体)。在其它实施方案中,第二种抑制剂可以是抗体依赖性细胞毒性、替代补体活化途径的抑制剂;和/或自身抗体和自身抗原之间相互作用的抑制剂。

[0090] 在一些实施方案中,提供了确定受试者发展成癫痫(所述癫痫诸如特发性全身性癫痫、特发性部分性癫痫、症状性全身性癫痫或症状性部分性癫痫)的风险的方法,其包括:(a)向受试者施用抗体(即抗C1q、抗C1r或抗C1s抗体),其中抗体与可检测标记偶联;(b)检测可检测标记以测量受试者中C1q、C1r或C1s的量或位置;以及(c)将C1q、C1r或C1s中的一种或多种的量或位置与参照进行比较,其中基于C1q、C1r或C1s中的一种或多种的量或位置与参照的比较来表征发生癫痫的风险(所述癫痫诸如特发性全身性癫痫、特发性部分性癫痫、症状性全身性癫痫或症状性部分性癫痫)。可检测标记可以包括核酸、寡核苷酸、酶、放射性同位素、生物素或荧光标记。在一些情况下,可以使用生物素化过程用辅酶(例如生物素)标记抗体。当生物素用作标记时,通过添加蛋白质(例如亲和素或其细菌对应物链霉亲和素)来完成抗体的检测,其中任一种都可以与可检测的标志物(例如上述染料)、荧光标志物(例如荧光素)、放射性同位素或酶(例如过氧化物酶)结合。在一些实施方案中,抗体是抗体片段(例如,Fab、Fab'-SH、Fv、scFv或F(ab')₂片段)。

[0091] 本文公开的抗体也可以与标记基团偶联,例如放射性同位素、放射性核素、酶促基团、生物素基基团、核酸、寡核苷酸、酶或荧光标记。标记基团可以通过任何合适长度的间隔臂与抗体偶联,以减少潜在的空间位阻。标记蛋白质的各种方法在本领域是已知的,并且可用于制备这种标记的抗体。

[0092] 考虑了各种施用途。这种施用方法包括但不限于局部、肠胃外、皮下、腹膜内、肺内、鞘内、鼻内和病变内施用。胃肠外输注包括肌内、静脉内、动脉内、腹膜内或皮下施用。对于中枢神经系统病状的治疗,抗体可适于通过无创外周施用途跨血脑屏障,诸如静脉内、肌肉内、皮下、腹膜内或甚至口服施用。

[0093] 合适的抗体包括结合补体组分C1q、C1r或C1s的抗体。此类抗体包括单克隆抗体、嵌合抗体、人源化抗体、抗体片段和/或其抗体衍生物。

[0094] 优选的抗体是单克隆抗体,其可以通过用(1)来源于酶消化来自人血浆或血清的纯化补体组分的天然补体组分(例如,C1q、C1r或C1s),或(2)由真核或原核系统表达的重组补体组分或其衍生片段免疫啮齿动物(例如,小鼠、大鼠、仓鼠和豚鼠)来产生。其它动物可用于免疫,例如非人灵长类动物、表达人免疫球蛋白的转基因小鼠和移植有人B淋巴细胞的严重联合免疫缺陷(SCID)小鼠。

[0095] 多克隆和单克隆抗体作为免疫球蛋白(Ig)分子在免疫系统对病原体的响应中自然产生。约150kDa的IgG1分子是人血清中浓度为8mg/ml的主要形式,由两条相同的约50-kDa重链和两条相同的约25-kDa轻链构成。

[0096] 杂交瘤可以通过常规程序,通过来自将免疫动物的B淋巴细胞与骨髓瘤细胞融合来产生。此外,通过在噬菌体展示系统中从人B淋巴细胞中筛选重组单链Fv或Fab文库,可以产生抗C1q、抗C1r或抗C1s抗体。可以通过酶联免疫吸附测定(ELISA)、蛋白质免疫印迹(Western immunoblotting)或其它免疫化学技术来检测MAb对人C1q、C1r或C1s的特异性。

[0097] 可以通过溶血测定,针对替代补体途径使用未致敏的兔或豚鼠RBC或针对经典补体途径使用致敏的鸡或羊RBC来评估筛选过程中鉴定的抗体对补体活化的抑制活性。通过

有限稀释克隆展现对经典补体途径具有特异性的抑制活性的那些杂交瘤。通过上述测定纯化抗体以用于表征对人C1q、C1r或C1s的特异性。

[0098] 基于抗C1q、抗C1r或抗C1s抗体可变区的分子结构,分子建模和合理的分子设计可用于产生并筛选模拟抗体结合区分子结构并抑制C1q、C1r或C1s活性的小分子。这些小分子可以是肽、肽模拟物、寡核苷酸或有机化合物。模拟分子可以用作炎症适应症和自身免疫性疾病中补体活化的抑制剂。替代地,可以使用本领域常用的大规模筛选程序以从组合化合物文库中分离合适的小分子。

[0099] 本文公开的抗体的合适剂量可以在10至500 μ g/ml血清之间。实际剂量可以在临床试验中按照确定最佳剂量的常规方法来确定,即施用各种剂量并确定哪些剂量提供合适的功效而没有不希望的副作用。

[0100] 在重组DNA技术出现之前,裂解多肽序列的蛋白水解酶(蛋白酶)用于解剖抗体分子的结构并确定分子的哪些部分负责其各种功能。木瓜蛋白酶的有限消化将抗体分子裂解成三个片段。被称为Fab片段的两个片段是相同的,并且含有抗原结合活性。Fab片段对应于抗体分子的两条相同的臂,每条臂由与重链的V_H和C_H1结构域配对的完整轻链组成。其它片段不含抗原结合活性,但最初观察到容易结晶,并且因此命名为Fc片段(可结晶的片段)。

[0101] Fab分子是Ig分子的大约50-kDa的人工片段,其重链缺少恒定结构域C_H2和C_H3。两个异嗜性(V_L-V_H和C_L-C_H1)结构域相互作用是Fab分子的双链结构的基础,其通过C_L与C_H1之间的二硫键进一步稳定。Fab和IgG具有由六个互补决定区(CDR)形成的相同抗原结合位点,V_L和V_H各三个(LCDR1、LCDR2、LCDR3和HCDR1、HCDR2、HCDR3)。CDR定义了抗体的高变抗原结合位点。在LCDR3和HCDR3中发现了最高的序列变异,其在天然免疫系统中分别由V_L和J_L基因或V_H、D_H和J_H基因的重排产生。LCDR3和HCDR3通常形成抗原结合位点的核心。连接并显示六个CDR的保守区域被称为框架区。在可变结构域的三维结构中,框架区形成了两个反向平行的 β -折叠的夹层,其通过外部的高变CDR环和内部的保守二硫键连接。

[0102] 定义

[0103] 如本文中说明书中所用,“一个/种(a)”或“一个/种(an)”可以意指一个/种或多个/种。如本文在一条或多条权利要求中所用,当与词语“包含”结合使用时,词语“一个/种(a)”或“一个/种(an)”可以表示一个/种或一个/种以上。例如,对“抗体”的提及是从一个到多个抗体的提及。如本文中所用,“另一个/种(another)”可以指至少第二个/种或更多个/种。

[0104] 如本文所用,与另一种化合物或组合物“联合”施用包括同时施用和/或在不同时间施用。联合施用还涵盖作为共同配制物施用或作为单独组合物施用,包括以不同的给药频率或间隔,并且使用相同的施用途径或不同的施用途径。

[0105] 术语“免疫球蛋白”(Ig)在本文中可与“抗体”互换使用。术语“抗体”在本文中以最广泛的意义使用,并且具体包括单克隆抗体、多克隆抗体、由至少两种完整抗体形成的多特异性抗体(例如,双特异性抗体)、抗体片段(只要其展现所需的生物活性)和抗体衍生物。

[0106] 基本的4链抗体单位是由两条相同的轻链(L)和两条相同的重链(H)组成的异源四聚糖蛋白。将V_H和V_L配对在一起形成单一抗原结合位点。对于不同类别的抗体的结构和特性,参见例如Basic and Clinical Immunology,第8版,Daniel P.Stites,Abba I.Terr和Tristram G.Parslow(编.),Appleton&Lange,Norwalk,CT,1994,第71页和第6章。

[0107] 来自任何脊椎动物物种的L链都可以基于其恒定结构域的氨基酸序列被分为两种明显不同的类型,称为 κ (“kappa”)和 λ (“lambda”)。取决于其重链(CH)的恒定结构域的氨基酸序列,免疫球蛋白可分为不同的类别或同种型。有五种类别免疫球蛋白:IgA、IgD、IgE、IgG和IgM,其重链分别命名为 α (“alpha”)、 δ (“delta”)、 ϵ (“epsilon”)、 γ (“gamma”)和 μ (“mu”)。基于CH序列和功能的相对较小差异, γ 和 α 类进一步分为亚类(同种型),例如,人类表达以下亚类:IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1和IgA2。不同类别的免疫球蛋白的亚单位结构和三维构型是众所周知的,并且通常描述于例如在例如Abbas等人,Cellular and Molecular Immunology,第4版(W.B.Saunders Co.,2000)中。

[0108] 本文所用的术语“试剂”描述了具有调节突触损失能力的任何分子(例如蛋白质或药物),特别是通过补体途径。候选试剂还包括遗传元件(例如抑制C1q表达的反义和RNAi分子)和编码补体抑制剂的构建体(例如CD 59)等。候选试剂涵盖许多化学类别,尽管它们通常是包括分子量大于50且小于约2,500道尔顿的小有机化合物的有机分子。候选试剂包含与蛋白质的结构相互作用(特别是氢键)所必需的官能团,并且通常包括至少一个胺、羰基、羟基或羧基,优选至少两个功能化学基团。候选试剂通常包含被一个或多个上述官能团取代的环碳或杂环结构和/或芳族或多芳族结构。在生物分子中也发现了候选试剂,包括肽、糖、脂肪酸、类固醇、嘌呤、嘧啶、衍生物、结构类似物或其组合。通常,用不同的试剂浓度平行运行多个测定混合物,以获得对不同浓度的不同响应。通常,这些浓度中的一种用作阴性对照,即浓度为零或低于检测水平。

[0109] “全长抗体”通常是约150,000道尔顿的异四聚糖蛋白,其包含两条相同的轻(L)链和两条相同的重(H)链。每条轻链通过一个共价二硫键连接至重链,而不同免疫球蛋白同种型的重链之间的二硫键的数量各不相同。每条重链和轻链也有规则间隔的链内二硫键。每条重链在一端具有一个可变结构域(V_H),后面是许多恒定结构域。每条轻链在一端具有可变结构域(V_L),并且在其另一端具有恒定结构域;轻链的恒定结构域与重链的第一个恒定结构域比对,并且轻链可变结构域与重链可变结构域比对。据信特定的氨基酸残基形成轻链可变结构域与重链可变结构域之间的界面。

[0110] “分离的”分子或细胞是从至少一种污染物分子或细胞中鉴定并分离出来的分子或细胞,所述污染物分子或细胞通常在其产生的环境中与其相关。优选地,分离的分子或细胞不与产生环境相关的所有组分缔合。分离的分子或细胞的形式不同于其在自然界中的形式或环境。因此,分离的分子不同于细胞中天然存在的分子;分离的细胞不同于组织、器官或个体中天然存在的细胞。在一些实施方案中,分离的分子是本公开的抗C1s、抗C1q或抗C1r抗体。在其它实施方案中,分离的细胞是产生本公开的抗C1s、抗C1q或抗C1r抗体的宿主细胞或杂交瘤细胞。

[0111] “分离的”抗体是已经从其产生环境的组分中鉴定、分离和/或回收的抗体(例如,天然地或重组地)。优选地,分离的多肽不与来自其产生环境的所有其它污染组分缔合。来自其产生环境的污染组分(例如来自重组转染细胞的污染组分)是通常干扰抗体的研究、诊断或治疗用途的物质,并且可能包括酶、激素和其它蛋白质或非蛋白质溶质。在某些优选的实施方案中,抗体被纯化至以下程度:(1)按抗体重量计大于95%,并且最优选地按重量计大于99%,如通过Lowry法确定的;(2)通过使用旋转杯测序仪达到足以获得至少15个N-末端或内部氨基酸序列残基的程度,或(3)通过SDS-PAGE在非还原或还原条件下使用考马斯

蓝或优选银染的均一性。分离的抗体包括重组T细胞中原位的抗体,因为抗体天然环境中的至少一种组分将不存在。然而,通常,分离的多肽或抗体将通过包括至少一个纯化步骤的方法来制备。

[0112] 抗体的“可变区”或“可变结构域”是指抗体的重链或轻链的氨基末端结构域。重链和轻链的可变结构域可以分别称为“V_H”和“V_L”。这些结构域通常是抗体的最易变部分(相对于同类别的其它抗体),并且含有抗原结合位点。

[0113] 术语“可变的”是指抗体中可变结构域的某些区段在序列上有很大差异。V结构域介导抗原结合并定义特定抗体对其特定抗原的特异性。然而,可变性并不是均匀地分布在可变结构域的整个跨度上。相比之下,其集中在轻链和重链可变结构域中被称为高变区(HVR)的三个区段中。可变结构域的更加高度保守的部分称为框架区(FR)。天然重链和轻链的可变结构域各自包含四个FR区,其大多采用 β -折叠构型,由三个HVR连接,其形成连接 β -片层结构的环,并且有时形成 β -片层结构的部分。每条链中的HVR通过FR区紧密结合在一起,并且与来自另一条链的HVR一起有助于形成抗体的抗原结合位点(参见Kabat等人, *Sequences of Immunological Interest*, 第五版, National Institute of Health, Bethesda, MD (1991))。恒定结构域不直接参与抗体与抗原的结合,但展现出各种效应子功能,例如抗体参与抗体依赖性细胞毒性。

[0114] 如本文所用,术语“CDR”或“互补决定区”是指在重链和轻链多肽的可变区内发现的非连续抗原结合位点。通过Kabat等人, *J. Biol. Chem.* 252:6609-6616 (1977); Kabat等人, 美国卫生与公众服务部, “*Sequences of proteins of immunological interest*” (1991) (在本文中也称为Kabat 1991); 通过Chothia等人, *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987) (在本文中也称为Chothia 1987); 和MacCallum等人, *J. Mol. Biol.* 262:732-745 (1996) 描述了CDR, 其中相互比较时, 定义包括氨基酸残基的重叠或子集。然而, 应用任一定义来指代抗体或移植抗体或其变体的CDR意图都在本文所定义和使用的术语的范围内。

[0115] 如本文所用, 术语“CDR-L1”、“CDR-L2”和“CDR-L3”分别指轻链可变区中的第一、第二和第三CDR。如本文所用, 术语“CDR-H1”、“CDR-H2”和“CDR-H3”分别指重链可变区中的第一、第二和第三CDR。如本文所用, 术语“CDR-1”、“CDR-2”和“CDR-3”分别指任一链可变区的第一、第二和第三CDR。

[0116] 本文所用的术语“单克隆抗体”是指从基本上同质的抗体群体中获得的抗体, 即所述群体中的单个抗体是相同的, 除了可能以少量存在的可能的天然发生的突变和/或翻译后修饰(例如, 异构化、酰胺化)。单克隆抗体具有高度特异性(针对单一抗原位点)。与通常包括针对不同决定簇(表位)的不同抗体的多克隆抗体制剂形成对比, 每种单克隆抗体针对抗原上的单一决定簇。除了其的特异性之外, 单克隆抗体是有利的, 因为其通常由杂交瘤培养物合成, 未被其它免疫球蛋白污染。修饰语“单克隆”指示作为基本上同质的抗体群体获得的抗体的特征并且不应解释为需要通过任何特定方法产生所述抗体。例如, 根据本公开使用的单克隆抗体可以通过多种技术制备, 包括例如杂交瘤方法(例如, Kohler和Milstein, *Nature*, 256:495-97 (1975); Hongo等人, *Hybridoma*, 14 (3):253-260 (1995), Harlow等人, *Antibodies: A Laboratory Manual*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 第2版1988); Hammerling等人, 于: *Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas* 563-681 (Elsevier, N.Y., 1981) 中)、重组DNA方法(参见例如, 美国专利号4,

816,567)、噬菌体展示技术(参见例如,Clackson等人,Nature,352:624-628(1991);Marks等人,J.Mol.Biol.222:581-597(1992);Sidhu等人,J.Mol.Biol.338(2):299-310(2004);Lee等人,J.Mol.Biol.340(5):1073-1093(2004);Fellouse,Proc.Nat'l Acad.Sci.USA 101(34):12467-472(2004);以及Lee等人,J.Immunol.Methods 284(1-2):119-132(2004),以及在具有部分或全部人免疫球蛋白基因座或编码人免疫球蛋白序列的基因的动物中产生人或类人抗体的技术(参见,例如,WO 1998/24893;WO 1996/34096;WO 1996/33735;WO 1991/10741;Jakobovits等人,Proc.Nat'l Acad.Sci.USA 90:2551(1993);Jakobovits等人,Nature 362:255-258(1993);Bruggemann等人,Year in Immunol.7:33(1993);美国专利号5,545,807;5,545,806;5,569,825;5,625,126;5,633,425;和5,661,016;Marks等人,Bio/Technology 10:779-783(1992);Lonberg等人,Nature 368:856-859(1994);Morrison,Nature 368:812-813(1994);Fishwild等人,Nature Biotechnol.14:845-851(1996);Neuberger,Nature Biotechnol.14:826(1996);以及Lonberg和Huszar,Intern.Rev.Immunol.13:65-93(1995)。

[0117] 术语“全长抗体”、“完整抗体”和“全抗体”可互换使用以指基本上完整形式的抗体,与抗体片段或抗体衍生物相对。具体来说,全抗体包括具有包括Fc区的重链和轻链的那些抗体。恒定区可为天然序列恒定域(例如人天然序列恒定域)或其氨基酸序列变体。在一些情况下,完整抗体可以具有一种或多种效应子功能。

[0118] 抗体的“抗体片段”或“功能片段”包含完整抗体的一部分,优选完整抗体的抗原结合和/或可变区,或保留或具有修饰的FcR结合能力的抗体的F区。抗体片段的实例包括Fab、Fab'、F(ab')₂和Fv片段;双体抗体;和线性抗体(参见美国专利5,641,870,实例2;Zapata等人,Protein Eng.8(10):1057-1062(1995))。抗体片段的其它实例包括抗体衍生物,例如单链抗体分子、单价抗体和由抗体片段形成的多特异性抗体

[0119] “抗体衍生物”是包含抗体的抗原结合区的任何构建体。抗体衍生物的实例包括单链抗体分子、单价抗体和由抗体片段形成的多特异性抗体。

[0120] 抗体的木瓜蛋白酶消化产生两个相同的抗原结合片段,称为“Fab”片段,和一个残留的“Fc”片段,这一名称反映了容易结晶的能力。Fab片段由一条完整的L链以及H链的可变区结构域(V_H)和一条重链的第一个恒定结构域(C_H1)组成。就抗原结合而言,每个Fab片段都是单价的,即其具有单个抗原结合位点。抗体的胃蛋白酶处理产生单个大的F(ab')₂片段,其大致相当于具有不同抗原结合活性的两个二硫键连接的Fab片段,并且仍然能够交联抗原。Fab'片段与Fab片段的不同之处在于在C_H1结构域的羧基末端具有几个额外的残基,包括来自抗体铰链区的一个或多个半胱氨酸。本文中将其恒定结构域的(多个)半胱氨酸残基具有游离硫醇基的Fab'称为Fab'-SH。F(ab')₂抗体片段起初以Fab'片段对的形式产生,所述Fab'片段对在Fab'片段之间具有铰链半胱氨酸。抗体片段的其它化学偶联也是已知的。

[0121] Fc片段包含由二硫化物结合在一起的两条H链的羧基末端部分。抗体的效应子功能由Fc区的序列决定,所述Fc区也被某些类型细胞上发现的Fc受体(FcR)识别。

[0122] 术语“Fc区”在本文中用于定义免疫球蛋白重链的C末端区域,包括天然序列Fc区和变体Fc区。尽管免疫球蛋白重链的Fc区的边界可能不同,但人IgG重链Fc区通常被定义为从位置Cys226处的氨基酸残基或从Pro230延伸至其羧基末端。可例如在产生或纯化抗体期

间或通过重组工程化编码抗体的重链的核酸来去除Fc区的C末端赖氨酸(根据EU编号系统, 残基447)。因此, 完整抗体的组合物可以包含所有K447残基被去除的抗体群体、没有K447残基被去除的抗体群体以及具有含和不含K447残基的抗体混合物的抗体群体。适用于本公开的抗体的天然序列Fc区包括人IgG1、IgG2、IgG3和IgG4。

[0123] “天然序列Fc区”包含与自然中存在的Fc区的氨基酸序列相同的氨基酸序列。天然序列人Fc区包括天然序列人IgG1 Fc区(非A和A同种异型); 天然序列人IgG2 Fc区; 天然序列人IgG3 Fc区; 和天然序列人IgG4 Fc区以及其天然存在的变体。

[0124] “变体Fc区”包含以至少一个氨基酸修饰(优选一个或多个氨基酸取代)而区别于天然序列Fc区氨基酸序列的氨基酸序列。优选地, 变体Fc区与天然序列Fc区或亲本多肽的Fc区相比具有至少一个氨基酸取代, 例如在天然序列Fc区或亲本多肽的Fc区中存在约一个至约十个氨基酸取代, 优选约一个至约五个氨基酸取代。本文中的变体Fc区将优选地与天然序列Fc区和/或与亲本多肽的Fc区具有至少约80%同源性, 最优选与其具有至少约90%同源性, 更优选与其具有至少约95%同源性。

[0125] “Fc受体”或“FcR”描述了与抗体的Fc区结合的受体。优选的FcR是天然序列人FcR。此外, 优选的FcR是结合IgG抗体(γ 受体)并包括Fc γ RI、Fc γ RII和Fc γ RIII亚类的受体的FcR, 包括这些受体的等位基因变体和替代剪接形式, Fc γ RII受体包括Fc γ RIIA(“活化受体”)和Fc γ RIIB(“抑制受体”), 其具有主要不同之处在于其胞质结构域的相似氨基酸序列。活化受体Fc γ RIIA在其胞质结构域中含有免疫受体酪氨酸基活化基序(“ITAM”)。抑制受体Fc γ RIIB在其胞质结构域中含有免疫受体酪氨酸基抑制基序(“ITIM”)。(参见, 例如, M. Daëron, *Annu. Rev. Immunol.* 15:203-234 (1997))。在Ravetch和Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9:457-92 (1991); Capel等人, *Immunomethods* 4:25-34 (1994); 以及de Haas等人, *J. Lab. Clin. Med.* 126:330-41 (1995)中综述了FCR。其它的FcR(涵盖将在未来被鉴定的那些FcR)都涵盖在术语“FcR”中。FcR还可以增加抗体的血清半衰期。

[0126] 可以例如在表达人FcRn的转基因小鼠或转染的人细胞系中或在施用具有变体Fc区的多肽的灵长类动物中测定人FcRn高亲和力结合多肽在体内与FcRn的结合和血清半衰期。WO 2004/42072(Presta)描述了与FcR结合增强或减弱的抗体变体。也参见例如Shields等人, *J. Biol. Chem.* 9(2):6591-6604 (2001)。

[0127] “Fv”是含有完全抗原识别和抗原结合位点的最小抗体片段。这个片段由一个重链可变区结构域和一个轻链可变区结构域紧密非共价缔合的二聚体组成。从这两个结构域的折叠中衍生出六个高变环(H链和L链各3个环), 其为抗原结合提供氨基酸残基并赋予抗体抗原结合特异性。然而, 即便是单一可变结构域(或是仅包含对抗原具有特异性的三个HVR的Fv的一半)也具有识别并结合抗原的能力, 尽管其亲和力低于完整的结合位点。

[0128] “单链Fv”也缩写为“sFv”或“scFv”, 是包含连接成单个多肽链的VH和VL抗体结构域的抗体片段。优选地, sFv多肽还包含V_H与V_L结构域之间的多肽接头, 所述接头使sFv能够形成抗原结合所需的结构。关于sFv的综述, 参见Plückthun, *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, 第113卷, Rosenberg和Moore编, Springer-Verlag, New York, 第269-315页 (1994)。

[0129] 术语“双体抗体”是指通过在V_H与V_L结构域之间构建具有短接头(约5-10个残基)的sFv片段(见上一段)而制备的小抗体片段, 使得实现V结构域的链间配对而非链内配对, 从

而产生二价片段,即具有两个抗原结合位点的片段。双特异性双体抗体是两个“交叉”sFv片段的异二聚体,其中两种抗体的 V_H 和 V_L 结构域存在于不同的多肽链上。双体抗体详细描述于例如EP 404,097;WO 1993/011161;WO/2009/121948;WO/2014/191493;Hollinger等人,Proc.Nat'l Acad.Sci.USA 90:6444-48(1993)中。

[0130] 如本文所用,“嵌合抗体”是指一种抗体(免疫球蛋白),其中重链和/或轻链的一部分与来源于特定物种或属于特定抗体类别或亚类的抗体中的相应序列相同或同源,而链的其余部分与来源于其它物种或属于其它抗体类别或亚类的抗体中的相应序列相同或同源,只要其展现所需的生物学活性(美国专利第4,816,567号;Morrison等人,Proc.Nat'l Acad.Sci.USA,81:6851-55(1984))。本文的所关注嵌合抗体包括PRIMATIZED®抗体,其中抗体的抗原结合区来源于通过例如用所关注抗原免疫猕猴产生的抗体。如本文所用,“人源化抗体”是“嵌合抗体”的子集

[0131] 非人(例如,鼠)抗体的“人源化”形式是嵌合抗体,其含有来源于非人免疫球蛋白的最少序列。在一些实施方案中,人源化抗体是人免疫球蛋白(受体抗体),其中来自受体的HVR的残基被来自具有所需的特异性、亲和力和/或能力的非人物种(供体抗体)(例如小鼠、大鼠、兔或非人类灵长类动物)的HVR的残基替换。在一些情况下,人免疫球蛋白的FR残基被相应的非人残基替换。另外,人源化抗体可包含在受体抗体中或在供体抗体中没有发现的残基。可以进行这些修饰来进一步改进抗体的性能,例如结合亲和力。一般而言,人源化抗体将包含基本上所有的至少一个、通常两个可变结构域,其中所有或基本上所有的高变环对应于非人类免疫球蛋白序列的高变环,并且所有或基本上所有的FR区是人类免疫球蛋白序列的那些FR区,但FR区可以包括一个或多个单独的FR残基取代,所述取代可改善抗体性能,例如结合亲和力、异构化、免疫原性等。FR中这些氨基酸取代的数目在H链中通常不超过6,并且在L链中不超过3。人源化抗体任选地还包含免疫球蛋白恒定区(Fc)的至少一部分,通常是人免疫球蛋白的恒定区。关于另外的细节,参见例如Jones等人,Nature 321:522-525(1986);Riechmann等人,Nature 332:323-329(1988);和Presta,Curr.Op.Struct.Biol.2:593-596(1992)。还参见,例如,Vaswani和Hamilton,Ann.Allergy,Asthma&Immunol.1:105-115(1998);Harris,Biochem.Soc.Transactions 23:1035-1038(1995);Hurle and Gross,Curr.Op.Biotech.5:428-433(1994);和美国专利第6,982,321号和第7,087,409号。

[0132] “人抗体”是具有与由人产生的抗体的氨基酸序列相对应的氨基酸序列的抗体,和/或使用本文公开的制备人抗体的任何技术制备的抗体。人抗体的此定义明确排除包含非人抗原结合残基的人源化抗体。可以使用本领域已知的各种技术产生人抗体,包括噬菌体展示文库。Hoogenboom和Winter,J.Mol.Biol.,227:381(1991);Marks等人,J.Mol.Biol.,222:581(1991)。也可用于制备人单克隆抗体的是描述于Cole等人,Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy,Alan R.Liss,p.77(1985);Boerner等人,J.Immunol.,147(1):86-95(1991)中的方法。还参见van Dijk和van de Winkel,Curr.Opin.Pharmacol.5:368-74(2001)。人抗体可以通过向转基因动物施用抗原来制备,所述转基因动物已经被修饰以响应抗原攻击产生此类抗体,但是其内源基因座已经被禁用,例如免疫的异种小鼠(关于XENOMOUSE™技术,参见例如美国专利第6,075,181号和第6,150,584号)。关于通过人B细胞杂交瘤技术产生的人抗体,还参见例如Li等人,Proc.Nat'l

Acad.Sci.USA,103:3557-3562(2006)。

[0133] 术语“高变区”、“HVR”或“HV”在用于本文时是指序列高变和/或形成结构确定的环的抗体可变结构域的区域。通常,抗体包含六个HVR,三个在VH(H1、H2、H3)中,三个在VL(L1、L2、L3)中。在天然抗体中,H3和L3在六个HVR中显示出最大的多样性,尤其是H3被认为在赋予抗体良好特异性中起着独特的作用。参见例如Xu等人,Immunity 13:37-45(2000); Johnson和Wu,Methods in Molecular Biology 248:1-25(Lo编,Human Press,Totowa,NJ,2003))。事实上,仅由重链组成的天然存在的骆驼科抗体在不存在轻链的情况下是有功能的和稳定的。参见例如Hamers-Casterman等人,Nature 363:446-448(1993)和Sheriff等人,Nature Struct.Biol.3:733-736(1996)。

[0134] 许多HVR描绘正在使用并涵盖在本文中。作为Kabat互补决定区(CDR)的HVR基于序列的可变性,并且是最常用的(Kabat等人,同上)。Chothia指的是结构环的位置(Chothia和Lesk J.Mol.Biol.196:901-917(1987))。AbM HVR代表了Kabat CDR与Chothia结构环之间的折衷,并且被Oxford Molecular的AbM抗体建模软件使用。“接触”HVR基于对可用的复杂晶体结构的分析。来自这些HVR中的每一个的残基如下所示。

	环	Kabat	AbM	Chothia	接触
[0135]	L1	L24-L34	L24-L34	L26-L32	L30-L36
	L2	L50-L56	L50-L56	L50-L52	L46-L55
	L3	L89-L97	L89-L97	L91-L96	L89-L96
	H1	H31-H35B	H26-H35B	H26-H32	H30-H35B(Kabat 编号)
	H1	H31-H35	H26-H35	H26-H32	H30-H35(Chothia 编号)
	H2	H50-H65	H50-H58	H53-H55	H47-H58
	H3	H95-H102	H95-H102	H96-H101	H93-H101

[0136] HVR可以包括如下“扩展的HVR”:VL中的24-36或24-34(L1)、46-56或50-56(L2)和89-97或89-96(L3),VH中的26-35(H1)、50-65或49-65(优选的实施方案)(H2)和93-102、94-102或95-102(H3)。对于这些扩展的HVR定义中的每一个,可变结构域残基根据Kabat等人,同上进行编号。

[0137] “框架”或“FR”残基是除本文定义的HVR残基以外的那些可变结构域残基。

[0138] 短语“如Kabat中的可变结构域残基编号”或“如Kabat中的氨基酸位置编号”及其变体指的是用于Kabat等人,同上中的抗体汇编的重链可变结构域或轻链可变结构域的编号系统。使用这种编号系统,实际的线性氨基酸序列可以含有更少或额外的氨基酸,对应于可变结构域的FR或HVR的缩短或插入。例如,重链可变结构域可以包括H2的残基52之后的单个氨基酸插入物(根据Kabat的残基52a)和重链FR残基82之后的插入的残基(例如,根据Kabat的残基82a、82b和82c等)。对于给定的抗体,残基的Kabat编号可以通过将抗体序列的同源区域与“标准”Kabat编号序列进行比对来确定。

[0139] 当涉及可变结构域中的残基(大约轻链的残基1-107和重链的残基1-113)时,通常使用Kabat编号系统(例如,Kabat等人,Sequences of Immunological Interest.第5版Public Health Service,National Institutes of Health,Bethesda,Md.(1991))。当提到免疫球蛋白重链恒定区中的残基时,通常使用“EU编号系统”或“EU索引”(例如,Kabat等人,同上中报道的EU索引)。“如Kabat中的EU索引”是指人IgG1 EU抗体的残基编号。除非本

文另有说明,否则提及抗体可变结构域中的残基编号是指通过Kabat编号系统进行的残基编号。除非本文另有说明,否则提及抗体恒定结构域中的残基编号是指通过EU编号系统进行的残基编号(参见例如美国专利公开第2010-280227号)。

[0140] 如本文所用的“受体人框架”是包含来源于人免疫球蛋白框架或人共有框架的VL或VH框架的氨基酸序列的框架。“来源于”人免疫球蛋白框架或人共有框架的受体人框架可包含其相同的氨基酸序列,或其可含有预先存在的氨基酸序列变化。在一些实施方案中,预先存在的氨基酸变化的数量为10个或更少、9个或更少、8个或更少、7个或更少、6个或更少、5个或更少、4个或更少、3个或更少、或2个或更少。当VH中存在预先存在的氨基酸变化时,优选这些变化发生在位置71H、73H和78H中的仅三个、两个或一个位置;例如,这些位置的氨基酸残基可以是71A、73T和/或78A。在一些实施方案中,VL受体人框架序列与VL人免疫球蛋白框架序列或人共有框架序列相同。

[0141] “人共有框架”是代表在选择人免疫球蛋白VL或VH框架序列中最通常存在的氨基酸残基的框架。通常,人免疫球蛋白VL或VH序列的选择来自可变结构域序列的亚组。通常,序列的亚组是如Kabat等人,Sequences of Proteins of Immunological Interest,第5版Public Health Service,National Institutes of Health,Bethesda,MD(1991)中的亚组。实例包括对于VL,亚组可以是如Kabat等人,同上中的亚组 κ I、 κ II、 κ III或 κ IV。此外,对于VH,亚组可以是如Kabat等人,同上中的亚组I、亚组II或亚组III。

[0142] 特定位置处的“氨基酸修饰”是指特定残基的取代或缺失,或特定残基附近插入至少一个氨基酸残基。“邻近”特定残基的插入是指在其一个至两个残基内的插入。插入可以是特定残基的N末端或C末端。本文优选的氨基酸修饰是取代。

[0143] “亲和力成熟”抗体是指其一个或多个HVR中具有一个或多个改变的抗体,与不具有那些改变的亲本抗体相比,其引起抗体对抗原的亲和力提高。在一些实施方案中,亲和力成熟的抗体对靶抗原具有纳摩尔或甚至皮摩尔的亲和力。通过本领域已知的方法生产亲和力成熟的抗体。例如,Marks等人,Bio/Technology 10:779-783(1992)描述了通过VH和VL结构域改组进行的亲和力成熟。HVR和/或框架残基的随机诱变描述于例如:Barbas等人Proc Nat. Acad. Sci. USA 91:3809-3813(1994);Schier等人Gene 169:147-155(1995);Yelton等人J. Immunol. 155:1994-2004(1995);Jackson等人,J. Immunol. 154(7):3310-9(1995);和Hawkins等人,J. Mol. Biol. 226:889-896(1992)。

[0144] 如本文所用,术语“特异性识别”或“特异性结合”是指可测量和可重复的相互作用,例如靶标和抗体之间的吸引或结合,其决定了在包括生物分子在内的异质分子群的存在下靶标的存在。例如,特异性或优先结合靶标或表位的抗体是以比结合其它靶标或靶标的其它表位更大的亲和力、亲合力、更容易和/或更长的持续时间结合靶标或表位的抗体。还应理解,例如,特异性或优先结合第一靶标的抗体(或部分)可以或不特异性或优先结合第二靶标。因此,“特异性结合”或“优先结合”不一定要求(但其可以包括)排他性结合。特异性结合靶标的抗体可以具有至少约 10^3M^{-1} 或 10^4M^{-1} ,有时约 10^5M^{-1} 或 10^6M^{-1} ,在其它情况下约 10^6M^{-1} 或 10^7M^{-1} 、约 10^8M^{-1} 至 10^9M^{-1} 或约 10^{10}M^{-1} 至 10^{11}M^{-1} 或更高的缔合常数。多种免疫测定形式可用于选择与特定蛋白质特异性免疫反应的抗体。例如,固相ELISA免疫测定常规地用于选择与蛋白质特异性免疫反应的单克隆抗体。关于可以用来确定特异性免疫反应的免疫测定形式和条件的描述,参见例如Harlow和Lane(1988)Antibodies, A Laboratory

Manual, Cold Spring Harbor Publications, New York.

[0145] 如本文所用的“同一性”表示在比对序列的任何特定位置处,序列之间的氨基酸残基是相同的。本文所用的“相似性”指示,在比对序列的任何特定位置处,序列之间的氨基酸残基具有相似的类型。例如,亮氨酸可以代替异亮氨酸或缬氨酸。经常可以相互取代的其它氨基酸包括但不限于:

[0146] -苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸(具有芳香侧链的氨基酸);

[0147] -赖氨酸、精氨酸和组氨酸(具有碱性侧链的氨基酸);

[0148] -天冬氨酸和谷氨酸(具有酸性侧链的氨基酸);

[0149] -天冬酰胺和谷氨酰胺(具有酰胺侧链的氨基酸);以及

[0150] -半胱氨酸和甲硫氨酸(具有含硫侧链的氨基酸)。

[0151] 可以容易地计算出同一度和相似度。(参见例如,Computational Molecular Biology, Lesk, A.M 编, Oxford University Press, New York, 1988; Biocomputing. Informatics and Genome Projects, Smith, D.W. 编, Academic Press, New York, 1993; Computer Analysis of Sequence Data, 第1部分, Griffin, A.M. 和 Griffin, H.G. 编, Humana Press, New Jersey, 1994; Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press, 1987; 和 Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. 和 Devereux, J. 编, M Stockton Press, New York, 1991)。

[0152] 如本文所用,补体蛋白与第二种蛋白质之间的“相互作用”涵盖但不限于蛋白-蛋白相互作用、物理相互作用、化学相互作用、结合、共价结合和离子结合。如本文所用,当抗体破坏、减少或完全消除两种蛋白质之间的相互作用时,抗体“抑制”两种蛋白质之间的相互作用。当本公开的抗体或其片段与两种蛋白质中的一种结合时,所述抗体或其片段“抑制”两种蛋白质之间的相互作用。

[0153] “阻断”抗体、“拮抗”抗体、“抑制”抗体或“中和”抗体是抑制或降低其结合的抗原的一种或多种生物活性的抗体,例如与一种或多种蛋白质的相互作用。在一些实施方案中,阻断抗体、拮抗抗体、抑制抗体或“中和”抗体基本上或完全抑制抗原的一种或多种生物活性或相互作用。

[0154] 术语“抑制剂”是指能够通过降低靶标生物分子的活性或表达来抑制靶标生物分子(例如,mRNA或蛋白质)的生物功能的化合物。抑制剂可以是抗体、小分子或核酸分子。术语“拮抗剂”是指与受体结合并阻断或抑制受体的生物响应的化合物。术语“抑制剂”也可以指“拮抗剂”

[0155] 抗体“效应子功能”是指归因于抗体Fc区(天然序列Fc区或氨基酸序列变体Fc区)的那些生物活性,并且随着抗体同种型而变化。

[0156] 如本文所用,术语“亲和力”是指两种试剂(例如,抗体和抗原)可逆地结合的平衡常数,并表示为解离常数(KD)。亲和力可以比抗体对不相关氨基酸序列的亲和力大至少1倍、大至少2倍、大至少3倍、大至少4倍、大至少5倍、大至少6倍、大至少7倍、大至少8倍、大至少9倍、大至少10倍、大至少20倍、大至少30倍、大至少40倍、大至少50倍、大至少60倍、大至少70倍、大至少80倍、大至少90倍、大至少100倍或大至少1,000倍或更多倍。抗体对靶蛋白的亲和力可以是例如约100纳摩尔(nM)至约0.1nM、约100nM至约1皮摩尔(pM)或约100nM至约1飞摩尔(fM)或更高。如本文所用,术语“亲和力”是指两种或更多种试剂的复合物在稀释

后对解离的抗性。关于抗体和/或抗原结合片段,术语“免疫反应性”和“优先结合”在本文中可互换使用。

[0157] 术语“结合”是指两个分子之间的直接缔合,这是由于例如共价、静电、疏水和离子和/或氢键相互作用,包括例如盐桥和水桥的相互作用。例如,受试抗C1s抗体特异性结合补体C1s蛋白内的表位。“特异性结合”指亲和力为至少约 10^{-7} M或更大,例如 5×10^{-7} M、 10^{-8} M、 5×10^{-8} M和更大。“非特异性结合”指亲和力小于约 10^{-7} M,例如,以 10^{-6} M、 10^{-5} M、 10^{-4} M等的亲和力和结合。

[0158] 本文使用的术语“ k_{on} ”是指抗体与抗原缔合的速率常数。

[0159] 本文使用的术语“ k_{off} ”是指抗体从抗体/抗原复合物中解离的速率常数。

[0160] 本文使用的术语“ K_D ”是指抗体-抗原相互作用的平衡解离常数。

[0161] 如本文所用,关于肽、多肽或抗体序列的“氨基酸序列同一性百分比(%)”和“同源性”是指在序列比对和引入缺口(如果必要)以达到最大序列同一性百分比之后,候选序列中与特定肽或多肽序列中的氨基酸残基相同的氨基酸残基的百分比,并且不考虑作为序列同一性的部分的任何保守取代。为了测定氨基酸序列同一性百分比的比对可以通过本领域技术范围内的多种方式实现,例如,使用公开获得的计算机软件诸如BLAST、BLAST-2、ALIGN或MEGALIGN™(DNASTAR)软件。本领域技术人员可以确定用于测量比对的合适参数,包括本领域已知的在被比较的全长序列上实现最大比对所需的任何算法。

[0162] “生物样品”涵盖从个体获得的多种样品类型,并且可用于诊断或监测测定。所述定义涵盖血液和其它生物来源的液体样品、固体组织样品(例如活组织检查标本或组织培养物或由其衍生的细胞)及其后代。所述定义还包括在获得后以任何方式处理过的样品,例如通过用试剂处理、溶解或富集某些组分,例如多核苷酸。术语“生物样品”涵盖临床样品,并且也包括培养的细胞、细胞上清液、细胞裂解物、血清、血浆、生物液体和组织样品。术语“生物样品”包括尿液、唾液、脑脊液、间质液、眼液、滑液、血液成分(例如血浆和血清)等。术语“生物样品”还包括固体组织样品、组织培养样品和细胞样品。

[0163] “分离的”核酸分子是从至少一种污染核酸分子中鉴定并分离出来的核酸分子,所述污染核酸分子通常在其产生的环境中与其缔合。优选地,分离的核酸不与产生环境相关的所有组分缔合。编码本文多肽和抗体的分离的核酸分子的形式不同于其在自然界中发现的形式或环境。因此,分离的核酸分子不同于细胞中天然存在的编码任何多肽和抗体的核酸。

[0164] 如本文所用,术语“载体”是指能够转运已与其连接的其它核酸的核酸分子。一类载体为“质粒”,其是指其中可连接额外DNA区段的环状双链DNA。另一类载体是噬菌体载体。另一类载体为病毒载体,其中可将额外DNA区段连接到病毒基因组中。某些载体能够在其所导入的宿主细胞中自主复制(例如,具有细菌复制起点的细菌载体和附加型哺乳动物载体)。其它载体(例如,非附加型哺乳动物载体)可在导入宿主细胞后整合到宿主细胞的基因组中,由此随宿主基因组一起复制。此外,某些载体能够引导与其可操作性连接的基因的表达。此类载体在本文中称为“重组表达载体”或简称为“表达载体”。通常,在重组DNA技术中有用的表达载体通常呈质粒形式。在本说明书中,“质粒”和“载体”可互换使用,因为质粒是最最常用的载体形式。

[0165] 本文中可互换使用的“多核苷酸”或“核酸”是指任何长度的核苷酸的聚合物,并且

包括DNA和RNA。核苷酸可以是脱氧核糖核苷酸、核糖核苷酸、修饰的核苷酸或碱基和/或其类似物,或可以通过DNA或RNA聚合酶或通过合成反应并入聚合物中的任何底物。多核苷酸可以包含修饰的核苷酸,例如甲基化的核苷酸及其类似物。如果存在,可以在聚合物组装之前或之后对核苷酸结构进行修饰。核苷酸的序列可能被非核苷酸组分中断。多核苷酸可以包含合成后进行的修饰,例如与标记结合。其它类型的修饰包括例如“帽”(用类似物取代一个或多个天然存在的核苷酸);核苷酸间修饰,例如带有不带电的键(例如,甲基膦酸酯、磷酸三酯、磷酸胺酯、氨基甲酸酯等)和带电荷的键(例如,硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯等)的那些修饰;含有侧基部分,例如蛋白质(例如,核酸酶、毒素、抗体、信号肽、ply-L-赖氨酸等)的那些修饰;具有嵌入剂(例如,吡啶、补骨脂素等)的那些修饰;含有螯合剂(例如,金属、放射性金属、硼、氧化性金属等)的那些修饰;含有烷基化剂的那些修饰;具有修饰的键(例如, α 异头核酸等)的那些修饰;以及未修饰形式的多核苷酸。此外,糖中通常存在的任何羟基可被例如膦酸酯基团、磷酸酯基团替换,被标准保护基团保护,或被活化以制备与额外核苷酸的额外连接,或可与固体或半固体载体结合。5'和3'末端OH可以被磷酸化或被1个至20个碳原子的胺或有机封端基团部分取代。其它羟基也可以衍生成标准保护基团。多核苷酸还可以含有本领域通常已知的核糖或脱氧核糖的类似形式,包括例如2'-O-甲基-、2'-O-烯丙基-、2'-氟-或2'-叠氮基-核糖、碳环糖类似物、 α -异头糖、差向异构糖(例如阿拉伯糖、木糖或来苏糖)、吡喃糖、呋喃糖、景天庚酮糖(sedoheptulose)、无环类似物和碱性核苷类似物(例如甲基核糖苷)。一个或多个磷酸二酯键可以被替代的连接基团替换。这些替代的连接基团包括但不限于这样的实施方案,其中磷酸酯被P(O)S(“硫代酸酯”)、P(S)S(“二硫代酸酯”)、(O)NR₂(“酰胺化物”)、P(O)R、P(O)OR'、CO或CH₂(“甲乙缩醛”)替换,其中每个R或R'独立地是H或任选含有醚(-O-)键的取代或未取代的烷基(1-20 C)、芳基、烯基、环烷基、环烯基或芳烷基。并非多核苷酸中的所有键都需要相同。前面的描述适用于本文提及的所有多核苷酸,包括RNA和DNA。

[0166] 本文所用的“基因编辑剂”被定义为基因编辑的试剂,其代表性实例包括CRISPR相关核酸酶,诸如Cas9和Cpf1 gRNAs、Argonaute内切核酸酶家族、聚类状规则间隔短回文重复(CRISPR)核酸酶、锌指核酸酶(ZFN)、转录活化因子样效应物核酸酶(TALEN)、大核酸酶、其他内切和/或外切核酸酶。参见Schiffer,2012,J Virol 88(17):8920-8936,在此通过引用并入。

[0167] 本文所用的“RNA干扰剂”被定义为通过RNA干扰(RNAi)干扰或抑制靶生物标志物基因表达的任何试剂。此类RNA干扰剂包括但不限于核酸分子,包括与本发明的靶生物标志物基因或其片段同源的RNA分子、短干扰RNA(siRNA)和通过RNA干扰(RNAi)干扰或抑制靶生物标志物核酸表达的小分子。

[0168] “RNA干扰(RNAi)”是一种进化上保守的过程,其中与靶生物标志物核酸相同或高度相似的序列的RNA的表达或引入导致从该靶基因转录的信使RNA(mRNA)的序列特异性降解或特异性转录后基因沉默(PTGS)(参见Coburn,G.和Cullen,B.(2002)J.of Virology 76(18):9225),从而抑制靶生物标志物核酸的表达。在一个实施方案中,RNA是双链RNA(dsRNA)。这个过程在植物、无脊椎动物和哺乳动物细胞中都有描述。在自然界中,RNAi是由dsRNA特异性核酸内切酶Dicer启动的,它促进长dsRNA进行性裂解成称为siRNA的双链片段。siRNA被整合到蛋白质复合物中,该复合物识别并裂解靶mRNA。RNAi也可以通过引入核

酸分子,例如合成siRNA、shRNA或其他RNA干扰剂来启动,以抑制或沉默靶生物标志物核酸的表达。如本文所用,“靶生物标志物核酸表达的抑制”或“标志物基因表达的抑制”包括靶生物标志物核酸或由靶生物标志物核酸编码的蛋白质的表达或蛋白质活性或水平的任何降低。与没有被RNA干扰剂靶向的靶标生物标志物核酸的表达或由没有被RNA干扰剂靶向的靶标生物标志物核酸编码的蛋白质的活性或水平相比,该降低可以是至少30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%或99%或更多。

[0169] 除了RNAi,基因组编辑可用于调节所关注的生物标志物的拷贝数或遗传序列,诸如所关注的生物标志物的组成型或诱导型敲除或突变,诸如补体途径组分如C1q、C1r和/或C1s。例如,CRISPR-Cas系统可用于精确编辑基因组核酸(例如,用于创建无功能或无效突变)。在此类实施方案中,可以表达CRISPR指导RNA和/或Cas酶。例如,可以将只含有指导RNA的载体施用于Cas9酶转基因的动物或细胞。可以使用类似的策略(例如,设计锌指、转录活化因子样效应物(TALE)或归巢大核酸酶)。此类系统在本领域中是众所周知的(参见,例如,美国专利号8,697,359;Sander和Joung(2014)Nat.Biotech.32:347-355;Hale等人(2009)Cell 139:945-956;Karginov和Hannon(2010)Mol.Cell 37:7;美国专利公开2014/0087426和2012/0178169;Boch等人(2011)Nat.Biotech.29:135-136;Boch等人(2009)Science 326:1509-1512;Moscou和Bogdanove(2009)Science 326:1501;Weber等人(2011)PLoS One 6:e19722;Li等人(2011)Nucl.Acids Res.39:6315-6325;Zhang等人(2011)Nat.Biotech.29:149-153;Miller等人(2011)Nat.Biotech.29:143-148;Lin等人(2014)Nucl.Acids Res.42:e47)。根据本领域众所周知的方法,此类遗传策略可以使用组成型表达系统或可诱导表达系统。

[0170] “Piwi-相互作用RNA(piRNA)”是最大的一类非编码小RNA分子。piRNA通过与piwi蛋白相互作用形成RNA蛋白复合物。这些piRNA复合物与生殖系细胞(特别是精子发生中的生殖系细胞)中的反转录转座子和其他遗传元件的表观遗传和转录后基因沉默有关。它们在大小(26-31nt而不是21-24nt)、缺乏序列保守性和增加的复杂性方面与微小RNA(miRNA)不同。然而,像其他小RNA一样,piRNA被认为参与了基因沉默,特别是转座子的沉默。大多数piRNA与转座子序列反义,表明转座子是piRNA靶标。在哺乳动物中,转座子沉默中的piRNA活性在胚胎发育过程中似乎是最重要的,并且在秀丽隐杆线虫和人类中,piRNA对于精子发生都是必需的。piRNA经由形成RNA诱导的沉默复合物(RISC)在RNA沉默中起作用。

[0171] “适体”是与特定靶分子结合的寡核苷酸或肽分子。“核酸适体”是已经通过体外选择或等效的SELEX(配体指数富集的系统进化技术)的重复轮次进行工程改造的核酸种类,以结合各种分子靶标,诸如小分子、蛋白质、核酸,甚至细胞、组织和生物体。“肽适体”是被选择或工程化以结合特定靶分子的人工蛋白质。这些蛋白质由一个或多个由蛋白质支架展示的可变序列肽环组成。它们通常从组合文库中分离,并且通常随后通过定向突变或多轮可变区诱变和选择进行改良。“亲和蛋白”是肽适体的进化,是小而高度稳定的蛋白,被设计成展示肽环,为特定的靶蛋白提供高亲和力的结合表面。它是一种低分子量蛋白质,分子量为12-14kDa,来源于半胱氨酸蛋白酶抑制剂家族。适体在生物技术和治疗应用中是有用的,因为它们提供了可与常用的生物分子抗体相媲美的分子识别特性。除了它们的区别识别之外,适体提供了优于抗体的优势,因为它们可以完全在试管中被工程化,容易通过化学合成产生,具有希望的储存特性,并且在治疗应用中引发很少或没有免疫原性。

[0172] “短干扰RNA”(siRNA),在本文中也称为“小干扰RNA”,被定义为例如通过RNAi抑制靶生物标志物核酸表达的试剂。siRNA可以化学合成,可以通过体外转录产生,或者可以在宿主细胞内产生。在一个实施方案中,siRNA是长度为约15至约40个核苷酸的双链RNA(dsRNA)分子,优选长度为约15至约28个核苷酸,更优选长度为约19至约25个核苷酸,更优选长度为约19、20、21或22个核苷酸,并且可以在每条链上含有长度为约0、1、2、3、4或5个核苷酸的3'和/或5'突出端。两条链之间突出端的长度是独立的,即一条链上突出端的长度不依赖于第二条链上突出端的长度。优选地,siRNA能够通过靶信使RNA(mRNA)的降解或特异性转录后基因沉默(PTGS)来促进RNA干扰。

[0173] 在另一个实施方案中,siRNA是小发夹(也称为茎环)RNA(shRNA)。在一个实施方案中,这些shRNAs由短(例如,19-25个核苷酸)反义链组成,其后是5-9个核苷酸的环,以及类似的有义链。替代地,有义链可以在核苷酸环结构之前,反义链可以在其后。这些shRNAs可以包含在质粒、逆转录病毒和慢病毒中,并由例如pol III U6启动子或另一种启动子表达(参见,例如Stewart等人(2003)RNA Apr;9(4):493-501,在本文中通过引用并入)。

[0174] “宿主细胞”包括单个细胞或细胞培养物,其可以是或已经是用于并入多核苷酸插入物的载体的受体。宿主细胞包括单个宿主细胞的后代,并且由于自然、意外或有意的突变,后代不一定与原始亲代细胞完全相同(在形态学或基因组DNA互补方面)。宿主细胞包括用本公开的多核苷酸在体内转染的细胞。

[0175] 本文所用的“载体”包括药学上可接受的载体、赋形剂或稳定剂,其在所用的剂量和浓度下对暴露于其中的细胞或哺乳动物是无毒的。通常生理上可接受的载体是pH缓冲水溶液。生理上可接受的载体的实例包括缓冲剂(诸如磷酸盐、柠檬酸盐和其它有机酸);抗氧化剂(包括抗坏血酸);低分子量(少于约10个残基)多肽;蛋白质(诸如血清白蛋白、明胶或免疫球蛋白);亲水聚合物(诸如聚乙烯吡咯烷酮);氨基酸(诸如甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、精氨酸或赖氨酸);单糖、二糖和其他碳水化合物(包括葡萄糖、甘露糖或糊精);螯合剂(诸如EDTA);糖醇(诸如甘露醇或山梨醇);成盐抗衡离子(诸如钠);和/或非离子型表面活性剂(诸如TWEEN™、聚乙二醇(PEG)和PLURONICS™)。

[0176] 术语“预防”是本领域公认的,并且当用于诸如癫痫(诸如特发性全身性癫痫、特发性部分性癫痫、症状性全身性癫痫或症状性部分性癫痫)的病状使用时是本领域熟知的,并且包括组合物的施用,所述施用使受试者相对于不接受该组合物的受试者而言,医学病状的一种或多种症状的频率或严重性得到降低,或发作延迟。类似地,癫痫(诸如特发性全身性癫痫、特发性部分性癫痫、症状性全身性癫痫或症状性部分性癫痫)的预防包括减少接受治疗的患者(相对于未接受治疗的患者)发生癫痫(诸如特发性全身性癫痫、特发性部分性癫痫、症状性全身性癫痫或症状性部分性癫痫)的可能性。

[0177] 本文使用的术语“受试者”是指活的哺乳动物,并且可以与术语“患者”互换使用。哺乳动物的实例包括但不限于哺乳动物类的任何成员:人、非人灵长类动物(诸如黑猩猩和其它猿和猴物种);农产动物(诸如牛、马、绵羊、山羊、猪);家养动物(诸如兔、狗和猫);实验动物(包括啮齿动物,诸如大鼠、小鼠和豚鼠)等。所述术语不表示特定的年龄或性别。

[0178] 如本文所用,术语“治疗(treating)”或“治疗(treatment)”包括减轻病状、阻止病状或逆转病状的症状、临床体征或潜在病理,以稳定或改善受试者的病状,或降低受试者的病状恶化的可能性,如同受试者没有接受治疗一样。

[0179] 关于主题治疗方法的术语化合物的“治疗有效量”是指制剂中的化合物的量, 当作为所需给药方案的部分(向哺乳动物, 优选人)施用, 根据待治疗的病症或病状的临床可接受标准或美容目的, 例如以适用于任何药物治疗的合理效益/风险比, 所述量减轻症状、改善病状或减缓疾病病状的发作。本文中的治疗有效量可根据例如疾病状态、年龄、性别和患者体重以及抗体在个体中引发所需响应的能力的因素而变化。

[0180] 如本文所用, 处于罹患特定疾病、病症或病状的“风险”下的个体可以具有或不具有可检测的疾病或疾病症状, 并且在本文所述的治疗方法之前可以具有或不具有可检测的疾病或疾病症状。“处于风险下”表示个体具有一种或多种风险因素, 所述危险因素是与特定疾病、病症或病状的发展相关的可测量参数(如本领域已知的)。具有一种或多种这些风险因素的个体比没有一种或多种这些风险因素的个体更有可能发生特定疾病、病症或病状。

[0181] “慢性”施用是指以连续而非急性的方式施用, 从而在一段延长的时间内保持最初的治疗效果(活性)。“间歇”施用是指不是不间断地连续施用的治疗, 而是本质上是循环/周期性的。

[0182] 如本文所用, 与另一种化合物或组合物“联合”施用包括同时施用和/或在不同时间施用。联合施用还涵盖作为共同共同配制物施用或作为单独组合物施用, 包括不同的给药频率或间隔, 并且使用相同的施用途径或不同的施用途径。

[0183] 除非另有定义, 否则本文中使用的所有技术和科学术语具有与本发明所属领域的普通技术人员通常理解的含义相同的含义。虽然还可在本发明的实践或测试中使用类似于或等同于本文所述的那些方法和材料的任何方法和材料, 但现在描述优选的方法和材料。本文提及的所有出版物都通过引用并入本文, 以公开并描述与引用的出版物相关的方法和/或材料。例如, Sambrook等人, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*第3版(2001) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.; *Current Protocols in Molecular Biology* (F.M.Ausubel等人编(2003)); the series *Methods in Enzymology* (Academic Press, Inc.): *PCR 2: A Practical Approach* (M.J.MacPherson, B.D.Hames和G.R.Taylor编(1995)), Harlow和Lane编(1988) *Antibodies, A Laboratory Manual*, and *Animal Cell Culture* (R.I.Freshney编(1987)); *Oligonucleotide Synthesis* (M.J.Gait编, 1984); *Methods in Molecular Biology*, Humana Press; *Cell Biology: A Laboratory Notebook* (J.E.Cellis编, 1998) Academic Press; *Animal Cell Culture* (R.I.Freshney) 编, 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和D.G.Newell编, 1993-8) J.Wiley and Sons; *Handbook of Experimental Immunology* (D.M.Weir和C.C.Blackwell编); *Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells* (J.M.Miller和M.P.Calos编, 1987); *PCR: The Polymerase Chain Reaction*, (Mullis等人编, 1994); *Current Protocols in Immunology* (J.E.Coligan等人编, 1991); *Short Protocols in Molecular Biology* (Wiley and Sons, 1999); *Immunobiology* (C.A.Janeway和P.Travers, 1997); *Antibodies* (P.Finch, 1997); *Antibodies: A Practical Approach* (D.Catty编, IRL Press, 1988-1989); *Monoclonal Antibodies: A Practical Approach* (P.Shepherd和C.Dean编, Oxford University Press,

2000);Using Antibodies:A Laboratory Manual (E.Harlow和D.Lane (Cold Spring Harbor Laboratory Press,1999);The Antibodies (M.Zanetti和J.D.Capra编,Harwood Academic Publishers,1995);和Cancer:Principles and Practice of Oncology (V.T.DeVita等人编,J.B.Lippincott Company,1993)中描述的广泛使用的方法。

[0184] 抗补体C1q抗体

[0185] 本文公开的抗C1q抗体是有效的C1q抑制剂,并且可以在任何时期给药以持续抑制外周和中枢神经系统,然后任选地停药,以允许在其活性对于中枢神经系统修复可能重要时恢复正常的C1q功能。用本文公开的抗C1q抗体在动物研究中获得的结果可以容易地与相同抗体的人源化版本(本文公开的抗体与小鼠和人C1q交叉反应)以及其片段和/或衍生物一起带入临床。

[0186] C1q是一种460kDa的大多聚体蛋白,由18条多肽链(6条C1q A链、6条C1q B链和6条C1q C链)组成。C1r和C1s补体蛋白与C1q尾区结合以形成C1复合物(C1qr₂s₂)。

[0187] 合适的抑制剂包括结合经典补体活化途径的C1复合物中的补体因子C1q和/或C1q的抗体。结合补体因子可以非限制性地来源于具有补体系统的任何生物,包括任何哺乳动物生物,例如人、小鼠、大鼠、兔、猴、狗、猫、牛、马、骆驼、绵羊、山羊或猪。

[0188] 如本文所用,“C1复合物”是指蛋白质复合物,其可包括但不限于一种C1q蛋白质、两种C1r蛋白质和两种C1s蛋白质(例如,C1qr²s²)。

[0189] 如本文所用,“补体因子C1q”是指野生型序列和天然存在的变体序列。

[0190] 由本公开的抗体识别的补体因子C1q的非限制性实例是人C1q,包括三条多肽链A、B和C:

[0191] C1q,链A(智人),登录号蛋白质

[0192] 数据库:NP_057075.1;基因库编号:NM_015991:

[0193] >gi|7705753|ref|NP_057075.1|组分C1q

[0194] 子组分亚单位A前体[智人]

[0195] (SEQ ID NO:1)

[0196] MEGPRGWLVLCLVLAISLASMVTEDLCRAPDGKKGEAGRPGRGRPLKGEQGEPGAPGIRTGIQGLKG
DQGEPPSGNPGKVGYPGPGSGPLGARGIPGIKGTGSGPNIKDQPRPAFSAIRRNPPMGGNVVIFDTVITNQEEPY
QNHSGRFVCTVPGYYFTFQVLSQWEICLSIVSSSRGQVRRSLGFCDDTNKGLFQVVSGGMVLQLQQGDQVWVEKD
PKKGHIYQGSEADSVFSGFLIFPSA。

[0197] C1q,链B(智人),登录号蛋白质

[0198] 数据库:NP_000482.3;基因库编号:NM_000491.3:

[0199] >gi|87298828|ref|NP_000482.3|组分C1q

[0200] 子组分亚单位B前体[智人]

[0201] (SEQ ID NO:2)

[0202] MMMKIPWGSIPVLMLLLLGLIDISQAQLSCTGPPAIPGIPGTPGPDGQPGTPGIKGEKGLPGLA
GDHGEFGKGDPIPGNPGKVGPKGPMGPKGGPGAPGAPGPKGESGDYKATQKIAFSATRTINVPLRRDQTIRFDH
VITNMNNYEPKSGKFTCKVPGLYYFTYHASSRGNLCVNLMRGRERAQKVVTFCDYAYNTFQVTTGGMVLKLEQGE
NVFLQATDKNSLLGMEGANSIFSGLLLFPDMEA。

[0203] C1q,链C(智人),登录号蛋白质

[0204] 数据库:NP_001107573.1;基因库编号:

[0205] NM_001114101.1:

[0206] >gi|166235903|ref|NP_001107573.1|组分C1q

[0207] 亚组分亚单位C前体[智人]

[0208] (SEQ ID NO:3)

[0209] MDVGPSLPHLGLKLLLLLLLLPLRGQANTGCYGI PGMPGLPGAPGKDG YDGLPGPKGEPGIPAIPGI
RGPKGQKGEPGLPGHPGKNGPMGPPGMPGVPGMGI PGEPGEEGRYKQKFQSVFTVTRQTHQPPAPNSLIRFNAVL
TNPQGDYDTSTGKFTCKVPGLYYFVYHASHTANLCVLLYRSGVKVVTFCGHTSKTNQVNSGGVLLRLQVGEEVWLA
VNDYYDMVGIIQGS DSVFSGFLLFPD。

[0210] 因此,本公开的抗C1q抗体可以结合C1q蛋白的多肽链A、多肽链B和/或多肽链C。在一些实施方案中,本公开的抗C1q抗体结合人C1q或其同源物的多肽链A、多肽链B和/或多肽链C,所述同源物例如小鼠、大鼠、兔、猴、狗、猫、牛、马、骆驼、绵羊、山羊或猪C1q。在一些实施方案中,抗C1q抗体是人抗体、人源化抗体或嵌合抗体。

[0211] 合适的抗体包括用于预防癫痫、降低发生癫痫的风险或治疗癫痫的方法的结合补体C1q蛋白的抗体(即,抗补体C1q抗体,在本文中也称为抗C1q抗体和C1q抗体)和编码这种抗体的核酸分子,所述癫痫诸如特发性全身性癫痫、特发性部分性癫痫、症状性全身性癫痫或症状性部分性癫痫。

[0212] 适用于与C1q蛋白结合的其它抗C1q抗体在本领域中是众所周知的,并且包括例如抗体Cat#:AF2379、AF1696、MAB1696、和MAB23791(R&D System);NBP1-87492、NB100-64420、H00000712-B01P、H00000712-D01P、和H00000712-D01(Novus Biologicals);MA1-83963、MA1-40311、PA5-14208、PA5-29586、和PA1-36177(ThermoFisher Scientific);ab71940、ab11861、ab4223、ab72355、ab182451、ab46191、ab227072、ab182940、ab216979、和ab235454(abcam)等。此外,用于减少C1q表达的多种siRNA、shRNA、CRISPR构建体可以在上述提及的公司的商业产品列表中找到,诸如SiRNA产品#sc-43651、sc-44962、sc-105153、sc-141842;ShRNA产品#sc-43651-SH、sc-43651-V、sc-44962-SH、sc-44962-V、sc-105153-SH、sc-105153-V、sc-141842-SH、sc-141842-V;CRISPR产品#sc-419385、sc-419385-HDR、sc-419385-NIC、sc-419385-NIC-2、sc-402156、sc-402156-KO-2、sc-404309、sc-404309-HDR、sc-404309-NIC、sc-404309-NIC-2、sc-419386、sc-419386-HDR、sc-419386-NIC、sc-419386-NIC-2(Santa Cruz Biotechnology等)。

[0213] 以下二十个段落中提到的所有序列都通过引用并入美国专利第9,708,394号,其公开的抗体和相关组合物在此通过引用并入。

[0214] 抗体M1的轻链和重链可变结构域序列

[0215] 使用标准技术,确定了编码抗体M1的轻链可变结构域和重链可变结构域的核酸和氨基酸序列。抗体M1轻链可变结构域的氨基酸序列是:

[0216] DVQITQSPSYLAASPGETITINC**RASKSINKYLA**WYQEKPGKTNKLLIY**SGSTLQSGIPS**
RFGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAMY**YCQQHNEYPLT**TFGAGTKLELK (SEQ ID NO:4)。

[0217] 轻链可变结构域的高可变区(HVR)以粗体和下划线标出。在一些实施方案中,M1轻链可变结构域的HVR-L1具有序列**RASKSINKYLA**(SEQ ID NO:5),M1轻链可变结构域的HVR-L2具有序列**SGSTLQS**(SEQ ID NO:6),并且M1轻链可变结构域的HVR-L3具有序列**QQHNEYPLT**

(SEQ ID NO:7)。

[0218] 抗体M1重链可变结构域的氨基酸序列是：

QVQLQQPGAELVKPGASVKLSCKSSGYHFTSYWMHWVKQRPQGQLEWIGVIHPNSG

[0219] **SINYNKFKES**KATLTVDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCAG**ERDSTEVLPM**DYWGQ
GTSVTVSS (SEQ ID NO:8)。

[0220] 重链可变结构域的高可变区 (HVR) 以粗体和下划线标出。在一些实施方案中, M1重链可变结构域的HVR-H1具有序列GYHFTSYWMH (SEQ ID NO:9), M1重链可变结构域的HVR-H2具有序列VIHPNSGSINYNKFKES (SEQ ID NO:10), 并且M1重链可变结构域的HVR-H3具有序列ERDSTEVLPM DY (SEQ ID NO:11)。

[0221] 编码轻链可变结构域的核酸序列被确定为：

[0222] GATGTCCAGATAACCCAGTCTCCATCTTATCTTGCTGCATCTCCTGGAGAAACCATTACTATTAATTG
CAGGGCAAGTAAGAGCATTAACAAATATTTAGCCTGGTATCAAGAGAAACCTGGGAAAATAAAGCTTCTTATC
TACTCTGGATCCACTTTGCAATCTGGAATTCATCAAGTTTCAGTGGCAGTGGATCTGGTACAGATTTCACTCTCA
CCATCAGTAGCCTGGAGCCTGAAGATTTGCAATGTATTACTGTCAACAACATAATGAATACCCGCTCACGTTCCG
TGCTGGGACCAAGCTGGAGCTGAAA (SEQ ID NO:12)。

[0223] 编码重链可变结构域的核酸序列被确定为：

[0224] CAGGTCCAAGTGCAGCAGCCTGGGGCTGAGCTGGTAAAGCCTGGGGCTTCAGTGAAGTTGTCCTGCAA
GTCTTCTGGCTACCATTTCACCAGCTACTGGATGCACTGGGTGAAGCAGAGGCCTGGACAAGGCCTTGAGTGGATT
GGAGTGATTATCCTAATAGTGGTAGTATTAATACTACAATGAGAAGTTTCGAGAGCAAGGCCACACTGACTGTAGACA
AATCCTCCAGCACAGCCTACATGCAACTCAGCAGCCTGACATCTGAGGACTCGGCGGTCTATTATTGTGCAGGAGA
GAGAGATTCTACGGAGGTTCTCCCTATGGACTACTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCA (SEQ ID
NO:13)。

[0225] 物质保藏

[0226] 以下物质已根据布达佩斯条约 (Budapest Treaty) 保藏在美国典型培养物保藏中心 (American Type Culture Collection), ATCC专利保管处, 10801 University Blvd., Manassas, Va. 20110-2209, USA (ATCC)：

样品 ID	同种型	保藏物	ATCC
		日期	登录号
[0227] 小鼠杂交瘤 C1qM1 7788-1(M) 051613 产生 抗 C1q 抗体 M1	IgG1, κ	6 月 6 日,	PTA-120399
		2013	

[0228] 产生M1抗体的杂交瘤细胞系 (小鼠杂交瘤C1qM1 7788-1 (M) 051613) 已在确保在专利申请未决期间可获得培养物的条件下保藏在ATCC, 期限为30年, 或最近请求后的5年, 或专利的有效期限, 以较长者为准。如果在此期间保藏物变得不可行, 那么将替换保藏物。根据主题申请的对应物或其后代提交的国家的外国专利法的要求, 保藏物是可用的。然而, 应该理解的是, 保藏物的可用性并不构成在减损由政府行为授予的专利权的情况下实践主题发明的许可。

[0229] 本文公开了施用包含轻链可变结构域和重链可变结构域的抗C1q抗体的方法。抗体可以至少结合人C1q、小鼠C1q或大鼠C1q。抗体可以是人源化抗体、嵌合抗体或人抗体。抗体可以是单克隆抗体、其抗体片段和/或其抗体衍生物。轻链可变结构域包含由以登录号PTA-120399保藏的杂交瘤细胞系产生的单克隆抗体M1的HVR-L1、HVR-L2和HVR-L3。重链可变结构域包含由以ATCC登录号PTA-120399保藏的杂交瘤细胞系产生的单克隆抗体M1的HVR-H1、HVR-H2和HVR-H3。

[0230] 在一些实施方案中,轻链可变结构域和重链可变结构域的氨基酸序列包含HVR-L1的SEQ ID NO:5、HVR-L2的SEQ ID NO:6、HVR-L3的SEQ ID NO:7、HVR-H1的SEQ ID NO:9、HVR-H2的SEQ ID NO:10和HVR-H3的SEQ ID NO:11中的一个或多个。

[0231] 抗体可包含与SEQ ID NO:4至少85%、90%或95%相同的轻链可变结构域氨基酸序列,优选地同时保留HVR-L1 RASKSINKYLA(SEQ ID NO:5)、HVR-L2 SGSTLQS(SEQ ID NO:6)和HVR-L3 QQHNEYPLT(SEQ ID NO:7)。抗体可包含与SEQ ID NO:8至少85%、90%或95%相同的重链可变结构域氨基酸序列,优选地同时保留HVR-H1 GYHFTSYWMH(SEQ ID NO:9)、HVR-H2 VIHPNSGSINYNEKFES(SEQ ID NO:10)和HVR-H3ERDSTEVLPM DY(SEQ ID NO:11)。

[0232] 本文公开了施用抗C1q抗体的方法,所述抗体抑制C1q与自身抗体之间的相互作用。在优选的实施方案中,抗C1q抗体促使从循环或组织中清除C1q。

[0233] 抗C1q抗体可以与C1q蛋白结合,并且与C1q蛋白的一个或多个氨基酸在选自以下的氨基酸残基中结合:(a) SEQ ID NO:1的氨基酸残基196-226(SEQ ID NO:16),或对应于SEQ ID NO:1的氨基酸残基196-226(GLFQVVSGGMVLQLQQGDQVWVEKD PKKGHI)(SEQ ID NO:16)的C1q蛋白链A(C1qA)的氨基酸残基;(b) SEQ ID NO:1的氨基酸残基196-221(SEQ ID NO:17),或对应于SEQ ID NO:1的氨基酸残基196-221(GLFQVVSGGMVLQLQQGDQVWVEKDP)(SEQ ID NO:17)的C1qA的氨基酸残基;(c) SEQ ID NO:1的氨基酸残基202-221(SEQ ID NO:18),或对应于SEQ ID NO:1的氨基酸残基202-221(SGGMVLQLQQGDQVWVEKDP)(SEQ ID NO:18)的C1qA的氨基酸残基;(d) SEQ ID NO:1的氨基酸残基202-219(SEQ ID NO:19),或对应于SEQ ID NO:1的氨基酸残基202-219(SGGMVLQLQQGDQVWVEK)(SEQ ID NO:19)的C1qA的氨基酸残基;和(e) SEQ ID NO:1的氨基酸残基Lys 219和/或Ser 202,或对应于SEQ ID NO:1的Lys 219和/或Ser 202的C1qA的氨基酸残基。

[0234] 在一些实施方案中,抗体进一步与C1q蛋白的一个或多个氨基酸在选自以下的氨基酸残基中结合:(a) SEQ ID NO:3的氨基酸残基218-240(SEQ ID NO:20),或对应于SEQ ID NO:3的氨基酸残基218-240(WLAVNDYYDMVGI QGSDSVFSGF)(SEQ ID NO:20)的C1q蛋白链C(C1qC)的氨基酸残基;(b) SEQ ID NO:3的氨基酸残基225-240(SEQ ID NO:21),或对应于SEQ ID NO:3的氨基酸残基225-240(YDMVGI QGSDSVFSGF)(SEQ ID NO:21)的C1qC的氨基酸残基;(c) SEQ ID NO:3的氨基酸残基225-232(SEQ ID NO:22),或对应于SEQ ID NO:3的氨基酸残基225-232(YDMVGIQG)(SEQ ID NO:22)的C1qC的氨基酸残基;(d) SEQ ID NO:3的氨基酸残基Tyr 225或对应于SEQ ID NO:3的氨基酸残基Tyr 225的C1qC的氨基酸残基;(e) SEQ ID NO:3的氨基酸残基174-196(SEQ ID NO:23),或对应于SEQ ID NO:3的氨基酸残基174-196(HTANLCVLLYRSGVKVVTFCGHT)(SEQ ID NO:23)的C1qC的氨基酸残基;(f) SEQ ID NO:3的氨基酸残基184-192(SEQ ID NO:24),或对应于SEQ ID NO:3的氨基酸残基184-192(RSGVKVVT F)(SEQ ID NO:24)的C1qC的氨基酸残基;(g) SEQ ID NO:3的氨基酸残基185-187

或对应于SEQ ID NO:3的氨基酸残基185-187 (SGV) 的C1qC的氨基酸残基; (h) SEQ ID NO:3的氨基酸残基Ser 185或对应于SEQ ID NO:3的氨基酸残基Ser 185的C1qC的氨基酸残基。

[0235] 在某些实施方案中,抗C1q抗体与如SEQ ID NO:1所示的人C1qA的氨基酸残基Lys219和Ser 202,或对应于如SEQ ID NO:1所示的Lys 219和Ser 202的人C1qA的氨基酸;和如SEQ ID NO:3所示的人C1qC的氨基酸残基Tyr 225,或对应于如SEQ ID NO:3所示的Tyr 225的人C1qC的氨基酸残基结合。在某些实施方案中,抗C1q抗体与如SEQ ID NO:1所示的人C1qA的氨基酸残基Lys 219,或对应于如SEQ ID NO:1所示的Lys 219的人C1qA的氨基酸残基;和如SEQ ID NO:3所示的人C1qC的氨基酸残基Ser 185,或对应于如SEQ ID NO:3所示的Ser 185的人C1qC的氨基酸残基结合。

[0236] 在一些实施方案中,抗C1q抗体与C1q蛋白结合,并且与C1q蛋白的一个或多个氨基酸在选自以下的氨基酸残基中结合: (a) SEQ ID NO:3的氨基酸残基218-240 (SEQ ID NO:20),或对应于SEQ ID NO:3的氨基酸残基218-240 (WLAVNDYYDMVGI QGSDSVFSGF) (SEQ ID NO:20) 的C1qC的氨基酸残基; (b) SEQ ID NO:3的氨基酸残基225-240 (SEQ ID NO:21),或对应于SEQ ID NO:3的氨基酸残基225-240 (YDMVGI QGSDSVFSGF) (SEQ ID NO:21) 的C1qC的氨基酸残基; (c) SEQ ID NO:3的氨基酸残基225-232 (SEQ ID NO:22),或对应于SEQ ID NO:3的氨基酸残基225-232 (YDMVGIQG) (SEQ ID NO:22) 的C1qC的氨基酸残基; (d) SEQ ID NO:3的氨基酸残基Tyr 225或对应于SEQ ID NO:3的氨基酸残基Tyr 225的C1qC的氨基酸残基; (e) SEQ ID NO:3的氨基酸残基174-196 (SEQ ID NO:23),或对应于SEQ ID NO:3的氨基酸残基174-196 (HTANLCVLLYRSGVKVTFCHGT) (SEQ ID NO:23) 的C1qC的氨基酸残基; (f) SEQ ID NO:3的氨基酸残基184-192 (SEQ ID NO:24),或对应于SEQ ID NO:3的氨基酸残基184-192 (RSGVKVTF) (SEQ ID NO:24) 的C1qC的氨基酸残基; (g) SEQ ID NO:3的氨基酸残基185-187或对应于SEQ ID NO:3的氨基酸残基185-187 (SGV) 的C1qC的氨基酸残基; (h) SEQ ID NO:3的氨基酸残基Ser 185或对应于SEQ ID NO:3的氨基酸残基Ser 185的C1qC的氨基酸残基。

[0237] 在一些实施方案中,本公开的抗C1q抗体抑制C1q与C1s之间的相互作用。在一些实施方案中,抗C1q抗体抑制C1q与C1r之间的相互作用。在一些实施方案中,抗C1q抗体抑制C1q与C1s之间和C1q与C1r之间的相互作用。在一些实施方案中,抗C1q抗体抑制C1q与另一种抗体(例如自身抗体)之间的相互作用。在优选的实施方案中,抗C1q抗体促使从循环或组织中清除C1q。在一些实施方案中,抗C1q抗体以小于2.5:1、2.0:1、1.5:1、或1.0:1的化学计量抑制各自的相互作用。在一些实施方案中,在约等摩尔浓度的C1q和抗C1q抗体下,C1q抗体抑制相互作用,诸如C1q-C1s相互作用。在其它实施方案中,抗C1q抗体以小于20:1;小于19.5:1;小于19:1;小于18.5:1;小于18:1;小于17.5:1;小于17:1;小于16.5:1;小于16:1;小于15.5:1;小于15:1;小于14.5:1;小于14:1;小于13.5:1;小于13:1;小于12.5:1;小于12:1;小于11.5:1;小于11:1;小于10.5:1;小于10:1;小于9.5:1;小于9:1;小于8.5:1;小于8:1;小于7.5:1;小于7:1;小于6.5:1;小于6:1;小于5.5:1;小于5:1;小于4.5:1;小于4:1;小于3.5:1;小于3:1;小于2.5:1;小于2.0:1;小于1.5:1;或小于1.0:1的化学计量与C1q结合。在某些实施方案中,抗C1q抗体以范围介于20:1至1.0:1或小于1.0:1的结合化学计量结合C1q。在某些实施方案中,抗C1q抗体以范围介于6:1至1.0:1或小于1.0:1的结合化学计量结合C1q。在某些实施方案中,抗C1q抗体以范围介于2.5:1至1.0:1或小于1.0:1的结合化学计量结合C1q。在一些实施方案中,抗C1q抗体抑制C1q与C1r之间、C1q与C1s之间、或C1q与

C1r和C1s两者之间的相互作用。在一些实施方案中,抗C1q抗体抑制C1q与C1r之间、C1q与C1s之间和/或C1q与C1r和C1s两者之间的相互作用。在一些实施方案中,抗C1q抗体结合C1q A链。在其它实施方案中,抗C1q抗体结合C1q B链。在其它实施方案中,抗C1q抗体结合C1q C链。在一些实施方案中,抗C1q抗体结合C1q A链、C1q B链和/或C1q C链。在一些实施方案中,抗C1q抗体结合C1q A链、B链和/或C链的球状结构域。在其它实施方案中,抗C1q抗体结合C1q A链、C1q B链和/或C1q C链的胶原样结构域。

[0238] 当本公开的抗体抑制两种或更多种补体因子之间的相互作用,例如C1q与C1s之间的相互作用或C1q与C1r之间的相互作用时,相对于其中不存在本公开的抗体的对照,在抗体的存在下发生的相互作用可以减少至少10%、至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少95%或至少99%。在某些实施方案中,相对于其中不存在本公开的抗体的对照,在抗体的存在下发生的相互作用减少了范围介于至少30%至至少99%的量。

[0239] 在一些实施方案中,相对于其中不存在本公开的抗体的对照,本公开的抗体使C2或C4裂解抑制至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少95%或至少99%,或抑制范围介于至少30%至至少99%的量。测量C2或C4裂解的方法在本领域是众所周知的。本公开的抗体关于C2或C4裂解的 EC_{50} 值可以小于 $3\mu\text{g/ml}$; $2.5\mu\text{g/ml}$; $2.0\mu\text{g/ml}$; $1.5\mu\text{g/ml}$; $1.0\mu\text{g/ml}$; $0.5\mu\text{g/ml}$; $0.25\mu\text{g/ml}$; $0.1\mu\text{g/ml}$; $0.05\mu\text{g/ml}$ 。在一些实施方案中,本公开的抗体在大约等摩尔浓度的C1q和相应的抗C1q抗体下抑制C2或C4裂解。

[0240] 在一些实施方案中,相对于其中不存在本公开的抗体的对照,本公开的抗体使自身抗体依赖性和补体依赖性细胞毒性(CDC)抑制至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少95%或至少99%,或抑制范围介于至少30%至至少99%的量。本公开的抗体关于抑制自身抗体依赖性和补体依赖性细胞毒性的 EC_{50} 值可以小于 $3\mu\text{g/ml}$; $2.5\mu\text{g/ml}$; $2.0\mu\text{g/ml}$; $1.5\mu\text{g/ml}$; $1.0\mu\text{g/ml}$; $0.5\mu\text{g/ml}$; $0.25\mu\text{g/ml}$; $0.1\mu\text{g/ml}$; $0.05\mu\text{g/ml}$ 。

[0241] 在一些实施方案中,相对于其中不存在本公开的抗体的对照,本公开的抗体使补体依赖性细胞介导的细胞毒性(CDCC)抑制至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少95%或至少99%,或抑制范围介于至少30%至至少99%的量。测量CDCC的方法在本领域是众所周知的。本公开的抗体关于CDCC抑制的 EC_{50} 值可以小于 $3\mu\text{g/ml}$; $2.5\mu\text{g/ml}$; $2.0\mu\text{g/ml}$; $1.5\mu\text{g/ml}$; $1.0\mu\text{g/ml}$; $0.5\mu\text{g/ml}$; $0.25\mu\text{g/ml}$; $0.1\mu\text{g/ml}$; $0.05\mu\text{g/ml}$ 。在一些实施方案中,本公开的抗体抑制CDCC,但不抑制抗体依赖性细胞毒性(ADCC)。

[0242] 人源化抗补体C1q抗体

[0243] 本公开的人源化抗体特异性结合经典补体途径的C1复合物中的补体因子C1q和/或C1q蛋白。人源化抗C1q抗体可特异性结合人C1q、人和小鼠C1q、大鼠C1q或人C1q、小鼠C1q和大鼠C1q。

[0244] 以下十六个段落中提到的所有序列都通过引用并入美国专利美国专利第10,316,081号,其公开的抗体和相关组合物在此通过引用并入。

[0245] 在一些实施方案中,人重链恒定区是人IgG4重链恒定区,其包含SEQ ID NO:47的

氨基酸序列,或与SEQ ID NO:47具有至少70%、至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%同源性。根据Kabat编号,人IgG4重链恒定区可以包含具有一个或多个修饰和/或氨基酸取代的Fc区。在这种情况下,Fc区包含位置248处的亮氨酸至谷氨酸的氨基酸取代,其中这种取代抑制Fc区与Fc受体相互作用。在一些实施方案中,Fc区包含位置241处的丝氨酸至脯氨酸的氨基酸取代,其中这种取代防止抗体中的臂转换。

[0246] 人IgG4(S241P L248E)重链恒定结构域的氨基酸序列是:

[0247] ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV
VTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVTV
DVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAK
GQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSR
WQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLK (SEQ ID NO:47)。

[0248] 抗体可包含重链可变结构域和轻链可变结构域,其中重链可变结构域包含选自SEQ ID NO:31-34中的任一个的氨基酸序列,或与选自SEQ ID NO:31-34中的任一个的氨基酸序列具有至少约90%同源性的氨基酸序列。在某些这样的实施方案中,轻链可变结构域包含选自SEQ ID NO:35-38中的任一个的氨基酸序列,或与选自SEQ ID NO:35-38中的任一个的氨基酸序列具有至少约90%同源性的氨基酸序列。

[0249] 重链可变结构域变体1 (VH1)的氨基酸序列是:

[0250] QVQLVQSGAELKKPGASVKVSCKSS**GYHFTSYWMH**WVKQAPGQGLEWIG**VIHPNSG**
SINYEKFESKATITVDKSTSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCAG**ERDSTEVLPM**DYWGQ

GTSVTVSS (SEQ ID NO: 31)。VH1的高变区 (HVR) 以粗体和下划线标出。

[0251] 重链可变结构域变体2 (VH2)的氨基酸序列是:

[0252] QVQLVQSGAELKKPGASVKVSCKSS**GYHFTSYWMH**WVKQAPGQGLEWIG**VIHPNSG**
SINYEKFESRATITVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAG**ERDSTEVLPM**DYWGQ

GTTVTVSS (SEQ ID NO: 32)。VH2的高可变区 (HVR) 以粗体和下划线标出。

[0253] 重链可变结构域变体3 (VH3)的氨基酸序列是:

[0254] QVQLVQSGAELKKPGASVKVSCKSS**GYHFTSYWMH**WVKQAPGQGLEWIG**VIHPNSG**
SINYEKFESRVITITVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAG**ERDSTEVLPM**DYWGQ

GTTVTVSS (SEQ ID NO: 33)。VH3的高可变区 (HVR) 以粗体和下划线标出。

[0255] 重链可变结构域变体4 (VH4)的氨基酸序列是:

[0256] QVQLVQSGAELKKPGASVKVSCKSS**GYHFTSYWMH**WVRQAPGQGLEWIG**VIHPNSG**
SINYEKFESRVITITVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAG**ERDSTEVLPM**DYWGQ

GTTVTVSS (SEQ ID NO: 34)。VH4的高可变区 (HVR) 以粗体和下划线标出。

[0257] κ 轻链可变结构域变体1 (V κ 1)的氨基酸序列是:

[0258] DVQITQSPSYLAASLGERATINC**RASKSINKYLA**WYQQKPGKTNKLLIY**SGSTLQSGIP**
ARFSGSGSGTDFTLTISLEPEDFAMYYC**QQHNEYPLT**FGQGTKLEIK (SEQ ID NO:

35)。V κ 1的高可变区 (HVR) 以粗体和下划线标出。

[0259] κ 轻链可变结构域变体2 (V κ 2)的氨基酸序列是:

[0260] DVQITQSPSSLSASLGERATINC**RASKSINKYLA**WYQQKPGKANKLLIY**SGSTLQSGIPA**
RFSGSGSGTDFTLTISSELPEDFAMYYC**QQHNEYPLT**FGQGGTKLEIK (SEQ ID NO: 36)。

V_K2的高可变区 (HVR) 以粗体和下划线标出。

[0261] κ 轻链可变结构域变体3 (V_K3) 的氨基酸序列是：

[0262] DVQITQSPSSLSASLGERATINC**RASKSINKYLA**WYQQKPGKAPKLLIY**SGSTLQSGIPA**
RFSGSGSGTDFTLTISSELPEDFAMYYC**QQHNEYPLT**FGQGGTKLEIK (SEQ ID NO: 37)。

V_K3的高可变区 (HVR) 以粗体和下划线标出。

[0263] κ 轻链可变结构域变体4 (V_K4) 的氨基酸序列是：

[0264] DIQLTQSPSSLSASLGERATINC**RASKSINKYLA**WYQQKPGKAPKLLIY**SGSTLQSGIPA**
RFSGSGSGTDFTLTISSELPEDFAMYYC**QQHNEYPLT**FGQGGTKLEIK (SEQ ID NO: 38)。

V_K4的高可变区 (HVR) 以粗体和下划线标出。

[0265] 抗体可包含与SEQ ID NO:35-38至少85%、90%或95%相同的轻链可变结构域氨基酸序列,同时保留HVR-L1 RASKSINKYLA (SEQ ID NO:5)、HVR-L2 SGSTLQS (SEQ ID NO:6) 和HVR-L3 QQHNEYPLT (SEQ ID NO:7)。抗体可包含与SEQ ID NO:31-34至少85%、90%或95%相同的重链可变结构域氨基酸序列,同时保留HVR-H1 GYHFTSYWMH (SEQ ID NO:9)、HVR-H2 VIHPNSGSINYNEKFES (SEQ ID NO:10) 和HVR-H3 ERDSTEVLPM DY (SEQ ID NO:11)。

[0266] 在一些实施方案中,本公开的人源化抗C1q抗体包括含有Fab区的重链可变区和含有Fc区的重链恒定区,其中Fab区特异性结合本公开的C1q蛋白,但Fc区不能结合C1q蛋白。在一些实施方案中,Fc区来自人IgG1、IgG2、IgG3或IgG4同种型。在一些实施方案中,Fc区不能诱导补体活性和/或不能诱导抗体依赖性细胞毒性 (ADCC)。在一些实施方案中,Fc区包含一个或多个修饰,包括但不限于氨基酸取代。在某些实施方案中,本公开的人源化抗C1q抗体的Fc区包含根据Kabat编号惯例的位置248或根据Kabat编号惯例的对应于位置248的位置和/或根据Kabat编号惯例的位置241或根据Kabat编号惯例的对应于位置241的位置处的氨基酸取代。在一些实施方案中,位置248或对应于位置248的位置处的氨基酸取代抑制Fc区与Fc受体相互作用。在一些实施方案中,位置248或对应于位置248的位置处的氨基酸取代是亮氨酸至谷氨酸的氨基酸取代。在一些实施方案中,位置241或对应于位置241的位置处的氨基酸取代防止抗体中的臂转换。在一些实施方案中,位置241或对应于位置241的位置处的氨基酸取代是丝氨酸至脯氨酸的氨基酸取代。在某些实施方案中,本公开的人源化抗C1q抗体的Fc区包含SEQ ID NO:47的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:47的氨基酸序列具有至少约70%、至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%或至少约95%同源性的氨基酸序列。

[0267] 在一些实施方案中,本公开的人源化抗C1q抗体可以与C1q蛋白结合,并且与C1q蛋白的一个或多个氨基酸在选自以下的氨基酸残基中结合:(a) SEQ ID NO:1的氨基酸残基196-226 (SEQ ID NO:16),或对应于SEQ ID NO:1的氨基酸残基196-226 (GLFQVVSGGMVLQLQQGDQVWVEKDPKKGHI) (SEQ ID NO:16)的C1q蛋白链A (C1qA) 的氨基酸残基;(b) SEQ ID NO:1的氨基酸残基196-221 (SEQ ID NO:17),或对应于SEQ ID NO:1的氨基酸残基196-221 (GLFQVVSGGMVLQLQQGDQVWVEKDP) (SEQ ID NO:17)的C1qA的氨基酸残基;(c) SEQ ID NO:1的氨基酸残基202-221 (SEQ ID NO:18),或对应于SEQ ID NO:1的氨基酸残基202-221 (SGGMVLQLQQGDQVWVEKDP) (SEQ ID NO:18)的C1qA的氨基酸残基;(d) SEQ ID NO:1

的氨基酸残基202-219 (SEQ ID NO:19), 或对应于SEQ ID NO:1的氨基酸残基202-219 (SGGMVLQLQQGDQVWVEK) (SEQ ID NO:19)的C1qA的氨基酸残基; 和(e)SEQ ID NO:1的氨基酸残基Lys 219和/或Ser 202, 或对应于SEQ ID NO:1的Lys 219和/或Ser 202的C1qA的氨基酸残基。

[0268] 在一些实施方案中, 人源化抗C1q抗体可以进一步与C1q蛋白的一个或多个氨基酸在选自以下的氨基酸残基中结合: (a)SEQ ID NO:3的氨基酸残基218-240 (SEQ ID NO:20), 或对应于SEQ ID NO:3的氨基酸残基218-240 (WLAVNDYYDMVGI QGSDSVFSGF) (SEQ ID NO:20)的C1q蛋白链C (C1qC)的氨基酸残基; (b)SEQ ID NO:3的氨基酸残基225-240 (SEQ ID NO:21), 或对应于SEQ ID NO:3的氨基酸残基225-240 (YDMVGI QGSDSVFSGF) (SEQ ID NO:21)的C1qC的氨基酸残基; (c)SEQ ID NO:3的氨基酸残基225-232 (SEQ ID NO:22), 或对应于SEQ ID NO:3的氨基酸残基225-232 (YDMVGIQG) (SEQ ID NO:22)的C1qC的氨基酸残基; (d)SEQ ID NO:3的氨基酸残基Tyr 225或对应于SEQ ID NO:3的氨基酸残基Tyr 225的C1qC的氨基酸残基; (e)SEQ ID NO:3的氨基酸残基174-196 (SEQ ID NO:23), 或对应于SEQ ID NO:3的氨基酸残基174-196 (HTANLCVLLYRSGVKVVTFCGHT) (SEQ ID NO:23)的C1qC的氨基酸残基; (f)SEQ ID NO:3的氨基酸残基184-192 (SEQ ID NO:24), 或对应于SEQ ID NO:3的氨基酸残基184-192 (RSGVKVVTFF) (SEQ ID NO:24)的C1qC的氨基酸残基; (g)SEQ ID NO:3的氨基酸残基185-187或对应于SEQ ID NO:3的氨基酸残基185-187 (SGV)的C1qC的氨基酸残基; (h)SEQ ID NO:3的氨基酸残基Ser 185或对应于SEQ ID NO:3的氨基酸残基Ser 185的C1qC的氨基酸残基。

[0269] 在某些实施方案中, 本公开的人源化抗C1q抗体可与如SEQ ID NO:1所示的人C1qA的氨基酸残基Lys 219和Ser 202, 或对应于如SEQ ID NO:1所示的Lys 219和Ser 202的人C1qA的氨基酸; 和如SEQ ID NO:3所示的人C1qC的氨基酸残基Tyr 225, 或对应于如SEQ ID NO:3所示的Tyr 225的人C1qC的氨基酸残基结合。在某些实施方案中, 抗C1q抗体与如SEQ ID NO:1所示的人C1qA的氨基酸残基Lys 219, 或对应于如SEQ ID NO:1所示的Lys 219的人C1qA的氨基酸残基; 和如SEQ ID NO:3所示的人C1qC的氨基酸残基Ser 185, 或对应于如SEQ ID NO:3所示的Ser 185的人C1qC的氨基酸残基结合。

[0270] 在一些实施方案中, 本公开的人源化抗C1q抗体可与C1q蛋白结合, 并且与C1q蛋白的一个或多个氨基酸在选自以下的氨基酸残基中结合: (a)SEQ ID NO:3的氨基酸残基218-240 (SEQ ID NO:20), 或对应于SEQ ID NO:3的氨基酸残基218-240 (WLAVNDYYDMVGI QGSDSVFSGF) (SEQ ID NO:20)的C1qC的氨基酸残基; (b)SEQ ID NO:3的氨基酸残基225-240 (SEQ ID NO:21), 或对应于SEQ ID NO:3的氨基酸残基225-240 (YDMVGI QGSDSVFSGF) (SEQ ID NO:21)的C1qC的氨基酸残基; (c)SEQ ID NO:3的氨基酸残基225-232 (SEQ ID NO:22), 或对应于SEQ ID NO:3的氨基酸残基225-232 (YDMVGIQG) (SEQ ID NO:22)的C1qC的氨基酸残基; (d)SEQ ID NO:3的氨基酸残基Tyr 225或对应于SEQ ID NO:3的氨基酸残基Tyr 225的C1qC的氨基酸残基; (e)SEQ ID NO:3的氨基酸残基174-196 (SEQ ID NO:23), 或对应于SEQ ID NO:3的氨基酸残基174-196 (HTANLCVLLYRSGVKVVTFCGHT) (SEQ ID NO:23)的C1qC的氨基酸残基; (f)SEQ ID NO:3的氨基酸残基184-192 (SEQ ID NO:24), 或对应于SEQ ID NO:3的氨基酸残基184-192 (RSGVKVVTFF) (SEQ ID NO:24)的C1qC的氨基酸残基; (g)SEQ ID NO:3的氨基酸残基185-187或对应于SEQ ID NO:3的氨基酸残基185-187 (SGV)的C1qC的氨基酸

残基; (h) SEQ ID NO:3的氨基酸残基Ser 185或对应于SEQ ID NO:3的氨基酸残基Ser 185的C1qC的氨基酸残基。

[0271] 抗C1q Fab片段

[0272] 在重组DNA技术出现之前,裂解多肽序列的蛋白水解酶(蛋白酶)已被用于解剖抗体分子的结构并确定分子的哪些部分负责其各种功能。木瓜蛋白酶的有限消化将抗体分子裂解成三个片段。被称为Fab片段的两个片段是相同的,并且含有抗原结合活性。Fab片段对应于抗体分子的两条相同的臂,每条臂由与重链的 V_H 和 C_H1 结构域配对的完整轻链组成。其它片段不含抗原结合活性,但最初观察到容易结晶,并且因此命名为Fc片段(可结晶的片段)。当将Fab分子与IgG分子进行比较时,发现Fab对于某些体内应用中优于IgG,因为其具有更高的移动性和组织穿透能力,其的循环半衰期缩短,其能够单价结合抗原而不介导抗体效应子功能,并且其的免疫原性较低。

[0273] Fab分子是Ig分子的大约50-kDa的人工片段,其重链被恒定结构域 C_H2 和 C_H3 缩短。两个异嗜性(V_L-V_H 和 C_L-C_H1)结构域相互作用是Fab分子双链结构的基础,其通过 C_L 与 C_H1 之间的二硫键进一步稳定。Fab和IgG具有由六个互补决定区(CDR)形成的相同抗原结合位点, V_L 和 V_H 各三个(LCDR1、LCDR2、LCDR3和HCDR1、HCDR2、HCDR3)。CDR定义了抗体的高变抗原结合位点。在LCDR3和HCDR3中发现了最高的序列变异,其在天然免疫系统中分别由 V_L 和 J_L 基因或 V_H 、 D_H 和 J_H 基因的重排产生。LCDR3和HCDR3通常形成抗原结合位点的核心。连接并显示六个CDR的保守区域被称为框架区。在可变结构域的三维结构中,框架区形成了两个反向平行的 β -折叠的夹层,其通过外部的高变CDR环和内部的保守二硫键连接。Fab和IgG的抗原结合位点的稳定性和多功能性的独特组合是其在疾病诊断、监测、预防和治疗的临床实践中成功的基础。

[0274] 所有抗C1q抗体Fab片段序列都通过引用并入美国专利申请第15/360,549号,其公开的抗体和相关组合物在此通过引用并入。

[0275] 在某些实施方案中,本公开提供了结合包含重链(V_H/C_H1)和轻链(V_L/C_L)的C1q蛋白的抗C1q抗体Fab片段,其中抗C1q抗体Fab片段具有六个互补决定区(CDR), V_L 和 V_H 各三个(HCDR1、HCDR2、HCDR3和LCDR1、LCDR2、LCDR3)。抗体Fab片段的重链在IgG1的第一重链结构域(SEQ ID NO:39)后被截短,并且包含以下氨基酸序列:

**QVQLVQSGAELKKPGASVKVSCKSSGYHFTSYWMHWVKQAPGQGLEWIGVIHPNSG
SINYNKESFESRVTITVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAGERDSTEVLPMDYWGQ**

[0276] **GTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH
TFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHT
(SEQ ID NO: 39)**

[0277] SEQ ID NO:1的互补决定区(CDR)以粗体和下划线标出。

[0278] 抗体Fab片段的轻链结构域包含以下氨基酸序列(SEQ ID NO:40):

**DVQITQSPSSLSASLGERATINC RASKSINKYLAWYQQKPGKAPKLLIYSGSTLQSGIPA
RFSGSGSGTDFTLTISSELPEDFAMYYC QQHNEYPLTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPS
[0279] DEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTLSSTL
TLISKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 40)**

[0280] SEQ ID NO:2的互补决定区(CDR)以粗体和下划线标出。

[0281] 抗补体C1s抗体

[0282] 合适的抑制剂包括结合补体C1s蛋白的抗体(即,抗补体C1s抗体,本文也称为抗C1s抗体和C1s抗体)和编码这种抗体的核酸分子。补体C1s是一个有吸引力的靶标,因为其位于补体级联的上游并具有窄范围的底物特异性。此外,有可能获得特异性结合活化形式的C1s的抗体(例如但不限于单克隆抗体)。

[0283] 以下两个段落中提到的所有序列都通过引用并入美国专利申请第14/890,811号,其公开的抗体和相关组合物在此通过引用并入。

[0284] 在某些方面,本文公开了施用抗C1s抗体的方法。抗体可以是鼠抗体、人源化抗体或嵌合抗体。在一些实施方案中,轻链可变结构域包含鼠抗人C1s单克隆抗体5A1的HVR-L1、HVR-L2和HVR-L3,并且重链包含鼠抗人C1s单克隆抗体5A1的HVR-H1、HVR-H2和HVR-H3,所述抗体由2013年5月15日保藏于ATCC的杂交瘤细胞系或其后代(ATCC登录号PTA-120351)产生。在其它实施方案中,轻链可变结构域包含鼠抗人C1s单克隆抗体5C12的HVR-L1、HVR-L2和HVR-L3,并且重链可变结构域包含鼠抗人C1s单克隆抗体5C12的HVR-H1、HVR-H2和HVR-H3,所述抗体由2013年5月15日保藏于ATCC的杂交瘤细胞系或其后代(ATCC登录号PTA-120352)产生。

[0285] 在一些实施方案中,抗体特异性结合并抑制C1s或C1s酶原的生物活性,例如C1s与C1q的结合、C1s与C1r的结合或C1s与C2或C4的结合。生物活性可以是C1s的蛋白水解酶活性、C1s酶原向活性蛋白酶的转化或C2或C4的蛋白水解裂解。在某些实施方案中,生物活性是经典补体活化途径的活化、抗体和补体依赖性细胞毒性的活化或C1F溶血。

[0286] 以下六十二个段落中的所有序列通过引用并入Van Vlasselaer的美国专利美国专利第8,877,197号,其公开的抗体和相关组合物在此通过引用并入。

[0287] 本文公开了施用人源化单克隆抗体的方法,所述抗体特异性结合涵盖补体组分C1s的结构域IV和V的区域内的表位。在一些情况下,抗体抑制C1s与补体组分4(C4)的结合和/或不抑制C1s的蛋白酶活性。在一些实施方案中,所述方法包括施用以高亲和力结合C1复合物中的补体组分C1s的人源化单克隆抗体。

[0288] 本文公开了施用具有包含氨基酸序列SEQ ID NO:57的抗体轻链可变区的一个或多个互补决定区(CDR)和/或包含氨基酸序列SEQ ID NO:58的抗体重链可变区的一个或多个CDR的抗C1s抗体的方法。抗C1s抗体可以结合人或大鼠补体C1s蛋白。在一些实施方案中,抗C1s抗体抑制至少一种由补体C1s蛋白裂解的底物的裂解。

[0289] 在某些实施方案中,抗体包含:a)具有选自SEQ ID NO:51、SEQ ID NO:52、SEQ ID NO:53、SEQ ID NO:54、SEQ ID NO:55和SEQ ID NO:56的氨基酸序列的互补决定区(CDR);和/或b)具有选自SEQ ID NO:62、SEQ ID NO:63、SEQ ID NO:53、SEQ ID NO:64、SEQ ID NO:65和SEQ ID NO:66的氨基酸序列的CDR。

[0290] 所述抗体可以包含具有氨基酸序列SEQ ID NO:51的CDR-L1、具有氨基酸序列SEQ ID NO:52的CDR-L2、具有氨基酸序列SEQ ID NO:53的CDR-L3、具有氨基酸序列SEQ ID NO:54的CDR-H1、具有氨基酸序列SEQ ID NO:55的CDR-H2和具有氨基酸序列SEQ ID NO:56的CDR-H3。

[0291] 在其它实施方案中,抗体可包含具有SEQ ID NO:67的氨基酸序列的可变区的轻链CDR和/或具有SEQ ID NO:68的氨基酸序列的可变区的重链CDR。

[0292] 抗体可以是特异性结合补体组分C1s的人源化抗体,其中抗体与包含一个或多个

包含氨基酸序列SEQ ID NO:57或SEQ ID NO:67的抗体轻链可变区的CDR和/或一个或多个包含氨基酸序列SEQ ID NO:58或SEQ ID NO:68的抗体重链可变区的CDR的抗体竞争结合表位。

[0293] 在其它情况下,抗体可以是特异性结合补体C1s的人源化抗体,其中抗体选自:a) 特异性结合补体C1s蛋白内表位的人源化抗体,其中抗体与包含具有选自SEQ ID NO:51、SEQ ID NO:52、SEQ ID NO:53、SEQ ID NO:54、SEQ ID NO:55和SEQ ID NO:56的氨基酸序列的CDR的抗体竞争结合表位;以及b) 特异性结合补体C1s蛋白内表位的人源化抗体,其中抗体与包含具有选自SEQ ID NO:62、SEQ ID NO:63、SEQ ID NO:53、SEQ ID NO:64、SEQ ID NO:65和SEQ ID NO:66的氨基酸序列的CDR的抗体竞争结合表位。在一些情况下,抗体与包含重链和轻链CDR的抗体竞争结合表位,所述重链和轻链CDR包含:a) SEQ ID NO:51、SEQ ID NO:52、SEQ ID NO:53、SEQ ID NO:69、SEQ ID NO:55和SEQ ID NO:56;或b) SEQ ID NO:62、SEQ ID NO:63、SEQ ID NO:53、SEQ ID NO:64、SEQ ID NO:65和SEQ ID NO:66。

[0294] 抗体可以包含存在于单独多肽中的轻链区和重链区。抗体可以包含Fc区。

[0295] 本文公开了抗C1s抗体,其包含与氨基酸序列SEQ ID NO:57 90%相同的氨基酸序列的轻链可变区,和包含与氨基酸序列SEQ ID NO:58 90%相同的氨基酸序列的重链可变区。

[0296] 抗C1s抗体可以选自抗原结合片段、Ig单体、Fab片段、F(ab')₂片段、Fd片段、scFv、scAb、dAb、Fv、单结构域重链抗体、单结构域轻链抗体、单特异性抗体、双特异性抗体或多特异性抗体。

[0297] 本文公开了施用竞争结合由抗体IPN003(本文也称为“IPN-M34”或“M34”或“TNT003”)结合的表位的抗体的方法,例如包含抗体IPN003的可变结构域的抗体,例如抗体IPN003。

[0298] 在一些实施方案中,所述方法包括施用特异性结合补体C1s蛋白内的表位的抗体。在一些实施方案中,分离的抗C1s抗体结合活化的C1s蛋白。在一些实施方案中,分离的抗C1s抗体结合无活性形式的C1s。在其它情况下,分离的抗C1s抗体结合活化的C1s蛋白和非活化形式的C1s。

[0299] 在一些实施方案中,所述方法包括施用抑制C4的裂解的单克隆抗体,其中分离的单克隆抗体不抑制C2的裂解。在一些实施方案中,所述方法包括施用抑制C2的裂解的单克隆抗体,其中分离的单克隆抗体不抑制C4的裂解。在一些情况下,分离的单克隆抗体是人源化的。在一些情况下,抗体抑制经典补体途径的组分。在一些情况下,由抗体抑制的经典补体途径的组分是C1s。本公开还提供了通过向有需要的个体施用抑制C4的裂解的分离的单克隆抗体或包含分离的单克隆抗体的药物组合物来治疗补体介导的疾病或病症的方法,其中分离的单克隆抗体不抑制C2的裂解。

[0300] 在一些实施方案中,所述方法包括施用抑制C1s裂解C2或C4的单克隆抗体,即抑制C1s介导的C2或C4的蛋白水解裂解。在一些情况下,单克隆抗体是人源化的。在一些情况下,抗体通过抑制C2或C4与C1s的结合来抑制C1s对C2或C4的裂解;例如,在一些情况下,抗体通过抑制C2或C4与C1s的C2或C4结合位点的结合来抑制C1s介导的C2或C4的裂解。因此,在一些情况下,抗体用作竞争性抑制剂。本公开还提供了通过向有此需要的个体施用抑制C1s裂解C2或C4的分离的单克隆抗体(即抑制C1s介导的C2或C4的溶蛋白性裂解)治疗癫痫(诸如

特发性全身性癫痫、特发性部分性癫痫、症状性全身性癫痫或症状性部分性癫痫)的方法。

[0301] 在一些实施方案中,方法包括施用抑制C1s裂解C4的单克隆抗体,其中该抗体不抑制C1s裂解补体组分C2;即抗体抑制C1s介导的C4裂解,但不抑制C1s介导的C2裂解。在一些情况下,单克隆抗体是人源化的。在一些情况下,单克隆抗体抑制C4与C1s的结合,但不抑制C2与C1s的结合。在一些实施方案中,所述方法包括通过向有需要的个体施用抑制C1s裂解C4的分离的单克隆抗体来治疗补体介导的疾病或病症,其中所述抗体不抑制C1s裂解补体组分C2;即抗体抑制C1s介导的C4裂解,但不抑制C1s介导的C2裂解。在所述方法的一些实施方案中,抗体是人源化的。

[0302] 在一些实施方案中,所述方法包括施用特异性结合涵盖C1s的结构域IV和V的区域内的表位的人源化单克隆抗体。例如,人源化单克隆抗体特异性结合图1中所描绘的氨基酸序列的氨基酸272-422内的表位并在SEQ ID NO:70中示出。在一些情况下,人源化单克隆抗体特异性结合图1中所描绘且SEQ ID NO:70中所示出的氨基酸序列的氨基酸272-422内的表位并抑制C4与C1s的结合。在一些实施方案中,所述方法包括通过向有需要的个体施用特异性结合图1中所描绘且SEQ ID NO:70中所示出的氨基酸序列的氨基酸272-422内的表位并抑制C4与C1s的结合的人源化单克隆抗体来治疗补体介导的疾病或病症。

[0303] 在一些实施方案中,所述方法包括施用特异性结合涵盖C1s的结构域IV和V的区域内的构象表位的人源化单克隆抗体。例如,特异性结合图1中所描绘的氨基酸序列的氨基酸272-422内的构象表位并在SEQ ID NO:70中示出的人源化单克隆抗体。在一些情况下,人源化单克隆抗体特异性结合图1中所描绘且SEQ ID NO:70中所示出的氨基酸序列的氨基酸272-422内的构象表位并抑制C4与C1s的结合。在一些实施方案中,方法包括癫痫(诸如特发性全身性癫痫、特发性部分性癫痫、症状性全身性癫痫或症状性部分性癫痫),方法包括向有此需要的个体施用人源化单克隆抗体,所述抗体特异性结合图1中所描绘且SEQ ID NO:70中所示出的氨基酸序列的氨基酸272-422内的构象表位,并抑制C4与C1s的结合。

[0304] 在一些实施方案中,所述方法包括施用结合C1复合物中的补体组分C1s的单克隆抗体。C1复合物由6个C1q分子、2个C1r分子和2个C1s分子构成。在一些情况下,单克隆抗体是人源化的。因此,在一些情况下,结合C1复合物中的补体组分C1s的人源化单克隆抗体。在一些情况下,抗体以高亲和力结合存在于C1复合物中的C1s。

[0305] 在一些实施方案中,抗C1s抗体(例如,特异性结合补体C1s蛋白中的表位的主题抗体)包含:a)包含IPN003抗体的一个、两个或三个VL CDR的轻链区;和b)包含IPN003抗体的一个、两个或三个VH CDR的重链区;其中VH和VL CDR由Kabat定义(参见,例如,表1;和Kabat 1991)。

[0306] 在其它实施方案中,抗C1s抗体(例如,特异性结合补体C1s蛋白中的表位的主题抗体)包含:a)包含IPN003抗体的一个、两个或三个VL CDR的轻链区;和b)包含IPN003抗体的一个、两个或三个VH CDR的重链区;其中VH和VL CDR由Chothia定义(参见,例如,表1和Chothia 1987)。

[0307] 表2提供了IPN003抗体的CDR氨基酸序列以及VL和VH氨基酸序列。表2还提供了分配给每个氨基酸序列的SEQ ID NO。

[0308] 在一些实施方案中,抗C1s抗体(例如,特异性结合补体C1s蛋白中的表位的主题抗体)包含:a)包含选自SEQ ID NO:51、SEQ ID NO:52和SEQ ID NO:53的一个、两个或三个CDR

的轻链区;和b)包含选自SEQ ID NO:54、SEQ ID NO:55和SEQ ID NO:56的一个、两个或三个CDR的重链区。在一些实施方案中,抗C1s抗体包括人源化VH和/或VL框架区。

[0309] SEQ ID NO.51:SSVSSSYLHWYQ;

[0310] SEQ ID NO.52:STSNLASGVP;

[0311] SEQ ID NO.53:HQYYRLPPIT;

[0312] SEQ ID NO.54:GFTFSNYAMSWV;

[0313] SEQ ID NO.55:ISSGGSHTYY;

[0314] SEQ ID NO.56:ARLFTGYAMDY。

[0315] 在一些实施方案中,抗C1s抗体包含具有选自SEQ ID NO:51、SEQ ID NO:52、SEQ ID NO:53、SEQ ID NO:54、SEQ ID NO:55和SEQ ID NO:56的氨基酸序列的CDR。

[0316] 在一些实施方案中,抗C1s抗体包含轻链可变区,其包含氨基酸序列SEQ ID NO:51、SEQ ID NO:52和SEQ ID NO:53。

[0317] 在一些实施方案中,抗C1s抗体包含重链可变区,其包含氨基酸序列SEQ ID NO:54、SEQ ID NO:55和SEQ ID NO:56。

[0318] 在一些实施方案中,抗C1s抗体包含具有氨基酸序列SEQ ID NO:51的CDR-L1、具有氨基酸序列SEQ ID NO:52的CDR-L2、具有氨基酸序列SEQ ID NO:53的CDR-L3、具有氨基酸序列SEQ ID NO:54的CDR-H1、具有氨基酸序列SEQ ID NO:55的CDR-H2和具有氨基酸序列SEQ ID NO:56的CDR-H3。

[0319] 在一些实施方案中,抗C1s抗体包含轻链可变区,其包含与SEQ ID NO:57中所示的氨基酸序列85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列。

[0320] SEQ ID NO.57:

[0321] DIVMTQTAIMSASLGERVTMTCTASSSVSSSYLHWYQQKPGSSPKLWIYSTSNLASGVPARFSGSGSGTFYSLTISSMEAEDDATYYCHQYYRLPPITFGAGTKLELK。

[0322] 在一些实施方案中,抗C1s抗体包含重链可变区,其包含与SEQ ID NO.58.中所示的氨基酸序列85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列。

[0323] SEQ ID NO.58:

[0324] QVKLEESGGALVKPGSLKLSAASGFTFSNYAMSWVRQIPEKRLEWVATISSGGSHTYYLDSVKGRFTISRDNARDTLYLQMSSLRSEDTALYYCARLFTGYAMDYWGQGTSVT。

[0325] 在一些实施方案中,抗C1s抗体包含轻链可变区,其包含与氨基酸序列SEQ ID NO:5790%相同的氨基酸序列。

[0326] 在一些实施方案中,抗C1s抗体包含重链可变区,其包含与氨基酸序列SEQ ID NO:5890%相同的氨基酸序列。

[0327] 在一些实施方案中,抗C1s抗体包含轻链可变区,其包含氨基酸序列SEQ ID NO:57。

[0328] 在一些实施方案中,抗C1s抗体包含重链可变区,其包含氨基酸序列SEQ ID NO:58。

[0329] 在一些实施方案中,抗C1s抗体包含轻链可变区和重链可变区,所述轻链可变区包

含与氨基酸序列SEQ ID NO:57 90%相同的氨基酸序列,所述重链可变区包含与氨基酸序列SEQ ID NO:58 90%相同的氨基酸序列。

[0330] 在一些实施方案中,抗C1s抗体包含含有氨基酸序列SEQ ID NO:57的轻链可变区和含有氨基酸序列SEQ ID NO:58的重链可变区。

[0331] 在一些实施方案中,抗C1s抗体特异性结合补体C1s蛋白内的表位,其中所述抗体与包含含有氨基酸序列SEQ ID NO:57的抗体轻链可变区的轻链CDR和含有氨基酸序列SEQ ID NO:58的抗体重链可变区的重链CDR的抗体竞争结合所述表位。

[0332] 在一些实施方案中,抗C1s抗体包含含有氨基酸序列SEQ ID NO:57的抗体轻链可变区的轻链CDR和含有氨基酸序列SEQ ID NO:58的抗体重链可变区的重链CDR。

[0333] 在一些实施方案中,抗C1s抗体(例如,特异性结合补体C1s蛋白中的表位的主题抗体)包含:a)包含选自SEQ ID NO:62、SEQ ID NO:63和SEQ ID NO:53的一个、两个或三个CDR的轻链区;和b)包含选自SEQ ID NO:64、SEQ ID NO:65和SEQ ID NO:66的一个、两个或三个CDR的重链区。

[0334] SEQ ID NO.62:TASSSVSSSYLH;

[0335] SEQ ID NO.63:STSNLAS;

[0336] SEQ ID NO.53:HQYYRLPPIT;

[0337] SEQ ID NO.64:NYAMS;

[0338] SEQ ID NO.65:TISSGGSHTYYLDSVKG;

[0339] SEQ ID NO.66:LFTGYAMDY

[0340] 在一些实施方案中,抗C1s抗体包含具有选自SEQ ID NO:62、SEQ ID NO:63、SEQ ID NO:53、SEQ ID NO:64、SEQ ID NO:65和SEQ ID NO:66的氨基酸序列的CDR。

[0341] 在一些实施方案中,抗C1s抗体包含轻链可变区,其包含氨基酸序列SEQ ID NO:62、SEQ ID NO:63和SEQ ID NO:53。

[0342] 在一些实施方案中,抗C1s抗体包含重链可变区,其包含氨基酸序列SEQ ID NO:64、SEQ ID NO:65和SEQ ID NO:66。

[0343] 在一些实施方案中,抗C1s抗体包含具有氨基酸序列SEQ ID NO:62的CDR-L1、具有氨基酸序列SEQ ID NO:63的CDR-L2、具有氨基酸序列SEQ ID NO:53的CDR-L3、具有氨基酸序列SEQ ID NO:64的CDR-H1、具有氨基酸序列SEQ ID NO:65的CDR-H2和具有氨基酸序列SEQ ID NO:66的CDR-H3。

[0344] 在一些实施方案中,抗C1s抗体包含轻链可变区,其包含与SEQ ID NO:67中所示的氨基酸序列85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列。

[0345] SEQ ID NO.67:

[0346] QIVLTQSPAIMASLGERVTMTCTASSSVSSSYLHWYQQKPGSSPKLWIYSTSNLASGVPARFSGSGSGTFYSLTISSMEAEDDATYYCHQYYRLPPITFGAGTKLELK。

[0347] 在一些实施方案中,抗C1s抗体包含重链可变区,其包含与SEQ ID NO:68中所示的氨基酸序列85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列。

[0348] SEQ ID NO.68:

[0349] EVMLVESGGALVKPGGSLKLSAASGFTFSNYAMSWVRQIPEKRLEWVATISSGGSHITYYLD SVKGRF TISRDNARDTLYLQMSSLRSED TALYYCARLFTGYAMDYWGQGTSVTVSS。

[0350] 在一些实施方案中,抗C1s抗体包含轻链可变区,其包含与氨基酸序列SEQ ID NO: 6790%相同的氨基酸序列。

[0351] 在一些实施方案中,抗C1s抗体包含重链可变区,其包含与氨基酸序列SEQ ID NO: 6890%相同的氨基酸序列。

[0352] 在一些实施方案中,抗C1s抗体包含轻链可变区,其包含氨基酸序列SEQ ID NO: 67。

[0353] 在一些实施方案中,抗C1s抗体包含重链可变区,其包含氨基酸序列SEQ ID NO: 68。

[0354] 在一些实施方案中,抗C1s抗体包含轻链可变区和重链可变区,所述轻链可变区包含与氨基酸序列SEQ ID NO:67 90%相同的氨基酸序列,所述重链可变区包含与氨基酸序列SEQ ID NO:68 90%相同的氨基酸序列。

[0355] 在一些实施方案中,抗C1s抗体包含轻链可变区和重链可变区,所述轻链可变区包含与氨基酸序列SEQ ID NO:67 95%相同的氨基酸序列,所述重链可变区包含与氨基酸序列SEQ ID NO:68 95%相同的氨基酸序列。

[0356] 在一些实施方案中,抗C1s抗体包含含有氨基酸序列SEQ ID NO:67的轻链可变区和含有氨基酸序列SEQ ID NO:68的重链可变区。

[0357] 在一些实施方案中,抗C1s抗体特异性结合补体C1s蛋白内的表位,其中抗体与包含含有氨基酸序列SEQ ID NO:67的抗体轻链可变区的轻链CDR和含有氨基酸序列SEQ ID NO:68的抗体重链可变区的重链CDR的抗体竞争结合所述表位。

[0358] 在一些实施方案中,抗C1s抗体包含含有氨基酸序列SEQ ID NO:67的抗体轻链可变区的轻链CDR和含有氨基酸序列SEQ ID NO:68的抗体重链可变区的重链CDR。

[0359] 在一些实施方案中,抗C1s抗体包含轻链可变区,其包含与SEQ ID NO:67中所示的氨基酸序列85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列。

[0360] 在一些实施方案中,抗C1s抗体包含重链可变区,其包含与SEQ ID NO:68中所示的氨基酸序列85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列。

[0361] 抗C1s抗体可包含重链可变区,其包含与SEQ ID NO:79中所示并描绘于图2中的氨基酸序列(VH变体1)85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列。

[0362] 抗C1s抗体可包含重链可变区,其包含与SEQ ID NO:80中所示并描绘于图3中的氨基酸序列(VH变体2)85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列。

[0363] 抗C1s抗体可包含重链可变区,其包含与SEQ ID NO:81中所示并描绘于图4中的氨基酸序列(VH变体3)85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列。

[0364] 抗C1s抗体可包含重链可变区,其包含与SEQ ID NO:82中所示并描绘于图5中的氨

氨基酸序列 (VH变体4) 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列。

[0365] 抗C1s抗体可包含轻链可变区,其包含与SEQ ID NO:83中所示并描绘于图6中的氨基酸序列 (VK变体1) 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列。

[0366] 抗C1s抗体可包含轻链可变区,其包含与SEQ ID NO:84中所示并描绘于图7中的氨基酸序列 (VK变体2) 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列。

[0367] 抗C1s抗体可包含轻链可变区,其包含与SEQ ID NO:85中所示并描绘于图8中的氨基酸序列 (VK变体3) 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列。

[0368] 相对于IPN003亲本抗体FR氨基酸序列,抗C1s抗体可包含重链可变区,所述重链可变区包含1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个、11个或12个框架 (FR) 氨基酸取代,如表3中所示 (图9)。

[0369] 补体抑制

[0370] 已知许多抑制补体活性的分子。除了已知的化合物,合适的抑制剂可以通过本文所述的方法筛选。如上所述,正常细胞可以产生阻断补体活性的蛋白质,例如CD59、C1抑制剂等。在本公开的一些实施方案中,通过上调编码此类多肽的基因的表达来抑制补体。

[0371] 阻断补体活化的分子修饰也是本领域已知的。例如,此类分子包括但不限于修饰的补体受体,诸如可溶性CR1。最常见的CR1同种异型的成熟蛋白质含有1998个氨基酸残基:1930个残基的胞外结构域,25个残基的跨膜区,和43个残基的胞浆结构域。整个细胞外结构域由30个重复单位组成,称为短共有重复序列 (SCR) 或补体控制蛋白重复序列 (CCPR),每个重复单位由60至70个氨基酸残基组成。最近的数据指示C1q与人CR1特异性结合。因此,CR1识别了所有三种补体调理素,即C3b、C4b和C1q。已经生产了缺乏跨膜和胞质结构域的重组人CR1 (sCR1) 的可溶形式,并显示保留了天然CR1的所有已知功能。sCR1在缺血/再灌注损伤动物模型中的心脏保护作用已经得到证实。已经描述了几种类型的人C1q受体 (C1qR)。这些包括广泛分布的60至67-kDa受体,称为cC1qR,因为它结合C1q的胶原样结构域。这种C1qR变体显示为钙网蛋白;调节单核细胞吞噬作用的126-kDa受体。gC1qR不是膜结合分子,而是分泌型可溶性蛋白,对C1q的球状区域具有亲和力,并可能作为补体活化的液相调节剂。

[0372] 衰变加速因子 (DAF) (CD55) 由四个SCR加富含丝氨酸/苏氨酸的结构域组成,该结构域能够进行广泛的O-连接糖基化。DAF通过糖基磷脂酰肌醇 (GPI) 锚附着于细胞膜,并通过其结合C4b和C3b的能力,通过解离C3和C5转化酶发挥作用。可溶性的DAF (sDAF) 已显示抑制补体活化。

[0373] C1抑制剂是丝氨酸蛋白酶抑制剂“丝氨酸蛋白酶抑制剂”家族的成员,是高度糖基化的血浆蛋白,可阻止液相C1活化。C1抑制剂通过阻断C1r和C1s的活性位点并将它们从C1q上解离来调节补体活化的经典途径。

[0374] 补体活化的肽抑制剂包括C5a,并且其它抑制分子包括岩藻聚糖。

[0375] 核酸、载体和宿主细胞

[0376] 适用于本公开方法的抗体可以使用重组方法和组合物产生,例如,如美国专利第

4,816,567号中所述。在一些实施方案中,提供了具有编码本公开的任何抗体的核苷酸序列的分离的核酸。此类核酸可以编码含有 V_L/C_L 的氨基酸序列和/或含有抗C1q、抗C1r或抗C1s抗体的 V_H/C_H1 的氨基酸序列。在一些实施方案中,提供了含有此类核酸的一种或多种载体(例如,表达载体)。也可以提供含有此类核酸的宿主细胞。宿主细胞可以含有以下(例如,已用以下转导):(1)含有编码含有抗体的 V_L/C_L 的氨基酸序列和含有抗体的 V_H/C_H1 的氨基酸序列的核酸的载体,或(2)含有编码含有抗体的 V_L/C_L 的氨基酸序列的核酸的第一载体,和含有编码含有抗体的 V_H/C_H1 的氨基酸序列的核酸的第二载体。在一些实施方案中,宿主细胞是真核的,例如中国仓鼠卵巢(CHO)细胞或淋巴样细胞(例如,Y0、NS0、Sp20细胞)。在一些实施方案中,宿主细胞是细菌,例如大肠杆菌。

[0377] 本文公开了制备抗C1q、抗C1r或抗C1s抗体的方法。所述方法包括在适于抗体表达的条件下,培养含有编码抗C1q、抗C1r或抗C1s抗体的核酸的本公开的宿主细胞。在一些实施方案中,随后从宿主细胞(或宿主细胞培养基)中回收抗体。

[0378] 为了重组产生本公开的人源化抗C1q、抗C1r或抗C1s抗体,分离编码抗体的核酸,并且将其插入一种或多种载体中以用于在宿主细胞中进一步克隆和/或表达。可使用常规程序将此类核酸容易地分离并进行测序(例如,通过使用寡核苷酸探针,所述寡核苷酸探针能够特异性结合编码抗体的重链和轻链的基因)。

[0379] 含有编码本公开的任何抗体或其片段多肽(包括抗体)的核酸序列的合适载体包括但不限于克隆载体和表达载体。合适的克隆载体可以根据标准技术构建,或可以从本领域可获得的大量克隆载体中选择。虽然选择的克隆载体可以根据打算使用的宿主细胞而变化,但是有用的克隆载体通常具有自我复制的能力,可以具有特定限制性核酸内切酶的单一靶标,和/或可以携带可用于选择含有所述载体的克隆的标志物的基因。合适的例子包括质粒和细菌病毒,例如pUC18、pUC19、Bluescript(例如pBS SK+)及其衍生物、mpl8、mpl9、pBR322、pMB9、ColE1、pCR1、RP4、噬菌体DNA和穿梭载体,例如pSA3和pAT28。这些和许多其它克隆载体可从商业供应商,例如BioRad、Stratagene和Invitrogen获得。

[0380] 含有所关注核酸的载体可以通过许多适当的方法中的任何一种引入宿主细胞中,包括电穿孔;使用氯化钙、氯化铷、磷酸钙、DEAE葡聚糖或其它物质的转染;微粒轰击;脂质感染;和感染(例如,当载体是传染剂,诸如痘苗病毒时)。引入载体或多核苷酸的选择将通常取决于宿主细胞的特征。在一些实施方案中,载体包含核酸,所述核酸含有编码本公开的抗C1q、抗C1r或抗C1s抗体的一个或多个氨基酸序列。

[0381] 适合于克隆或表达编码抗体的载体的宿主细胞包括原核或真核细胞。例如,本公开的抗C1q、抗C1r或抗C1s抗体可以在细菌中产生,特别是在不需要糖基化和Fc效应子功能时。用于在细菌中表达抗体片段和多肽(例如,美国专利号5,648,237、5,789,199和5,840,523;和Charlton,Methods in Molecular Biology,第248卷(B.K.C.Lo编,Humana Press,Totowa,NJ,2003),第245-254页,描述了抗体片段在大肠杆菌中的表达。)。在其他实施方案中,本公开的抗体可以在真核细胞中产生,例如中国仓鼠卵巢(CHO)细胞或淋巴细胞(例如Y0、NS0、Sp20细胞)(例如,美国专利申请第14/269,950号;美国专利第8,981,071号;Eur J Biochem.1991年1月1日;195(1):235-42)。表达后,可以将抗体在可溶性级分中从细菌细胞团糊中分离,并可以进一步纯化。

[0382] 所关注的病状

[0383] 癫痫是一组神经学病症,其中脑中的神经细胞活动被破坏,导致发作或异常行为的周期、感觉以及有时意识丧失。癫痫发作可以是短暂且几乎无法察觉的发作,也可以是长时间的剧烈颤抖。在癫痫中,发作往往会复发,并且没有直接的潜在原因。大多数癫痫病例的原因不明,尽管有些人因脑损伤(如TBI)、中风、脑瘤和物质使用病症而发生癫痫。基因突变与一小部分疾病有关。癫痫发作是脑中皮质神经细胞活动过度 and 异常的结果。诊断通常涉及排除可能导致类似症状(诸如昏厥)的其他病状。此外,进行诊断涉及确定是否存在任何其他原因的发作,诸如酒精戒断或电解质问题。这可以通过对脑成像和进行血液检查来完成。癫痫通常可以通过脑电图(EEG)来确诊,但正常检查并不能排除这种病状。其他脑成像技术也可以检测一种形式的癫痫,诸如功能性磁共振成像(fMRI)、磁共振波谱(MRS)、正电子发射断层扫描(PET)和单光子发射计算机断层扫描(SPECT)。

[0384] 癫痫可能是由许多其他病状引起的,包括肿瘤、中风、头部外伤、中枢神经系统的先前的感染、遗传异常以及出生前后脑损伤引起的。癫痫有几种类型,每种类型都有不同的原因、症状和治疗方法。癫痫的两大类型是特发性(遗传原因)和症状性或隐源性(假定症状性,原因未知)。在特发性全身性癫痫中,通常(但不总是)有癫痫家族史。特发性全身性癫痫倾向于在儿童期或青春期出现,尽管它可能直到成人期才被诊断出来。在这种类型的癫痫中,除了发作,在EEG或成像研究(MRI)中没有鉴定到神经系统(脑或脊髓)异常。在脑磁共振成像(MRI)扫描中,脑在结构上是正常的,尽管特定研究可能显示大脑中的疤痕或微妙变化,这可能自出生以来就存在。患有特发性全身性癫痫的人智力正常,并且神经学检查和MRI的结果通常是正常的。脑电图(EEG——一种测量脑中电脉冲的测试)的结果可以显示影响脑中单个区域或多个区域的癫痫放电(所谓的全身放电)。影响特发性全身性癫痫患者的发作类型可能包括:肌阵挛发作(突然且持续时间极短的肢体抽搐)、失神发作(凝视发作)和/或全身性强直阵挛发作(癫痫大发作)。特发性全身性癫痫通常用药物治疗。一些人长大后不再患有这种病状,并停止发作,如儿童期失神性癫痫病例和大量青少年肌阵挛癫痫患者。

[0385] 特发性部分性癫痫开始于儿童期(5至8岁之间),并且可能是家族史的一部分。也被称为儿童良性局灶性癫痫(BFEC),这被认为是癫痫最温和的类型之一。它几乎总是在青春期就消失了,并且在成年人中从未被诊断出来。发作往往发生在睡眠期间,最常见的是涉及面部的简单部分性运动性发作和继发性全身性(大发作)发作。这种类型的癫痫通常采用脑电图来诊断。

[0386] 症状性全身性癫痫是由广泛的脑损伤引起的。出生时受伤是症状性全身性癫痫最常见的原因。除了发作之外,这些患者通常还有其他神经系统问题,诸如智力迟钝或脑瘫。具体的遗传性脑病,诸如肾上腺脑白质营养不良(ADL)或脑感染(诸如脑膜炎和脑炎)也可引起症状性全身性癫痫。当症状性全身性癫痫的病因不能鉴定时,这种病症可称为隐源性癫痫。这些癫痫包括不同的亚型,最常见的类型是Lennox-Gastaut综合征。多种类型的发作(全身性强直阵挛发作、强直发作、肌阵挛发作、强直发作、失张力发作和失神发作)在这些患者中常见,并且可能难以控制。

[0387] 症状性部分性(或局灶性)癫痫是最常见的癫痫类型,开始于成人,但也经常发生在儿童中。这种类型的癫痫是由脑的局部异常引起的,其可由创伤性脑损伤、中风、肿瘤、外伤、先天性(出生时存在的)脑异常、脑组织的疤痕或“硬化”、囊肿或感染引起。有时,这些脑

异常可以在MRI扫描中看到,但尽管反复尝试,它们往往无法被鉴别的,因为它们都是微观的。

[0388] 有症状的部分(或局灶)癫痫的一个实例是颞叶癫痫(TLE),这是一组主要涉及由神经元过度兴奋引起的杏仁核-海马体功能失调的病症。特别是内侧颞叶癫痫(MTLE),可能是所有癫痫中最典型的电临床综合征,也是成人中最常见的局灶性癫痫。至少70%的MTLE患者对目前可用的药物有耐药性。颞叶易于发生局灶性发作的内在潜力是基于独特的解剖功能网络,涉及杏仁核-海马体复合体和内嗅皮层。大多数难治性TLE患者表现出严重的单侧海马体萎缩,即所谓的海马体硬化(HS),其组织病理学特征为CA1和CA4亚区的节段性神经元细胞损失、星形胶质细胞增生、颗粒细胞分散和轴突重组。虽然在大多数情况下,TLE的病因不明(特发性),但这种病症通常与最初的突发性损伤有关,包括热性惊厥、创伤、中风、脑感染或癫痫持续状态(SE)。人们普遍同意,此类损伤会引起脑的病理变化,从而触发癫痫发生过程,并在几个月到几年的潜伏期后导致癫痫。除发作外,耐药性TLE的特征是认知能力下降,特别是涉及记忆功能,并伴有精神副发病变。TLE中的行为缺陷对疾病的负担有很大的影响,并且通常比发作本身对患者生活质量的负面影响更大。

[0389] 药物组合物和施用

[0390] 本公开的补体抑制剂(例如,抗体)可以以药物组合物的形式施用。

[0391] 本公开的抑制剂(例如,抗体)的治疗配制物可以通过将具有所需纯度的抑制剂与任选的药理学上可接受的载体、赋形剂或稳定剂混合以冻干配制物或水溶液的形式来制备以用于储存(Remington's Pharmaceutical Sciences第16版,0sol,A编[1980])。可接受的载体、赋形剂或稳定剂在所用的剂量和浓度下对接受者无毒,并且包括缓冲剂(诸如磷酸盐、乙酸盐、柠檬酸盐和其他有机酸);抗氧化剂(包括抗坏血酸和甲硫氨酸);防腐剂(诸如十八烷基二甲基苄基氯化铵;氯化六甲铵;苯扎氯铵;苜蓿素氯铵;苯酚、丁醇或苯甲醇;对羟基苯甲酸烷基酯,诸如对羟基苯甲酸甲酯或对羟基苯甲酸丙酯;儿茶酚;间苯二酚;环己醇;3-戊醇;和间甲酚);低分子量(少于约10个残基)多肽;蛋白质(诸如血清白蛋白、明胶或免疫球蛋白);亲水聚合物(诸如聚乙烯吡咯烷酮);氨基酸(诸如甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、组氨酸、精氨酸、脯氨酸和/或赖氨酸);单糖、二糖和其他碳水化合物(包括葡萄糖、甘露糖或糊精);螯合剂(诸如EDTA);糖类(诸如蔗糖、甘露醇、海藻糖或山梨醇);成盐抗衡离子(诸如钠);金属复合物(例如Zn-蛋白质复合物);和/或非离子表面活性剂(诸如TWEEN™、PLURONICS™或聚乙二醇(PEG))。

[0392] 脂转染或脂质体也可用于将抗体或抗体片段递送至细胞中,其中特异性结合靶蛋白的结合结构域的表位或最小片段是优选的。

[0393] 抑制剂也可以包埋在例如通过凝聚技术或通过界面聚合制备的微胶囊(例如,分别为羟甲基纤维素或明胶-微胶囊和聚-(甲基丙烯酸甲酯)微胶囊)中、包埋在胶体药物递送系统(例如,脂质体、白蛋白微球、微乳剂、纳米颗粒和纳米胶囊)中或包埋在粗乳剂中。此类技术公开于Remington's Pharmaceutical Sciences第16版,0sol,A编(1980)中。

[0394] 用于施用的制剂可以是无菌的。这易于通过经由无菌过滤膜过滤来实现。

[0395] 可以制备缓释制剂。缓释制备剂的合适实例包括包含抑制剂的固体疏水性聚合物的半透过性基质,所述基质为成形制品形式,例如膜或微胶囊。持续释放基质的实例包括聚酯、水凝胶(例如,聚(甲基丙烯酸2-羟乙酯)或聚乙烯醇)、聚丙交酯(美国专利号3,773,919)、L-谷氨酸和 γ -乙基-L-谷氨酸盐的共聚物、不可降解的乙烯-乙酸乙烯酯、可降解的

乳酸-乙醇酸共聚物(诸如LUPRON DEPOTTM) (由乳酸-乙醇酸共聚物和醋酸亮丙瑞林(leuprolide acetate)组成的可注射微球)和聚-D-(-)-3-羟基丁酸。虽然例如乙烯-醋酸乙烯酯和乳酸-乙醇酸的聚合物能够释放分子超过100天,但是某些水凝胶释放蛋白质的时间较短。

[0396] 本公开的抗体和组合物通常通过各种途径施用,包括但不限于局部、肠胃外、皮下、腹膜内、肺内、鼻内和病变内施用。肠胃外施用途径包括肌内、静脉内、动脉内、腹膜内、玻璃体内、鞘内或皮下施用。

[0397] 药物组合物还可包含(取决于所需的配制物)药学上可接受的、无毒的稀释剂载体,所述稀释剂载体被定义为通常用于配制针对动物或人施用的药物组合物的媒介物。选择稀释剂以便不影响组合的生物活性。此类稀释剂的实例为蒸馏水、缓冲水、生理盐水、PBS、林格氏溶液(Ringer's solution)、葡萄糖溶液及汉克溶液(Hank's solution)。另外,药物组合物或配制物可以包括其它载体、佐剂或非毒性、非治疗性、非免疫原性稳定剂、赋形剂等。组合物还可包括接近生理条件的额外物质,例如pH调节剂和缓冲剂、毒性调节剂、湿润剂及去污剂。

[0398] 组合物还可以包括任何各种稳定剂,例如抗氧化剂。当药物组合物包括多肽时,多肽可以与各种众所周知的化合物复合,这些化合物增强多肽的体内稳定性,或增强其药理学特性(例如,增加多肽的半衰期,降低其毒性,增强其它药代动力学和/或药效学特征,或增强溶解度或吸收)。此类修饰或复合剂的实例包括硫酸盐、葡糖酸盐、柠檬酸盐以及磷酸盐。组合物的多肽也可以与增强其体内属性的分子复合。此类分子包括例如碳水化合物、多胺、氨基酸、其它肽、离子(例如,钠、钾、钙、镁、锰)以及脂质。适用于各种类型施用的另外关于配制物的指导可见于Remington's Pharmaceutical Sciences, Mace Publishing Company, Philadelphia, Pa., 第17版(1985)中。对于用于药物递送的方法的简要综述参见Langer, Science 249:1527-1533(1990)。

[0399] 活性成分的毒性和治疗功效可根据细胞培养物和/或实验动物中的标准药物工序来确定,包括例如确定LD50(50%群体致死剂量)和ED50(50%群体有效治疗剂量)。毒性与治疗作用之间的剂量比为治疗指数并且其可表示为LD50/ED50比。展现出高治疗指数的治疗剂为优选的。

[0400] 从细胞培养和/或动物研究中获得的数据可用于配制用于人的剂量范围。活性成分的剂量通常处于包括具有低毒性的ED50的循环浓度范围内。剂量可取决于所采用的剂型和所利用的施用途径而在这个范围内变化。

[0401] 本文所述的药物组合物可以多种不同方式施用。实例包括通过口服、鼻内、直肠、玻璃体内、局部、腹膜内、静脉内、肌内、皮下、真皮下、经皮、鞘内和颅内方法施用含有药学上可接受的载体的组合物。

[0402] 对于口服施用,活性成分可以以固体剂型施用,诸如胶囊、片剂和粉剂,或者以液体剂型施用,诸如酏剂、糖浆剂和混悬剂。可以将一种或多种活性组分与非活性成分和粉末状载体(诸如葡萄糖、乳糖、蔗糖、甘露醇、淀粉、纤维素或纤维素衍生物、硬脂酸镁、硬脂酸、糖精钠、滑石粉、碳酸镁)一起封装在明胶胶囊中。可以被添加以提供希望的颜色、味道、稳定性、缓冲能力、分散性或其他已知的希望特征的额外的非活性成分的实例是红氧化铁、硅胶、十二烷基硫酸钠、二氧化钛和可食用的白色墨水。类似的稀释剂可用于制备压制片剂。

片剂和胶囊都可以制成缓释产品,以在数小时内持续释放药物。压制片剂可以包糖衣或薄膜衣以掩盖任何不愉快的味道并保护片剂免受大气影响,或者包肠溶衣以在胃肠道中选择性崩解。用于口服施用的液体剂型可以含有着色剂和调味剂以增加患者的接受度。

[0403] 适于胃肠外施用的配制物包括水性和非水性的等渗无菌注射溶液,其可含有抗氧化剂、缓冲剂、抑菌剂和使配制物与预期接受者的血液等渗的溶质,以及水性和非水性的无菌悬浮液,其可包括悬浮剂、增溶剂、增稠剂、稳定剂和防腐剂。

[0404] 用来配制药物组合物的组分优选地具有高纯度并且大致上不含潜在有害的污染物(例如,至少国家食品(NF)级、通常至少分析级并且更通常至少药物级)。此外,意图用于肠胃外使用的组合物通常为无菌的。为了达到在使用之前必须合成给定的化合物的程度,所得到的产物通常大致上不含任何潜在的毒性剂、具体为任何内毒素,所述毒性剂可在合成或纯化过程期间存在。用于肠胃外施用的组合物通常也是基本等渗的,并且在GMP条件下制得。

[0405] 本公开的组合物可以使用任何医学上适当的程序来施用,例如,血管内(静脉内、动脉内、毛细血管内)施用,注射入脑脊液、玻璃体内,局部,腔内或直接注射入脑。根据已知的技术,鞘内施用可以通过使用Ommaya贮库来进行。(F. Balis 等人, Am J. Pediatr. Hematol. Oncol. 11, 74, 76 (1989))。

[0406] 当治疗剂在脑中局部施用时,本公开的治疗组合物的一种施用方法是通过任何合适的技术沉积在位点内或位点附近,诸如通过直接注射(如果需要,借助于注射注射器的立体定位)或通过将Ommaya贮库的尖端放入腔或囊肿中进行施用。替代地,可将对流增强递送导管直接植入该部位、天然或手术产生的囊肿或正常脑组织中。此类对流增强的药物组合物递送装置极大地改善了组合物在整个脑组织中的扩散。这些递送装置的植入导管利用高流量微输注(流速在约0.5至15.0 μ l/分钟的范围),而不是扩散流,将治疗组合物递送至脑和/或肿瘤块。此类装置描述于美国专利号5,720,720,在本文中全部通过引入并入。

[0407] 给予特定患者的有效量的治疗组合物将取决于各种因素,若干所述因素将在患者与患者之间不同。有能力的临床医生将能够确定施用于患者的治疗剂的有效量。药剂的剂量将取决于治疗、施用途径、治疗性质、患者对治疗的敏感性等。利用LD50动物数据和其它信息,临床医生可以根据施用途径确定个体的最大安全剂量。利用普通技术,有能力的临床医生将能够在常规临床试验的过程中优化特定治疗组合物的剂量。组合物可以以一系列多于一次的施用方式施用于受试者。对于治疗组合物,有时需要或可能希望定期施用。治疗方案因药剂而异;例如,一些药剂可以每日或半日服用一段时间,而更多的选择性药剂可以在更确定的时间过程内施用,例如一天、两天、三天或更多天、一周或更多周、一个月或更多个月等,每日、半日、半周、每周等服用。

[0408] 可以对配制物进行优化,以便在脑内保持和稳定。当药剂被施用到颅腔中时,希望药剂保留在腔室中,并且不扩散或以其他方式跨血脑屏障。稳定技术包括交联、多聚化或连接至例如聚乙二醇、聚丙烯酰胺、中性蛋白载体等的基团,以实现分子量的增加。

[0409] 增加保留的其它策略包括将药剂包埋在可生物降解或可生物侵蚀的植入物中。治疗活性剂的释放速率由通过聚合物基质的转运速率和植入物的生物降解性来控制。药物通过聚合物屏障的转运也将受到化合物溶解度、聚合物亲水性、聚合物交联程度、聚合物吸水膨胀以使聚合物屏障对药物更具渗透性、植入物的几何形状等的影响。植入物的尺寸与选

择作为植入部位的区域的大小和形状相当。植入物可以是颗粒、薄片、贴片、斑块、纤维、微胶囊等,并且可以是与所选插入部位相容的任何尺寸或形状。

[0410] 植入物可以是单片的,即活性剂均匀分布在整個聚合物基质中,或被包封,其中活性剂的贮库被聚合物基质包封。待使用的聚合物组合物的选择将随着施用部位、所需治疗时间、患者耐受性、待治疗的疾病的性质等而变化。聚合物的特征包括在植入部位处的生物降解性、与所关注药剂的相容性、易于封装、在生理环境中的半衰期。

[0411] 可以使用的可生物降解的聚合物组合物可以是有机酯或醚,其在降解时会产生生理上可接受的降解产物,包括单体。酸酐、酰胺、原酸酯或类似物本身可使用或与其它单体组合使用。聚合物可以是缩合聚合物。聚合物可以是交联的或非交联的。尤其关注的是羟基脂族羧酸的聚合物(均聚物或共聚物)和多糖。所关注聚酯包括D-乳酸、L-乳酸、外消旋乳酸、乙醇酸、聚己内酯及其组合的聚合物。通过使用L-乳酸盐或D-乳酸盐,获得了缓慢生物降解的聚合物,而外消旋物显著增强降解。乙醇酸和乳酸的共聚物尤其受关注,其中生物降解速率由乙醇酸与乳酸的比例控制。降解最快的共聚物含有大致等量的乙醇酸和乳酸,其中任一种均聚物更耐降解。乙醇酸与乳酸的比例也将影响植入物的脆性,对于较大的几何形状,更柔软的植入物是合乎需要的。所关注多糖包括藻酸钙和功能化的纤维素,特别是羧甲基纤维素酯,其特征在于不溶于水,分子量为约5kD至500kD等。可生物降解的水凝胶也可以用于本公开的植入物中。水凝胶通常是共聚物物质,其特征在于吸收液体的能力。可以使用的示例性生物可降解水凝胶描述于Heller, *Hydrogels in Medicine and Pharmacy*, N.A. Peppes编,第三卷, CRC Press, Boca Raton, Fla., 1987, 第137-149页。

[0412] 治疗方法

[0413] 本发明的方法通过施用补体抑制剂来调节对癫痫的免疫响应。癫痫可由创伤性脑损伤(TBI)、缺氧性脑损伤、脑感染、中风或遗传综合征诱发。在优选的实施方案中,癫痫是TBI诱发的癫痫。不受理论的束缚,未成熟的星形胶质细胞在发育期间诱发神经元中C1q蛋白的表达。在TLE患者中,有证据表明海马体内的小胶质细胞活化,这表明免疫响应被活化。炎症介质诸如补体因子通常在健康脑组织中以非常低的水平表达,但可被各种脑损害诸如感染、缺血、损伤和发作迅速诱发。C1q、C1r和C1s的活化有助于炎症响应,导致突触损失,以及发作和发作相关神经元损伤的产生和复发。失调的持续性炎症、血脑屏障损伤和不受控制的发作会触发TLE的进展。在TLE的发展过程中,C1q、C1r和C1s的过度表达可与补体活化信号(例如 β -淀粉样蛋白、APP、细胞因子(诸如IFN γ 、TNF α)等)偶联,还导致炎症。

[0414] 通过施用抑制补体活化的药物,可以维持否则会损失的突触。此类药剂包括C1q、C1r和C1s抑制剂,上调天然补体抑制剂表达的药剂,下调神经元中C1q、C1r或C1s合成的药剂,阻断补体活化的药剂、阻断补体活化信号的药剂等。

[0415] 通过施用抑制补体活化的药剂,可以减少介导癫痫(诸如特发性全身性癫痫、特发性部分性癫痫、症状性全身性癫痫或症状性部分性癫痫)的抗原特异性抗体的产生。此类药物包括抗C1q、抗C1r或抗C1s抗体抑制剂。其它药物可包括上调天然补体的表达的抑制剂,或下调细胞中C1q、C1r或C1s合成的药剂,阻断补体活化的药剂,阻断补体活化的信号的药剂等。

[0416] 方法促进在与突触损失相关的病状中神经元功能的改善维持。相对于未经治疗的患者,神经连接的维持提供了神经退行性疾病的功能改善。突触损失的预防可以包括在1、

2、3、4、5、6天或至少一周的期间内相对于缺乏这种治疗的对照组的至少可测量的改善,例如突触数量的至少10%的改善、至少20%的改善、至少50%的改善或更多。

[0417] 优选地,本发明的药物以减少突触损失同时最小化任何副作用的剂量施用。预期将在医生的指导下获得和使用用于体内使用的组合物。根据疾病的性质、施用频率、施用方式、药物从宿主体内的清除情况等,治疗配制物的剂量将广泛地变化。

[0418] 将给予特定患者的有效量的治疗组合物将取决于各种因素,若干所述因素将在患者与患者之间不同。利用普通技术,有能力的临床医生将能够在常规临床试验的过程中调适特定治疗剂或成像组合物的剂量。

[0419] 治疗剂(例如补体抑制剂、基因表达活化剂等)可通过与适当的药学上可接受的载体或稀释剂联合并入用于治疗性施用的各种配制物中,并且可配制成固体、半固体、液体或气体形式的制剂,例如片剂、胶囊、粉末、颗粒、软膏、溶液、栓剂、注射剂、吸入剂、凝胶、微球和气雾剂。因此,化合物的施用可以通过各种方式实现,包括口服、口腔、直肠、肠胃外、腹膜内、皮内、经皮、鞘内、鼻内、气管内施用等。活性剂可在施用之后为全身性的或可通过使用区域施用、内部施用或使用起到在植入部位处保持活性剂量作用的植入物而为局部的。

[0420] 通过血脑屏障(BBB)递送药物的一种策略需要破坏BBB,或者通过诸如甘露醇或白三烯的渗透手段,或者通过使用血管活性物质诸如缓激肽的生化手段。使用BBB开放靶向特定药物的可能性也是一种选择。当组合物通过血管内注射施用时,BBB破坏剂可以与本发明的治疗组合物共同施用。通过BBB的其他策略可能需要使用内源性转运系统(包括载体介导的转运蛋白(诸如葡萄糖和氨基酸载体)),受体介导的胰岛素或转铁蛋白的转运内吞,以及主动外排转运蛋白(诸如p-糖蛋白)。活性转运部分也可以与用于本发明中使用的治疗或成像化合物结合,以促进穿过血管上皮壁的转运。替代地,BBB后的药物递送是通过直接将治疗剂或显像剂鞘内递送至颅骨,如通过Ommaya贮库。

[0421] 方法中和补体生物活性。受影响的补体生物活性可以是(1) C1q与自身抗体的结合,(2) C1q与C1r的结合,(3) C1q与C1s的结合,(4) C1q与IgM的结合,(5) C1q与IgG的结合,(6) C1q与磷脂酰丝氨酸的结合,(7) C1q与正五聚蛋白-3的结合,(8) C1q与C-反应蛋白(CRP)的结合,(9) C1q与球状C1q受体(gC1qR)的结合,(10) C1q与补体受体1(CR1)的结合,(11) C1q与 β -淀粉样蛋白的结合,(12) C1q与钙网蛋白的结合,(13) C1q与凋亡细胞的结合,或(14) C1q与B细胞的结合。受影响的补体生物活性可以进一步是(1) 经典补体活化途径的活化,(2) 抗体和补体依赖性细胞毒性的活化,(3) CH50溶血,(4) 突触损失,(5) B细胞抗体产生,(6) 树突细胞成熟,(7) T细胞增殖,(8) 细胞因子产生,(9) 小胶质细胞活化,(10) 阿瑟氏反应,(11) 突触或神经末梢的吞噬作用,(12) 补体受体3(CR3/C3)表达细胞的活化。

[0422] 预期可以在医生的指导下获得和使用用于体内使用的组合物。根据疾病的性质、施用频率、施用方式、药物从宿主体内的清除情况等,治疗配制物的剂量可以广泛地变化。

[0423] 给予特定患者的有效量的治疗组合物将取决于各种因素,若干所述因素将在患者与患者之间不同。利用普通技术,有能力的临床医生将能够在常规临床试验的过程中调适特定治疗剂或成像组合物的剂量。

[0424] 治疗剂(例如补体抑制剂、基因表达活化剂等)可通过与适当的药学上可接受的载体或稀释剂联合并入用于治疗性施用的各种配制物中,并且可配制成固体、半固体、液体或气体形式的制剂,例如片剂、胶囊、粉末、颗粒、软膏、溶液、栓剂、注射剂、吸入剂、凝胶、微球

和气雾剂。因此,化合物的施用可以通过各种方式实现,包括口服、口腔、直肠、肠胃外、腹膜内、皮内、经皮、鞘内、鼻内、气管内施用等。活性剂可在施用之后为全身性的或可通过使用区域施用、内部施用或使用起到在植入部位处保持活性剂量作用的植入物而为局部的。

[0425] 化合物筛选

[0426] 在本发明的一个方面,筛选具有调节突触损失的能力的用作抑制剂的候选药物。这种化合物筛选可以使用体外模型、基因改变的细胞或动物或纯化的蛋白质来进行。为此目的,可以使用多种测定。在一个实施方案中,预测为补体拮抗剂或激动剂的化合物(包括特异性补体蛋白(例如C1q)和补体活化信号(例如 β -淀粉样蛋白、APP)等)在体外培养系统中进行测试,如下所述。

[0427] 例如,可以通过已知的药理学、通过结构分析、通过使用基于计算机的建模的合理药物设计、通过结合测定等来鉴别候选药物。各种体外模型可用于确定化合物是否结合或以其它方式影响补体活性。此类候选化合物用于在允许突触损失的环境中接触神经元。可以在体内模型中进一步测试此类化合物对突触损失的影响。

[0428] 也可以对星形胶质细胞产生的分子进行筛选,例如诱导神经元中C1q表达的未成熟星形胶质细胞。在此类测定中,评估神经元和星形胶质细胞的共培养物中诱导C1q表达的分子的产生或表达。例如,可以向培养物中添加封闭抗体,以确定对神经元中C1q表达的诱导效果。

[0429] 通过向培养物中的神经元施用候选药剂,并在药剂不存在或存在的情况下确定突触的存在,来定量突触损失。在本发明的一个实施方案中,神经元是例如RGC的原代培养物。RGC的经纯化的群体通过常规方法获得,诸如顺序免疫淘选。细胞在合适的培养基中培养,该培养基通常包含适当的生长因子,例如CNTF;BDNF;等。将神经细胞(例如RCG)培养一段时间,这段时间足以允许强健的过程生长,然后用候选试剂培养约1天至1周的时间段。在许多实施方案中,在活星形胶质细胞滋养层上培养神经元,以诱导突触损失的信号传导。培养星形胶质细胞滋养层的方法是本领域已知的。例如,可以将皮质神经胶质细胞铺在不允许神经元存活培养基中,去除非粘附细胞。

[0430] 对于突触定量,培养物被固定、封闭和洗涤,然后用抗体特异性突触蛋白(例如突触结合蛋白等)染色,并且用本领域已知的适当试剂可视化。染色分析可以在显微镜下进行。在一个实施方案中,用照相机和图像捕获软件获取荧光发射的数字图像,调整以去除像素值范围中未使用的部分,并且调整使用的像素值以利用整个像素值范围。对应的通道图像可以被合并以创建含有作为单独颜色通道的两个单通道图像的彩色(RGB)图像。可以使用滚球背景扣除算法从每个图像通道中去除低频背景来鉴定共定位点。记录图像中所有突触结合蛋白、PSD-95和共定位点的数量、平均面积、平均最小和最大像素强度以及平均像素强度,并保存到磁盘进行分析。

[0431] 候选药物可从多种来源获得,包括合成或天然化合物库。例如,许多方法可用于多种有机化合物和生物分子的随机和定向合成,包括随机寡核苷酸和寡肽的表达。替代地,细菌、真菌、植物和动物提取物形式的天然化合物库是可获得的或容易产生的。此外,天然或合成产生的文库和化合物易于通过常规的化学、物理和生物化学方法进行修饰,并可用于产生组合文库。已知的药物可以进行定向或随机的化学修饰,诸如酰化、烷基化、酯化、酰胺化等以产生结构类似物。测试试剂可以从文库中获得,诸如天然产物文库或组合文库。

[0432] 候选化合物库也可以通过合理设计来制备。(通常参见Cho等人, Pac.Symp.Biocompat.305-16,1998);Sun等人,J.Comput.Aided Mol.Des.12:597-604, 1998);每个都通过引用整体以其整体并入)。例如,磷酸酶抑制剂文库可以通过组合化学文库的合成来制备(一般参见DeWitt等人,Proc.Nat.Acad.Sci.USA 90:6909-13,1993;国际专利公开W0 94/08051;Baum,Chem.&Eng.News,72:20-25,1994;Burbaum等人, Proc.Nat.Acad.Sci.USA 92:6027-31,1995;Baldwin等人,J.Am.Chem.Soc.117:5588-89, 1995;Nestler等人,J.Org.Chem.59:4723-24,1994;Borehardt等人,J.Am.Chem.Soc.116: 373-74,1994;Ohlmeyer等人,Proc.Nat.Acad.Sci.USA 90:10922-26,所有这些文献在本文中通过引用以其整体并入)。

[0433] 最初通过任何筛选方法鉴定的化合物可以进一步测试以验证表观活性。此类方法的基本形式涉及对作为人模型的动物施用在初始筛选中鉴定的先导化合物,然后确定对突触损失的影响。验证研究中使用的动物模型通常是哺乳动物。合适动物的具体实例包括但不限于灵长类动物、小鼠和大鼠。

[0434] 联合治疗

[0435] 本公开的补体抑制剂可不限于与癫痫的任何额外治疗联合使用,诸如特发性全身性癫痫、特发性部分性癫痫、症状性全身性癫痫或症状性部分性癫痫。

[0436] 在一些实施方案中,本公开的抗体、抗体片段和/或抗体衍生物与第二种抑制性抗补体因子抗体诸如抗C1q或抗C1r抗体或抗C1s抗体联合施用。在一些实施方案中,抗体与第二和第三抑制性抗补体因子抗体(诸如抗C1s抗体、抗C1q抗体和/或抗C1r抗体)一起施用。

[0437] 在一些实施方案中,本公开的抑制剂与抗体依赖性细胞毒性(ADCC)的抑制剂联合施用。ADCC抑制剂可包括但不限于可溶性NK细胞抑制性受体,诸如杀伤细胞Ig样受体(KIR)(其识别HLA-A、HLA-B或HLA-C)和C型凝集素CD94/NKG2A异二聚体(其识别HLA-E)(参见、例如López-Botet M.,T.Bellón,M.Llano,F.Navarro,P.García&M.de Miguel.(2000), Paired inhibitory and triggering NK cell receptors for HLA class I molecules.Hum.Immunol.61:7-17;Lanier L.L.(1998) Follow the leader:NK cell receptors for classical and nonclassical MHC class I.Cell 92:705-707.),和镅(参见,例如,Immunopharmacology 1990;第20卷,第73-8页)。

[0438] 在一些实施方案中,本公开的抗体、抗体片段和/或抗体衍生物与补体活化替代途径的抑制剂联合施用。此类抑制剂可包括但不限于因子B阻断抗体;因子D阻断抗体;阻断C3裂解的可溶性、膜结合、标记或融合蛋白形式的CD59、DAF、CR1、CR2、Crry或坎普他汀(Comstatin)样肽;非肽C3aR拮抗剂,诸如SB 290157;眼镜蛇毒液因子(Cobra venom factor);或非特异性补体抑制剂,例如甲磺酸钠莫司他(nafamostat mesilate)(FUTHAN; FUT-175);抑肽酶(aprotinin);K-76单羧酸(MX-1);和肝素(参见,例如,T.E.Mollnes&M.Kirschfink,Molecular Immunology 43(2006)107-121)。

[0439] 在一些实施方案中,本公开的抗体、抗体片段和/或抗体衍生物与自身抗体及其自身抗原之间相互作用的抑制剂联合施用。此类抑制剂可以包括纯化的可溶形式的自身抗原,或抗原模拟物,例如肽或RNA衍生的模拟表位,包括AQP4抗原的模拟表位。替代地,此类抑制剂可以包括阻断剂,其识别自身抗原并防止自身抗体结合,而不触发经典的补体途径。此类阻断剂可包括例如自身抗原结合RNA适体或在其Fc结构域中缺乏功能性C1q结合位点

的抗体(例如,Fab片段或以其它方式工程化为不结合C1q的抗体)。

[0440] 试剂盒

[0441] 本发明还提供了含有本公开的抗体、抗体片段和/或抗体衍生物的试剂盒。本发明的试剂盒包括一个或多个容器,所述容器包含本公开的纯化的抗C1s、抗C1q或抗C1r抗体以及根据本领域已知方法的使用说明书。一般而言,这些说明书包括对施用抑制剂以治疗或诊断癫痫(诸如特发性全身性癫痫、特发性部分性癫痫、症状性全身性癫痫或症状性部分性癫痫)的描述。试剂盒可进一步包括基于对个体是否患有疾病和疾病阶段的鉴定来选择适合治疗的个体的描述。

[0442] 说明书通常包括关于剂量、给药方案和用于预期治疗的施用途径的信息。容器可以是单位剂量、散装包装(例如,多剂量包装)或亚单位剂量。本发明的试剂盒中提供的说明书通常是标签或包装插页上的书面说明书(例如,试剂盒中包括的纸片),但是机器可读的说明书(例如,磁或光存储盘上携带的说明书)也是可接受的。

[0443] 标签或包装插页可以指示该组合物用于治疗TBI诱发的癫痫。可以提供用于TBI诱发的癫痫的说明书来实践本文所述的任何方法。

[0444] 标签或包装插页可以指示该组合物用于治疗TLE。可以提供TLE说明书来实践本文所述的任何方法。

[0445] 本发明的试剂盒在合适的包装中。合适的包装包括但不限于小瓶、瓶子、广口瓶、软包装(例如,密封的聚酯薄膜(Mylar)或塑料袋)等。还考虑了与特定装置联合使用的包装,所述特定装置例如吸入器、鼻腔施用装置(例如,雾化器)或输注装置(诸如微型泵)。试剂盒可以具有无菌接入端口(例如,容器可以是静脉注射液袋或具有可被皮下注射针头刺穿的塞子的小瓶)。所述容器还可以具有无菌接入端口(例如,所述容器可以是静脉注射液袋或具有可被皮下注射针头刺穿的塞子的小瓶)。组合物中的至少一种活性剂是经典补体途径的抑制剂。所述容器可以进一步包含第二药物活性剂。

[0446] 试剂盒可以选择性地提供额外的组分,例如缓冲液和解释信息。通常,试剂盒包括容器和在容器上或与容器相关的标签或包装插页。

[0447] 诊断用途

[0448] 虽然一些癫痫发作的人有异常的脑电图,但许多人没有。还有一些额外的检查有助于鉴定发作的类型及其影响。这些包括癫痫和相关病状的完整神经病学咨询、神经生理学测试,包括常规EEG、门诊和住院视频EEG监测、使用头皮或颅内电极的长期住院视频EEG监测、神经成像(例如MRI、MRS、PET、fMRI)、神经心理学以及言语和听觉处理评估。

[0449] 例如,颞叶癫痫是部分或定位相关癫痫的最常见形式。通常,颞叶癫痫有两种类型;一种涉及颞叶的内侧或内部结构,而第二种称为新皮层颞叶癫痫,涉及颞叶的外部。理解对确定受试者患颞叶癫痫(TLE)的风险有用的几个特征是重要的。TLE的一个特征是没有意识丧失(有或没有先兆)的简单局灶性发作或局灶性认知障碍发作(有意识丧失)。意识丧失发生在局灶性认知障碍发作期间,此时发作蔓延至两侧颞叶。在流行病学术语中,局灶性癫痫通常起源于颞叶,但TLE的真实患病率尚不清楚。关于临床表现,先兆出现在大多数颞叶癫痫中。大多数先兆和不自觉动作持续的时间非常短——几秒钟或1至2分钟。先兆可能导致感觉、自主或精神症状。躯体感觉和特殊感觉现象包括嗅觉、听觉和味觉错觉,以及幻觉。患者可能会报告物体的形状、大小和距离失真。此类视觉错误不同于与枕叶发作相关的

视幻觉,因为没有形成的视觉图像。例如,对象可能看起来比平时小或大。此外,在后上颞回发作时可能出现眩晕。精神现象包括似曾相识(熟悉)或旧事如新(不熟悉)的感觉、人格解体(例如超脱自我的感觉)或现实感丧失(周围环境看起来不真实)、恐惧或焦虑,患者可能描述从外部看到自己的身体。自主现象包括心率变化和出汗。患者可能会出现上腹部饱胀感或恶心。

[0450] 在先兆之后,颞叶局灶性认知障碍发作开始于睁大眼睛、一动不动地凝视、瞳孔放大和行为停止。可能注意到咂嘴、咀嚼和吞咽。也可能发生手不自觉地动作或单侧张力障碍姿势。局灶性认知障碍发作可能演变为全身性强直阵挛(GTC)发作。患者通常会经历一段发作后的混乱期。发作后期可能持续几分钟。局灶性认知障碍发作期间由于双侧半球受累发生健忘症。

[0451] TLE的可能潜在原因包括既往感染(例如疱疹性脑炎或细菌性脑膜炎)、创伤性脑损伤、产生挫伤的头损伤或导致脑软化或皮质瘢痕形成的出血、缺氧性脑损伤、脑感染、中风、错构瘤、神经胶质瘤、遗传综合征、血管畸形(例如动静脉畸形、海绵状血管瘤)、隐源性(原因是推测的但尚未确定)或特发性。TLE的其他潜在原因包括由内侧颞叶癫痫产生的海马体硬化,该癫痫始于儿童晚期,然后缓解,但在青春期或成年早期以难治的形式再次出现。此外,热性惊厥可能导致TLE,因为一些患有复杂热性惊厥的儿童似乎在以后的生活中有发生TLE的风险。

[0452] 鉴别诊断有时用于诊断和评估有TLE风险的人。用于TLE诊断的鉴别诊断的一些特征包括白天过度嗜睡(例如,由于睡眠呼吸暂停或发作性睡病引起的)、周期性肢体运动病症、迟发性运动障碍和枕叶癫痫(其可蔓延至颞叶,并且在临床上与颞叶发作无法区分)。心因性发作,即患有心因性发作的患者也可能患有癫痫发作,也用于鉴别诊断。失神发作、认知障碍发作和额叶局灶性认知障碍发作也用于TLE的鉴别诊断。失神发作的特点是突然发作,没有先兆,通常持续少于30秒,没有发作后的混乱期,也不伴有复杂的不自觉动作。局灶性认知障碍发作之前通常有明显的先兆,持续时间超过一分钟,并有一段发作后的混乱期。额叶局灶性认知障碍发作表现为突然发作和突然结束的短暂发作。存在极短的发作后状态,它们可能会导致发声和复杂的运动和性不自觉地动作的行为变化。与TLE鉴别可能需要脑电图(EEG)定位。

[0453] 另外,关于用于确定受试者患颞叶癫痫的风险的诊断和传统方法,MRI通常是神经成像诊断的选择。使用某些标记的常规脑部MRI将检测到计算机断层扫描(CT)未检测到的病变(例如小肿瘤、血管畸形和皮质发育不良)。例如,一种可检测标记是发作间期 $[^{18}\text{F}]$ 氟脱氧葡萄糖-正电子发射断层扫描(^{18}FDG -PET),其灵敏度为60%-90%。另一种可检测标记是动脉自旋标记(ASL),其能够通过测量磁性标记的动脉血液流入靶标区域来量化局部脑血流。

[0454] 为评估耐药性癫痫而进行的MRI需要专门的协议。例如,海马体硬化的特征在于神经元损失和神经胶质增生。HS是手术治疗成人癫痫最常见的病理基础,在67%的患者中可见。据报道,在新诊断的癫痫患者中,有1.5%-3%的成年人患有HS。当评估内侧颞叶结构(海马体、杏仁核、内嗅皮层和海马回)时,MRI用于评估大小、信号、形状和双重病理(SSSD)。HS的典型MRI表现包括T1加权SPGR上的海马体萎缩(通常见于90%-95%的病例)。萎缩在海马体中最为明显。

[0455] 使用液体衰减反转恢复 (FLAIR) 成像,在海马体中观察到增强的信号。FLAIR非常适合检测海马体中的信号变化,因为胶质细胞的变化增加了水含量,在T2加权MRI上表现为信号增加。FLAIR序列消除了侧脑室颞角和脉络膜裂中脑脊液 (CSF) 增加的信号强度,该信号强度可以使常规薄层T2加权自旋回波图像上海马体中增加的信号相形见绌。FLAIR MRI上海马体的基线信号大于皮层的基线信号。在儿童中,在21%的新诊断的TLE患者和高达57%的难治性TLE患者中观察到HS。在患有难治性TLE的儿童中更常见的发现包括MCD和发育性肿瘤。

[0456] CT扫描在发作的紧急评估中,或在MRI禁忌时(例如当患者有起搏器或金属植入物时)有一定作用。非对比CT扫描将无法鉴定一些血管病变和肿瘤。CT在评估难治性癫痫中的作用有限。心电图 (ECG) 也可用于评估所有意识改变的患者,尤其是年龄较大的患者,此时心律失常的病症可能类似癫痫。二十四小时动态ECG和其他心血管测试(包括植入式环装置)也可能有所帮助。当MRI结果正常时,使用放射性同位素氟脱氧葡萄糖 (^{18}F) (FDG-PET) 作为可检测标记的正电子发射断层扫描 (PET) 是有用的。发作间期EEG也用于从头皮电极获得记录,因为三分之一的TLE患者具有双侧的、独立的、暂时性发作间期癫痫样异常。此外,单光子发射计算机断层扫描 (SPECT) 对于手术干预的候选物是有用的,而视频EEG遥测被用作术前评估的部分。如果TLE的诊断仍不确定,也可使用该方法。

[0457] 本发明部分提供了确定受试者发生癫痫的风险的方法,所述癫痫诸如特发性全身性癫痫、特发性部分性癫痫、症状性全身性癫痫或症状性部分性癫痫,所述方法包括:向受试者施用抗C1q、抗C1r或抗C1s抗体,其中所述抗C1q、抗C1r或抗C1s抗体与可检测标记偶联;检测所述可检测标记以测量所述受试者中C1q、C1r或C1s的量或位置;以及将C1q、C1r或C1s中的一种或多种的量或位置与参照进行比较,其中基于C1q、C1r或C1s中的一种或多种的量或位置与参照的比较来表征发生癫痫的风险(所述癫痫诸如特发性全身性癫痫、特发性部分性癫痫、症状性全身性癫痫或症状性部分性癫痫)。

[0458] 一种用于检测C1q、C1r或C1s水平并因此可用于对样品是否与癫痫(诸如特发性全身性癫痫、特发性部分性癫痫、症状性全身性癫痫或症状性部分性癫痫或其临床亚型)相关进行分类的示例性方法涉及从测试受试者获得生物样品,并将该生物样品与能够检测C1q、C1r或C1s的抗体接触,从而在该生物样品中检测C1q、C1r或C1s的水平。在某些情况下,统计算法是单个学习统计分类系统。例如,单个学习统计分类系统可用于基于预测或概率值以及C1q、C1r或C1s的存在或水平将样品分类为C1q、C1r或C1s样本。单个学习统计分类系统的使用通常将样品分类为C1q、C1r或C1s样品,具有至少约75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%的灵敏度、特异性、阳性预测值、阴性预测值和/或总准确度。

[0459] 其他合适的统计算法对本领域技术人员来说是众所周知的。例如,学习统计分类系统包括机器学习算法技术,其能够适应复杂的数据集(例如,所关注标志物的组),并基于此类数据集做出决定。在一些实施方案中,使用单个学习统计分类系统,诸如分类树(例如,随机森林)。在其他实施方案中,使用2、3、4、5、6、7、8、9、10或更多学习统计分类系统的组合,优选串联使用。学习统计分类系统的实例包括但不限于使用归纳学习的系统(例如,诸如随机森林的决策树/分类树、分类和回归树 (C&RT)、提升树等)、概率近似正确 (PAC) 学习、连接机制学习(例如,神经网络 (NN)、人工神经网络 (ANN)、神经模糊网络 (NFN)、网络结构、

诸如多层感知器等感知器、多层前馈网络、神经网络的应用、信念网络中的贝叶斯学习等)、强化学习(例如,已知环境中的被动学习诸如朴素学习、自适应动态学习和时序差分学习、未知环境中的被动学习、未知环境中的主动学习、习动作值函数、强化学习的应用等)以及遗传算法和进化编程。其他学习统计分类系统包括支持向量机(例如,核方法)、多元自适应回归样条(MARS)、Levenberg-Marquardt算法、高斯-牛顿算法、混合高斯模型、梯度下降算法和学习向量量化(LVQ)。

[0460] 在一个实施方案中,方法进一步涉及获得对照生物样品(例如,来自未患有由C1q、C1r或C1s介导的病症或障碍的受试者的生物样品),来自缓解期间或在发展由C1q、C1r、C1s介导的病状或病症之前的受试者的生物样品,或来自在由C1q、C1r或C1s介导的病状或病症的治疗期间的受试者的生物样品。

[0461] 检测C1q、C1r或C1s存在与否的示例性方法是向受试者施用抗C1q、抗C1r或抗C1s抗体,其中抗C1q、抗C1r或抗C1s抗体与可检测标记偶联。在一些实施方案中,可检测标记包括核酸、寡核苷酸、酶、放射性同位素、生物素或荧光标记。在一些实施方案中,可检测标记使用用于x射线、CT、MRI、超声波、PET和SPECT的成像剂来检测。在一些实施方案中,荧光标记选自荧光素、罗丹明、花青染料或BODIPY。

[0462] 应当理解,本文所述的各种实施方案的一种、一些或所有特性可以组合以形成本文提供的组合物和方法的其它实施方案。关于本发明的实施方案的所有组合被明确地包括在本发明中并公开于本文中,就如同每个和每一个组合被个别地且明确地公开。此外,各种实施方案的所有子组合及其元素也被明确地包括在本发明中并公开于本文中,就如同每个和每一个此类子组合被个别地且明确地公开于本文中。本文提供的组合物和方法的这些和其它方面对本领域技术人员来说将变得显而易见。

[0463] 实施例

[0464] 实施例1:材料和方法

[0465] 动物

[0466] 大多数实验使用成年(P30-P180)雄性CD1小鼠。使用成年雄性Thy1-GCaMP6f小鼠(Tg(Thy1-GCaMP6f)GP5.17Dkim ISMR_JAX:025393;C57BL/6同类系)、野生型C57BL/6小鼠(ISMR_JAX:000664),以及C1q基因敲除小鼠(C1qatm1Mjw, ISMR_APB:1494;C57BL/6同类系)用于特定的实验。

[0467] 受控皮层冲击(CCI)

[0468] 我们用2-5%的异氟烷麻醉小鼠,并将它们置于立体定位架中。我们在中心在前囟后-1mm、中线外侧+3mm处的右侧躯体感觉皮层(S1)上进行了3mm的开颅术。使用配备有金属活塞的CCI装置(CCI的Impact One立体定位冲击器,Leica Microsystems)使用以下参数进行TBI:3mm尖端直径,15°角度,距离硬脑膜0.8mm的深度,3m/s的速度,和100ms的停留时间。假手术动物接受相同的麻醉和开颅术,但不造成损伤。

[0469] 免疫染色和显微术

[0470] 我们用致命剂量的Fatal-Plus(参见www.drugs.com/vet/fatal-plus-solution.html)麻醉小鼠,并用于1X PBS中的4%多聚甲醛灌注。在Leica SM2000R滑动切片机上切割连续冠状切片(30μm厚)。切片在4°C下与针对C1q(1:700,兔,Abcam,ab182451,640AB_2732849)、GFAP(1:1000,鸡,Abcam,ab4674,AB_304558)、GFP(1:500,鸡,Aves Labs,

AB_10000240)、Iba1 (1:500,兔,Wako,019-19741,AB_839504)和NeuN (1:500,小鼠,Millipore,MAB377,AB_2298772)的抗体一起孵育。洗涤后,我们将切片与Alexa Fluor缀合的二级抗体(1:300,Thermo Fisher Scientific,A-11029)在室温下孵育两个小时。我们将切片安装在防褪色介质(Vectashield)中,并使用Bioevo BZ-9000Keyence显微镜以10-20倍成像。使用配有Plan Apochromat 10x/0.45NA air或63x/1.4NA油浸物镜的共焦激光扫描显微镜(LSM880,Zeiss)进行共焦成像。多线氩激光用于AlexaFluor488的488nm激发,并且HeNe激光用于AlexaFluor594的561nm激发。

[0471] 人组织的免疫染色

[0472] 将福尔马林固定的石蜡包埋组织以6 μ m切片,并固定在有机硅烷包被的载玻片(SIGMA,密苏里州圣路易斯)上。对标本的代表性切片进行苏木精/伊红处理,以及免疫细胞化学处理。C1q的免疫细胞化学(1:200,兔多克隆;DAKO,丹麦),如前所述在石蜡包埋的组织上进行。切片在室温下孵育1小时,然后在4 $^{\circ}$ C下与一级抗体一起孵育过夜。使用Powervision法,并使用3,3'-二氨基联苯胺为色原,进行单标记免疫细胞化学。切片用苏木精复染。使用了广泛的神经病理学协议(基于欧洲脑网联盟(Brain-Net Europe consortium)的建议;Acta Neuropathologica 115(5):497-507 • 2008),包括标志物诸如pTau(AT8)、 β -淀粉样蛋白、pTDP-43和 α -突触核蛋白。

[0473] 用于电生理学的切片制备

[0474] 我们用4%异氟烷对小鼠实施安乐死,用含有234mM蔗糖、11mM葡萄糖、10mM MgSO₄、2.5mM KCl、1.25mM NaH₂PO₄、0.5mM CaCl₂和26mM NaHCO₃的冰冷却蔗糖切割液灌注,用95% O₂和5% CO₂(pH 7.4)平衡,并断头。我们用Leica VT1200切片机(Leica Microsystems)制备了250- μ m厚的水平切片用于丘脑记录,并且冠状切片用于新皮层记录。将切片在32 $^{\circ}$ C下孵育一小时,然后在24 $^{\circ}$ C-26 $^{\circ}$ C下在含有126mM NaCl、10mM葡萄糖、2.5mM KCl、2mM CaCl₂、1.25mM NaH₂PO₄、1mM MgSO₄和26mM NaHCO₃的人工脑脊液(ACSF)中孵育,并用95% O₂和5% CO₂(pH 7.4)平衡。如所述进行丘脑切片制备。

[0475] 膜片-钳电生理学

[0476] 如前所述进行记录。我们用Olympus显微镜和红外摄像机,通过微分相衬光学,视觉鉴定了S1、nRT和VB神经元。由硼硅酸盐玻璃制成的记录电极在充满细胞内溶液时具有2.5-4M Ω 的电阻。在所有记录中监测接入电阻,并且仅当接入电阻<25M Ω 时才包括用于分析的细胞。在存在印防己毒素(50 μ M,Sigma)和含有120mM葡萄糖酸钾、11mM EGTA、11mM KCl、10mM HEPES、1mM CaCl₂和1mM MgCl₂(用KOH(290mOsm)将pH调节至7.4)的内部溶液的情况下,记录内在和爆发特性和自发兴奋性突触后电流(EPSC)。我们将电位校正为-15mV液体接界电势。

[0477] 在存在犬尿喹啉酸(2mM,Sigma)的情况下记录自发抑制性突触后电流(IPSC),并且内部溶液含有135mM CsCl、10mM EGTA、10mM 685HEPES、5mM Qx-314(N-乙基溴化利多卡因)和2mM MgCl₂,用CsOH(290mOsm)将pH调节至7.3。

[0478] 单核RNA-seq

[0479] 组织解剖

[0480] 我们用4%异氟烷对小鼠实施安乐死,用冰冷的1X PBS灌注,并断头。我们用Leica VT1200切片机(Leica Microsystems)制备了300- μ m厚的冠状切片,并置于Zeiss Stereo

Discovery.V8立体显微镜(Zeiss)下,用于nRT和相邻中继丘脑核的视觉引导显微解剖(如图3A所示)。

[0481] 本研究收集了两次重复的假手术组和mTBI组。重复1含有来自n=五只假手术小鼠和n=六只mTBI小鼠的组织。重复2含有来自n=四只假手术小鼠和n=四只mTBI小鼠的组织。

[0482] 单核分离

[0483] 如前所述(62和dx.doi.org/10.17504/protocols.io.6t8herw),从nRT/丘脑和皮层分离出细胞核。简而言之,将组织放入预冷的Dounce组织研磨器中,该研磨器具有含有200单位RNasin Plus核糖核酸酶抑制剂(Promega)的1mL匀浆缓冲液。用10次敲击的松散的“A”杵和15次敲击的紧密的“B”尺寸杵将组织样品匀浆。将裂解物通过40 μ m的FlowMi过滤器,并在4°C下以500RCF沉淀细胞核。将含有细胞质RNA的所得上清液的级分冷冻用于下游分析。将沉淀的细胞核重悬于匀浆缓冲液中,使用碘克沙醇梯度纯化,并立即用于snRNA-seq。过量细胞核冷冻保存在BamBanker(Wako Chemicals)中。

[0484] 单核RNA文库构建和测序

[0485] 根据制造商的说明书,使用具有双重索引的Chromium Next GEM单细胞3' v3文库试剂盒(10x Genomics)处理SnRNA-seq文库。对于每个样品,在细胞核稀释缓冲液中将细胞核稀释到1,000个细胞核/ μ l,并将9,900个细胞核装载到铬上,靶向回收6,000个细胞核。在不同的铬轮次中处理重复1和2细胞核。基于文库的摩尔浓度汇集文库,并在Illumina NovaSeq 6000系统上使用S1流动池和v1 300循环试剂盒进行测序,其中读段1为28个循环,读段2为90个循环,索引i7为10个循环,并且索引i5为10个循环。Cell Ranger(4.0.0)(10X Genomics)用于执行样本解复用、条形码处理和单细胞基因UMI计数。使读段映射至mm10(GENCODE vM23/Ensembl 98,来自10x)。从重复1中,我们从假手术小鼠中回收了2,337个细胞核,其每细胞平均读段为92,533,且从mTBI小鼠中回收了650个细胞核,其每细胞平均读段为162,363;从重复2中,我们从假手术小鼠中回收了3,891个细胞核,其每细胞平均读段为47,592,并且从TBI小鼠中回收了4,575个细胞核,其每细胞平均读段为41,658,中位数为每细胞2,200个基因。原始数据存放在GEO的登录号下。

[0486] 细胞核聚类的分析

[0487] 用CellRanger处理后,使用Seurat分析数据矩阵。在分析之前,使用SoupX使用默认参数去除环境RNA。使用DoubletFinder从每个GEM反应中除去潜在的双体。在重复1中,从假手术中除去90个双体,从TBI中除去147个双体。在重复2中,从假手术中除去28个双体,并且从TBI中除去181个双体。DoubletFinder的细胞核单体用于下游分析。除了除去双体,我们还除去了线粒体RNA表达超过1%的细胞核。表达是对数标度归一化的,并且前2000个特征用于PCA和下游聚类和UMAP。Harmony用于合并单独的重复。Harmony校正后,我们观察到重复之间没有差异。使用FindClusters调用聚类,并使用关键谱系标志物手动注释。在选择Slc17a7/Slc17a6阴性神经元后,再次对GABA能细胞核进行亚聚类。使用FinderMarkers函数分析了聚类之间以及假手术和mTBI之间的差异表达基因(DEG)。使用Wilcoxon秩和检验计算P值。对于UMAP项目的表达可视化,使用基于马尔可夫亲和力的细胞图插补法(Markov Affinity-based Graph Imputation of cells,MAGIC)插补RNA表达值。

[0488] 细胞质RNA的定量实时PCR

[0489] 如前所述,从每个重复样品中提取大量细胞质RNA (62)。简言之,将150 μ L匀浆与1.5mL Trizma (Zymo) 混合。保留水层,与乙醇混合,并按照制造商关于Zymo的说明,装载到Zymo GC柱(Zymo Quick RNA迷你试剂盒)中。使用分光光度计定量RNA浓度。使用SuperScript III第一链合成试剂盒(SuperScript III First-Strand Synthesis kit, Invitrogen),根据制造商的说明书,使用随机六聚体引物,将200ng的每个样品用作cDNA合成的输入。根据制造商的说明,使用SSO Advanced Universal Sybr Green Supermix (BioRad)对特定的靶cDNA进行定量。使用肌动蛋白作为内部参照,使用 δ - δ CT方法计算相对表达。未经逆转录酶处理的样品用于确定背景。C1qa-F 5'-ATGGAGACCTCTCAGGGATG-3' (SEQ ID NO:69)、C1qa-R 5'-ATACCAGTCCGGATGCCAGC-3' (SEQ ID NO:70)、肌动蛋白-F:5'-ATACCAGTCCGGATGCCAGC-3' (SEQ ID NO:71)、肌动蛋白-R:5'-TCACCCACACTGTGCCCATCTACGA-3' (SEQ ID NO:72)、C4b-F:5'-GACAAGGCACCTTCAGAACC-3' (SEQ ID NO:73)、C4b-R:5'-CAGCAGCTTAGTCAGGGTTACA-3' (SEQ ID NO:74)、C1ra-F:5'-GCCATGCCAGGTGCAAGATCAA-3' (SEQ ID NO:75)、C1ra-R:5'-TGGCTGGCTGCCCTCTGATG-3' (SEQ ID NO:76)、C1s1-F:5'-TGGACAGTGGAGCAACTCCGGT-3' (SEQ ID NO:77)、C1s-R:5'-GGTGGGTACTCCACAGG CTGGAA-3' (SEQ ID NO:78)、C2-F:5'-CTCATCCGCGTTTACTCCAT-3' (SEQ ID NO:79)、C2-R:5'-TGTTCTGTTCGATGCTCAGG-3' (SEQ ID NO:80)、C3-F:5'-AGCAGGTCATCAAGTCAGGC-3' (SEQ ID NO:81)、C3-R:5'-GATGTAGCTGGTGTGGGCT,-3' (SEQ ID NO:82)、C4-F:5'-ACCCCCTAAATAACCTGG-3' (SEQ ID NO:83)、C4-R:5'-CCTCATGTATCCTTTTGGGA-3' (SEQ ID NO:84)、Hc-F:5'-AGGGTACTTTGCCTGCTGAA-3 (SEQ ID NO:85)、Hc-R:5'-TGTGAAGGTGCTCTTGGATG-3' (SEQ ID NO:86)。

[0490] 手术植入设备,用于同时记录ECoG(皮层脑电图)和MUA(多单位活动)

[0491] 如中所述,在行为自由的小鼠中同时进行ECoG、MUA记录和光学操作的设备都是在Paz实验室定制的。通常,记录被优化用于评估躯体感觉亚网络(初级躯体感觉皮层(S1)、躯体感觉腹基底丘脑(VB)和躯体感觉网状丘脑核(nRT))。我们在S1两侧(损伤对侧:前囟后-0.5mm,外侧-3.25mm;同侧:前囟前+1.0-1.4mm,外侧+2.5-3.0mm),PFC上方中央(前囟前+0.5mm,外侧0mm)和V1上方右半球(前囟后部-2.9mm,外侧+2.7mm)植入皮质螺钉。对于VB中的MUA记录,我们将电极植入前囟后-1.65mm,外侧+1.75mm,其中光纤尖端在3.0mm处并且两个电极在皮质表面腹侧3.25mm和3.5mm处。对于nRT中的MUA记录,我们将电极植入前囟后-1.4mm,外侧+2.1mm,其中光纤尖端在2.7mm处并且两个电极分别在皮质表面腹侧2.9mm和3.0mm处。

[0492] 体内电生理学和行为

[0493] 使用定制的光极设备,如所述在行为自由小鼠中进行非慢性MUA电生理记录。使用RZ5 (TDT) 记录ECoG和丘脑LFP/MU (局部场电位/多单位) 信号,并以1221Hz采样,其中丘脑MUA信号以24kHz采样。使用与信号采集同步的摄像机连续监控动物。我们在每次记录开始时用2%异氟烷简单麻醉动物以连接用于记录。每次记录试验持续15-60分钟。为了控制昼夜节律,我们使用有规律的光/暗周期安置动物,并在大约上午9:00到下午6:00之间进行记录。所有的记录都是在清醒状态下进行的。我们在小鼠安乐死后通过组织学验证了光极的位置,这些小鼠没有经历猝死,并且我们能够恢复和处理它们的大脑。

[0494] 慢性ECoG记录设备的手术植入

[0495] 我们用于慢性ECoG记录的无线遥测设备购自Data Sciences International (DSI)。在进行可控皮质冲击手术后,我们如上所述在S1上方两侧植入皮质螺钉。将电池/发射器设备放置在右肩上方的皮肤下。当小鼠从手术中恢复后,我们就开始记录小鼠。将小鼠单独安置在放在接收器上的它们的居住笼里,所述接收器向采集计算机发送信号。使用Ponemah软件 (DSI) 同时连续记录多达八只小鼠的ECoG信号,并以500Hz采样。

[0496] 统计分析

[0497] 除非另有说明,否则所有数值均以平均值给出,并且误差条为平均值的标准误差 (SEM)。在适当的情况下选择参数和非参数测试,并在附图图例中报告。使用MATLAB (SCR_001622)、GraphPad Prism 7/8 (SCR_002798)、ImageJ (SCR_003070)、Ponemah/NeuroScore (SCR_017107)、pClamp (SCR_011323) 和Spike2 (SCR_000903) 进行数据分析。

[0498] 图像分析和细胞定量

[0499] 我们从ImageJ (SCR_003070) 中打开的10x Keyence显微镜图像中选择了S1、nRT和VB的目标区域 (ROI)。为了确保每个ROI覆盖损伤部位同侧和对侧上的相同区域,复制第一ROI并在对侧半球重新定位。然后将图像转换为8比特。上限阈值调整为最大值255,并且下限阈值从0开始增加,直到像素外观与原始图像的荧光染色最接近匹配。对具有相同染色的所有切片使用相同的阈值边界在ROI上进行颗粒分析。通过将同侧积分像素密度除以对侧积分像素密度来计算每个脑区域的积分密度比。对每只动物的三个切片的积分密度比率进行平均,以获得每只动物的每个大脑区域的单一平均比。

[0500] 对NeuN染色的切片进行nRT细胞计数。在ImageJ (SCR_003070) 中概述了nRT,并且我们使用手动计数器插件对神经元胞体进行了手动细胞计数。

[0501] 电生理特性的分析

[0502] 输入电阻 (R_{in}) 和膜时间常数 (τ_m) 通过响应于低强度电流阶跃 (-20至-60pA) 的膜超极化来测量。报告的基强度平均值和SEM是根据每次记录刺激期间首先产生至少一个动作电位的电流计算的。使用GraphPad 755 Prism 7 (SCR_002798), 用 $\alpha=0.05$ 的曼-惠特尼检验分析所有数据 (* $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$, **** $p<0.0001$)。

[0503] 使用从每个细胞中随机选择的200个事件,在MATLAB (SCR_001622) 中从11个假手术nRT神经元和9个TBI神经元产生累积概率分布。

[0504] ECoG中梭状波和癫痫棘波事件检测

[0505] 我们使用MorletWavelet函数来检测8-15Hz频率范围内的梭状波。我们应用了ECoG功率的[1.5倍S.D.+1倍平均值]的阈值,并检测到高于该阈值持续至少0.5秒的所有事件 (图16、图18)。所有检测到的事件都由对各组不知情的科学家进行视觉验证。梭状波事件的发作和偏移时间延长至阈值前后0交叉处的最近周期。从发作和偏移时间之间的梭状波 (8-15Hz) 功率的平均幅度计算梭状波振幅,除以ECoG信号的RMS,并对每只小鼠进行平均。通过从每个梭状波事件的FFT幅度中提取峰值频率,然后计算每只小鼠的平均内部频率,来确定梭状波的频率。对各组不知情的科学家进行视觉验证后拒绝了含有癫痫棘波的假阳性事件 (定义为超过阈值7倍SD+1倍基线平均值的事件,图16和17)。

[0506] 使用Spike2 (7.20版, Cambridge Electronic Design, Cambridge, UK) 和Python 3.7 (Python Software Foundation) 进行睡眠评分和数据分析。5秒的时期被自动评分 (Spike2) 并被指定为觉醒、REM睡眠 (REM) 和NREM/慢波睡眠。自动评分由对治疗组不知情的

有经验的科学家进一步视觉检查。如果ECoG的 δ (δ , 1.5-4Hz) 与总功率 (1.5-80Hz) 之比高于无运动活动的阈值, 则时期被指定为NREM睡眠。在mTBI/假手术后第20或21天, 在NREM睡眠期间进行12小时 (7am-7pm) 时间段的睡眠梭状波分析。分析同一时间段内癫痫棘波。没有分析运动过程中的记录, 因为很难可靠地区分运动伪影和癫痫棘波 (图17)。

[0507] 抗C1q抗体

[0508] 本文所述的抗C1q抗体M1显示出与小鼠C1q的稳健结合, 并且可以抑制多种动物物种血清中的功能性补体活性 (参见Lansita等人2017)。先前的研究报告称, 在啮齿动物和猴身上没有毒性 (参见Lansita等人, 2017年), 并在几个小鼠模型中证明了体内抑制 (参见McGonigal等人, 2013, Vukojicic等人, 2019)。在TBI或假手术后24小时, 给小鼠腹膜内施用抗C1q抗体M1或小鼠IgG1同种型对照抗体的注射液, 并每三天继续接受治疗 (TBI后4天, TBI后7天等), 持续三周。

[0509] 治疗模式和组织裂解

[0510] 对于PK研究, 小鼠在第0天接受假手术或TBI手术, 并在第1天和第4天用100mg/kg抗C1q抗体 (M1) 或同种型对照进行腹膜内治疗。在第5天用PBS灌注小鼠。收集血浆和脑 (同侧和对侧) 并快速冷冻。通过在Qiagen TissueLyser中用7mm钢珠在30Hz下匀浆两分钟, 在1:10w/v BupH™ Tris缓冲盐水 (Thermo Scientific 28379)+蛋白酶抑制剂混合物 (Thermo Scientific A32963) 中裂解脑 (不含嗅球和小脑)。然后将裂解物以17,000x g离心20分钟。上清液用于ELISA测定。

[0511] 药代动力学 (PK) 和药效动力学 (PD) ELISA测定

[0512] 使用夹心ELISA测量游离抗C1q药物M1 (PK)、游离C1q、总C1q、C1s和白蛋白的水平。黑色96孔板 (Nunc 437111) 在碳酸氢盐缓冲液 (pH 9.4) 中于4°C下用75 μ L各自的捕获蛋白/抗体包被过夜: 用于PK的人C1q蛋白 (complement Tech)、用于游离C1q的小鼠单克隆抗C1q (Abcam, ab71940)、用于C1s的兔多克隆抗C1q (Dako, A0136) 和兔多克隆抗小鼠C1s (LSBio, C483829)。次日, 用dPBS pH 7.4 (杜尔贝科氏磷酸缓冲盐溶液) 洗涤板, 并用含有3%牛血清白蛋白 (BSA) 的dPBS封闭。在测定缓冲液 (含有0.3% BSA和0.1% Tween20的dPBS) 中用纯化的蛋白质制备标准曲线。在测定缓冲液中以适当的稀释度制备样品。通过敲击从板去除阻断缓冲液。以每孔75 μ L的量一式两份添加标准品和样品, 并在室温下以300rpm振荡孵育一小时, 用于PK测量。对于补体测定, 样品在4°C孵育过夜, 然后在37°C孵育30分钟, 然后在室温孵育1小时。然后用含有0.05% Tween20的dPBS洗涤板三次, 并向所有孔中添加75 μ L碱性磷酸酶缀合的二级抗体 (用于PK的山羊抗小鼠IgG, 用于游离C1q的M1, 用于总C1q的兔多克隆抗C1q, 用于C1s的兔多克隆抗C1s)。将板在室温下振荡孵育一小时, 用含有0.05% Tween20的dPBS洗涤三次, 并且使用75 μ L碱性磷酸酶底物 (Life Technologies, T2214) 显影。在室温下20分钟之后, 使用光度计读取板。使用来自Abcam (ab210890) 的匹配抗体对完成白蛋白测定, 随后使用亲和素-AP二级抗体进行检测。使用4PL逻辑拟合来拟合标准品并确定未知物的浓度。针对稀释因子对分析物水平进行了校正。

[0513] 实施例2: 继发性C1q表达与丘脑中的慢性炎症、神经退行性变和突触功能障碍一致

[0514] 为了确定mTBI的继发性长期影响, 我们诱导了对成年小鼠的右侧初级躯体感觉皮层 (S1) 的轻度皮层冲击损伤 (图1A), 并在三周后评估了其对脑的影响。这一时期对应于人

类的潜伏期,即脑在受伤后经历适应性和适应不良性变化的时期。我们通过对冠状脑切片进行使用神经元 (NeuN) 标志物和神经胶质炎症标志物 (C1q, 经典补体途径; GFAP, 星形胶质细胞; IBA1, 小胶质细胞/巨噬细胞) (图1C-1E) 的免疫荧光染色来确定皮质丘脑回路中的神经元计数和胶质细胞炎症。手术后三周, mTBI小鼠在TBI S1皮层周围和功能性连接的腹侧基底丘脑 (VB) 和网状丘脑核 (nRT) 中的GFAP、C1q和IBA1表达显著高于假手术小鼠 (图1B-1E)。皮层的炎症在损伤后24小时内发生, 而功能性连接的nRT和VB仅在大约5天后显示出胶质细胞的变化, 这表明丘脑炎症是皮层损伤的继发性后果。我们还在人类TBI患者的丘脑组织中看到类似炎性标志物的表达增加, 这证实了丘脑炎症也是人类体内TBI的结果 (图7)。

[0515] 神经胶质炎症与丘脑区域, 特别是nRT (图1D-1E, 图2A) 中的显著神经元损失有关, nRT从皮层接收其大部分谷氨酸能输入。mTBI小鼠的nRT的神经元明显少于假手术小鼠的nRT, 特别是在“身体”区域, 该区域从受损的躯体感觉皮层接收其大部分兴奋性输入 (图2B-2C)。这一结果表明, 炎症遵循长程的皮层丘脑回路, 从受损的皮层到相连的丘脑。

[0516] 为了测试C1q是否可能标志着该回路中的功能性损伤, 我们在损伤后三至六周获得的脑切片的皮层和丘脑中进行了全细胞膜片钳记录。我们记录了TBI周围S1皮层的第5层锥体神经元和快速峰值形成的GABA能中间神经元, VB的谷氨酸能神经元和nRT的GABA能神经元。假手术和mTBI小鼠在TBI周围皮层和VB丘脑中的神经元固有膜电特性和自发兴奋性和抑制性突触后电流 (sEPSC和sIPSC) 特性相似 (详见表4)。然而, 在nRT中, mTBI导致sIPSC的频率减少 (图2D-2E)。另外, nRT sEPSC振幅更小, 并且趋向于更低的频率 (图2F-2G)。在表达Thy1-GCaMP6f (一种皮质丘脑神经元中神经元钙水平的标志物) 的小鼠中, GFP的免疫荧光染色显示, mTBI后丘脑中的荧光减少 (图2H-2I), 这表明皮质丘脑回路确实受损。

[0517] 我们推断mTBI对皮质丘脑回路的主要长期影响涉及nRT中突触传导的中断, 这与C1q表达增加、皮质输入减少和局部神经元损失相一致。相比之下, 在mTBI后的慢性阶段, TBI周围皮层和VB中的神经元似乎正常 (表4), 这表明这些区域中的炎症 (特别是C1q表达增加) 与神经元兴奋性或突触功能的长期功能障碍无关。

[0518] 表4. 记录的S1皮层、VB和nRT的固有特性、EPSC和IPSC数据的总结。在TBI后三至六周记录小鼠, 并且记录条件描述于方法的膜片-钳电生理学部分。进行曼-惠特尼检验进行统计分析。

[0519]

固有特征	Cm (pF)	Vm (mV)	Rin (MOhm)	Tau (ms)	基强度 (pA)	AP Thr.(mV)	AP Dur.(ms)	AP Amp.(mV)	细胞	切片	小鼠
L5 pyr.											
假手术	94 ± 9.5	-79 ± 2.2	388 ± 22	33 ± 2.0	55 ± 7.1	-55 ± 0.7	4.2 ± 0.2	71 ± 1.2	21	9	6
<i>TBI</i>	91 ± 9.7	-71 ± 2.4	421 ± 43	36 ± 4.8	54 ± 9.2	-51 ± 1.1	4.1 ± 0.3	60 ± 2.4	21	1 0	6
<i>MW</i> <i>p 值</i>	ns	0.03	ns	ns	ns	0.01	ns	0.0001			
L5 FS											
假手术	58 ± 6.0	-70 ± 2.5	473 ± 71	33 ± 5.2	40 ± 8.8	-54 ± 0.4	1.7 ± 0.2	58 ± 2.4	9	6	6
<i>TBI</i>	54 ± 7.3	-72 ± 2.0	573 ± 91	27 ± 3.1	34 ± 5.7	-57 ± 1.2	1.7 ± 0.2	57 ± 2.2	14	9	6
<i>MW</i>	ns	ns	ns	ns	ns	0.03	ns	ns			

[0520]

<i>p</i> 值											
VB											
假手术	166 ± 18	-62 ± 1.2	198 ± 32	28 ± 3.2	158 ± 17	-50 ± 0.9	2.7 ± 0.2	51 ± 2.9	21- 22	7	6
<i>TBI</i>	169 ± 12	-65 ± 1.2	200 ± 19	27 ± 2.6	170 ± 13	-51 ± 0.9	2.3 ± 0.1	49 ± 2.6	28- 33	8	8
<i>MW</i> <i>p</i> 值	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns			
nRT											
假手术	91 ± 13	-74 ± 3.1	402 ± 58	27 ± 2.8	42 ± 5.5	-53 ± 1.3	1.3 ± 0.1	55 ± 2.2	10	7	5
<i>TBI</i>	82 ± 10	-60 ± 3.5	523 ± 114	44 ± 11	69 ± 26	-50 ± 1.5	1.4 ± 0.1	45 ± 3.2	9	6	5
<i>MW</i> <i>p</i> 值	ns	0.00 9	ns	ns	ns	ns	ns	0.03			

[0521]

EPS C	频率 (Hz)	电荷 (pA x ms)	振幅 (pA)	半宽 (ms)	上升时 间(ms)	衰减 时间 (ms)	Tau (ms)	细胞	切片	小鼠
L5 pyr.										
假手术	0.2 ± 0.1	117 ± 7.5	25 ± 1.3	2.2 ± 0.2	1.1 ± 0.1	5.2 ± 0.4	4.0 ± 0.2	2 1	9	6
<i>TBI</i>	0.6 ± 0.2	107 ± 9.1	27 ± 2.4	2.1 ± 0.2	0.9 ± 0.1	5.5 ± 0.4	3.0 ± 0.2	1 6	1 0	6
<i>MW</i> <i>p</i> 值	ns	ns	ns	ns	ns	ns	0.01			
L5 FS										
假手术	1.4 ± 0.5	56 ± 2.4	26 ± 0.8	1.0 ± 0.1	0.4 ± 0.02	3.0 ± 0.4	1.6 ± 0.1	8	6	6
<i>TBI</i>	1.2 ± 0.4	55 ± 6.3	29 ± 3.6	1.1 ± 0.2	0.4 ± 0.04	3.0 ± 0.6	1.5 ± 0.2	1 1	1 0	6

[0522]

<i>MW</i> <i>p</i> 值	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns			
VB										
假手 术	0.9 ± 0.2	54 ± 4.4	22 ± 1.6	1.4 ± 0.2	0.4 ± 0.03	4.2 ± 0.7	1.9 ± 0.2	1 5	7	7
<i>TBI</i>	1.0 ± 0.4	50 ± 4.6	21 ± 1.6	1.2 ± 0.1	0.5 ± 0.1	3.6 ± 0.5	1.8 ± 0.2	1 3	8	7
<i>MW</i> <i>p</i> 值	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns			
nRT										
假手 术	2.9 ± 0.6	32 ± 2.3	28 ± 1.8	0.7 ± 0.1	0.3 ± 0.03	1.7 ± 0.2	0.7 ± 0.1	1 1	6	6
<i>TBI</i>	1.9 ± 0.4	30 ± 2.0	22 ± 1.8	0.9 ± 0.1	0.3 ± 0.1	2.3 ± 0.3	1.0 ± 0.2	9	7	7
<i>MW</i> <i>p</i> 值	ns	ns	0.04	ns	ns	ns	ns			

[0523]

IPS C	频率 (Hz)	电荷 (pA x ms)	振幅 (pA)	半宽 (ms)	上升 时间 (ms)	衰减 时间 (ms)	Tau (ms)	细 胞	切 片	小 鼠
L5 pyr.										
假手 术	1.2 ± 0.2	471 ± 49	39 ± 2.7	6.1 ± 0.3	1.1 ± 0.1	21.1 ± 1.0	10.0 ± 0.4	1 9	8	6
<i>TBI</i>	1.3 ± 0.3	397 ± 36	36 ± 2.7	5.6 ± 0.3	1.2 ± 0.1	18.0 ± 1.2	8.4 ± 0.4	1 6	6	6
<i>MW</i> <i>p</i> 值	ns	ns	ns	ns	ns	0.04	0.02			
VB										
假手 术	2.4 ± 0.8	884 ± 360	47 ± 5.6	5.4 ± 0.4	1.2 ± 0.1	20 ± 3.8	12 ± 4.7	1 0	6	5
<i>TBI</i>	1.9 ± 0.4	566 ± 127	42 ± 5.1	6.6 ± 0.8	1.1 ± 0.1	24 ± 6.6	10 ± 2.9	1 1	5	4
<i>MW</i> <i>p</i> 值	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns			
nRT										
假手	0.9 ±	836 ±	21 ±	16 ±	1.3 ±	69 ±	55 ±	1	5	4

[0524]	术	0.2	103	2.7	2.1	0.1	9.0	6.0	3		
	<i>TBI</i>	0.6 ± 0.2	1144 ± 141	18 ± 1.6	30 ± 2.5	2.7 ± 0.4	79 ± 7.9	73 ± 3.5	2 2	9	6
	<i>MW</i> <i>p</i> 值	0.02	ns	ns	0.0003	0.0002	ns	0.04			

[0525] 实施例3:C1q中的慢性增加由丘脑中的小胶质细胞介导

[0526] 为了确定丘脑中C1q的细胞来源,我们在损伤后三周显微解剖了nRT和VB组织(图3A),并对来自假手术小鼠的6,228个细胞核和来自mTBI小鼠的5,220个细胞核进行了单核RNA测序(snRNA-seq),使我们能够从相同的制备物中稳健地捕获神经元和胶质细胞群,不需要分离伪影。在校正环境RNA并去除潜在的双体后,聚类分析鉴定了预期的细胞类型,包括小胶质细胞(Cx3cr1,P2ry12)、星形胶质细胞(Cldn10,Fgfr3)、少突胶质细胞(Mobp,Olig1)、少突胶质细胞祖细胞(Sox8,Pdgfra)、GABA能神经元(Gad1,Gad2)、和谷氨酸能神经元(Slc17a6,Slc17a7),其起源于邻近的丘脑皮层中继核(图3B,图8A)。假手术和mTBI样品之间的细胞组成相似(图8B-8C)。

[0527] 小胶质细胞表达高水平的C1qa、C1qb和C1qc,这三种基因共同编码C1q的18个亚单位(图3C,图9B)。然而,它们在核RNA中的表达在mTBI和假手术样品之间没有显著差异(图3D,图S3B),这与先前关于细胞质RNA中小胶质细胞活化编码的报道一致。假手术小鼠和TBI小鼠中的成熟少突胶质细胞和星形胶质细胞表达C4b,其在经典补体途径中作用于C1q的下游(图3E)。mTBI后核RNA中的C4b表达比少突胶质细胞的一个亚聚类中增加了5.2倍(图3F,图9C-9F),但在星形胶质细胞中没有显著增加。未检测到补体途径的其他组分的转录物,诸如C2和Hc(图9B,9H)。

[0528] 这些观察结果使小胶质细胞成为C1q蛋白的可能来源,但不能解释mTBI后丘脑中C1q的激增。为了解决这种差异,我们使用qRT-PCR检测了我们的细胞核制备物的大量细胞质级分中的C1qa mRNA。该分析显示,在mTBI后,丘脑和皮层中C1qa mRNA表达显著增加(图3G)。类似地,C4b表达在mTBI组小鼠体内的这两个区域上调,但其他补体分子诸如C3或Hc(C5)的表达没有上调(图3H,图9H)。

[0529] 总之,我们的结果表明小胶质细胞是mTBI小鼠中的慢性C1q水平升高的原因,并且C1q可能活化表达C4b的少突胶质细胞和星形胶质细胞。与这些观察结果一致,我们仅检测到TBI后小胶质细胞(Apoe,Cst3)和星形胶质细胞(Apoe,C1u)活化的少量标志物(图9A)。

[0530] 实施例4:mTBI导致nRT中线粒体基因表达的选择性变化

[0531] 由于我们已经检测到mTBI后nRT的突触异常和神经元损失,我们还研究了nRT GABA能神经元基因表达的潜在变化。GABA能神经元的聚类(Slc17a7和Slc17a6阴性,Gad2阳性,图10A)揭示了九个亚聚类(图10B),这些亚聚类的特征在于先前在nRT中报道的基因的表达(Pvalb,Sppl和Ecell1,Cacna1h和Cacna1e)。我们还观察到三个Pvalb阴性的聚类(亚聚类2、8和9,图10D-10F),这在先前使用Pvalb报道小鼠进行细胞选择的研究中会被遗漏。值得注意的是,亚聚类的相对大小在mTBI和假手术小鼠之间没有变化(图10C),表明nRT内缺乏选择性易损性。

[0532] 在任何GABA能亚聚类中,mTBI和假手术之间补体途径的组分没有差异表达。相反,

mTBI后在所有GABA能神经元中上调与线粒体功能和氧化磷酸化相关的几个基因(包括Cox6c和Cox5a)(图10G)。

[0533] 总的来说,这些数据支持nRT GABA能神经元的多个亚聚类的存在,这些亚聚类在关键标志物基因诸如Pvalb、Spp1和Ece11的表达上存在差异。这些观察证实mTBI后丘脑C1q的来源不是神经元。它们还表明线粒体是mTBI后GABA能nRT神经元中神经元损失或突触功能障碍的潜在介质。

[0534] 实施例5:阻断C1q功能减少了慢性神经胶质炎症和神经元损失

[0535] C1q表达增加是慢性的(图11A-11B),并且因此可以解释mTBI的长期效应。为了测试这一假设,我们使用了特异性结合至C1q并阻断其下游活性的抗体。在mTBI或假手术后24小时,给小鼠腹膜内注射C1q抗体或小鼠IgG1同种型对照,然后每周治疗两次,持续三周。

[0536] 如通过免疫荧光染色监测,相对于对照处理的mTBI小鼠,用抗C1q抗体处理的mTBI小鼠显示出炎症的强烈减少和神经元损失的减少(图4A-C),并且平均具有与抗体处理的假手术小鼠相同数量的nRT神经元(图4C)。用对照IgG治疗的mTBI小鼠在mTBI后三周仍显示炎症和神经元损失(图4)。作为抗体治疗的替代方法,我们使用C1q-/-小鼠重复了该研究,并且发现它们在TBI后也展现出慢性炎症减少和nRT中神经元损失减少(图12)。

[0537] 为了证实抗C1q抗体在大脑中而不是在外周发挥其作用,我们测量了其浓度以及C1q在大脑和血浆中的浓度(图13)。在抗体治疗的假手术和mTBI小鼠的脑中检测到游离的抗C1q抗体,在同侧的浓度(0.4-8.6ug/ml)略高于对侧的浓度(0.09-3.8ug/m)。这伴随着比未接受抗C1q抗体的假手术或mTBI小鼠更低的C1q浓度,最显著的是在同侧(图13C-13D)。这些观察结果强烈表明,抗C1q抗体阻止了mTBI后C1q的积累。接受抗体的假手术和mTBI小鼠的血浆中没有可检测量的C1q蛋白,无论是游离的还是抗体结合的,指示游离的C1q从循环中完全清除。

[0538] 这些结果指示了C1q可能导致mTBI中的炎症和神经元损失,并阻断大脑中C1q的积累减少了这些有害的影响。

[0539] 实施例6:TBI导致行为自由的小鼠中皮质状态和兴奋性的长期变化

[0540] 我们接下来使用脑节律作为体内皮质丘脑回路功能的读数研究了mTBI的纵向冲击。为此,我们在开颅术/mTBI诱导手术期间向假手术和mTBI小鼠植入了慢性无线皮层脑电图(EECoG)设备,将小鼠放回它们的居住笼中进行长期记录,并分析了mTBI后1、3和11周EECoG功率的变化(图5)。我们观察到,在光时期(图5C-5H)和暗时期,mTBI的宽频带功率都有慢性增加。

[0541] 随着时间的推移,严重的TBI已显示会导致癫痫发生,并且我们研究了mTBI是否也是如此。在mTBI后24小时和3周,我们使用先前报道的分类对不同类型的癫痫活动进行了量化,包括癫痫样棘波、癫痫放电、棘形和波形放电和自发局灶性或全身性发作。在最初的24小时内,16只mTBI小鼠中有3只出现全身性强直阵挛发作,但8只假手术小鼠中没有一只出现全身性强直阵挛发作(GTCS,表5)。在随后的时间点(长达三周),没有小鼠表现出GTCS(表5)。然而,在mTBI后三周,我们在mTBI小鼠(n=9)中看到比假手术小鼠(n=5)更多的癫痫样棘波,表明兴奋性增加(表5)。类似地,在另一个使用同步EECoG和多单位丘脑记录的记录设置中,mTBI小鼠在mTBI后早至一周到多达三周出现自发性癫痫样事件,包括同步丘脑爆发和归一化 θ 功率增加(图14)。

[0542] 我们推断mTBI通过增加早期发作的可能性和慢性时间点的宽频带ECoG功率,确实改变了皮质ECoG活动。

[0543] 表5.假手术、TBI、对照治疗的TBI和抗体治疗的TBI小鼠的癫痫样活动分析总结。从TBI的那天开始,一直到TBI之后的几个星期,对小鼠进行连续记录。手术和记录条件在题为“慢性ECoG记录设备的手术植入”的方法部分中描述。分析是在TBI后的前24小时内进行的,并在TBI后三周时的跨48小时窗口内进行。进行重复测量混合效应ANOVA用于统计分析。

[0544]

前 24 小时	癫痫样棘波	癫痫样放电	棘形和波形放电	全身性强直阵挛发作	急性损伤后死亡率
假手术	8/8 (100%)	6/8 (75%)	0/8 (0%)	0/8 (0%)	0/8 (0%)
TBI	16/16 (100%)	13/16 (81%)	4/16 (25%)	3/16 (19%)	0/16 (0%)
药物研究					
TBI 媒介物	7/7 (100%)	5/7 (71%)	0/7 (0%)	2/7 (28%)	0/7 (0%)
TBI 抗 Clq	7/7 (100%)	5/7 (71%)	0/7 (0%)	1/7 (14%)	0/7 (0%)
3 周	癫痫样棘波	癫痫样放电	棘形和波形放电	全身性强直阵挛发作	
假手术	7/7 (100%)	1/7 (14%)	0/7 (0%)	0/7 (0%)	
TBI	11/11 (100%)	3/11 (27%)	1/11 (9%)	0/11 (0%)	

[0545]	药物研究				
	<i>TBI</i> 媒介物	7/7 (100%)	2/7 (28%)	0/7 (0%)	0/7 (0%)
	<i>TBI</i> 抗 <i>C1q</i>	7/7 (100%)	3/7 (43%)	0/7 (0%)	0/7 (0%)
		癫痫样棘波	癫痫样放电	棘形和波形放电	全身性强直阵挛发作
	假手术-24 小时	234 ± 62	4 ± 2	0	8
	<i>TBI</i> -24 小时	452 ± 178	8 ± 6	1 ± 0.6	0.4 ± 0.2
	假手术-3 周	66 ± 38	0.7 ± 0.7	0	7
	<i>TBI</i> -3 周	292 ± 114	2 ± 1	0.09 ± 0.09	0
	混合效应分析	ns	ns	ns	ns
	药物研究				
	<i>TBI</i> 媒介物-24 小时	278 ± 79	4 ± 1	0	0.6 ± 0.4
	<i>TBI</i> 抗 <i>C1q</i> -24 小时	137 ± 55	1 ± 0.5	0	0.3 ± 0.3
	<i>TBI</i> 媒介物-3 周	300 ± 92	0.3 ± 0.2	0	0
	<i>TBI</i> 抗 <i>C1q</i> -3 周	274 ± 50	1 ± 0.8	0	0
	混合效应分析	ns	ns	ns	ns

[0546] 实施例7:抗C1q抗体预防患有TBI病的小鼠中的慢性皮质状态的变化

[0547] 为了确定阻断C1q是否可以挽救皮质状态的变化,我们用抗C1q抗体或同种型对照治疗小鼠五周,从mTBI后24小时开始,同时在mTBI后保持ECoG记录长达9-15周(图6A,图15)。在抗C1q抗体或对照治疗的第一周内,ECoG光谱特征是相似的(图6B-6C,图15B)。在第三周,抗C1q组在大多数频率频带都有降低功率的趋势(图6D-6E,图15C),但此降低并非统计上显著。

[0548] 值得注意的是,癫痫样活动不受抗C1q抗体的影响(表5)。mTBI后三周,我们没有发现GTCS,并且在对照治疗和抗体治疗的mTBI小鼠之间癫痫事件的频率没有差异(表5)。

[0549] 这些结果综合起来表明,在TBI损害后阻断C1q可以防止小鼠皮质状态的继发性变化。

[0550] 实施例8:mTBI导致睡眠梭状波损失和癫痫棘波增加,这可通过抗C1q治疗来预防

[0551] 接下来,我们使用脑节律作为皮质丘脑回路功能的读数,研究了体内mTBI的影响。为此,我们在开颅术/mTBI诱导手术期间向假手术和mTBI小鼠植入了慢性无线皮层脑电图(ECoG)设备,将小鼠放回它们的居住笼进行长期记录,并在术后三周的12小时窗口内分析了ECoG节律的变化(图16)。鉴于nRT是小鼠体内非快速眼动睡眠(NREMS)期间感觉皮层特异

性睡眠梭状波的来源,我们将分析集中在睡眠梭状波上。手术后三周,假手术小鼠的左右感觉皮层中的睡眠梭状波数量相似,但在mTBI小鼠中,损伤同侧的皮层比对侧的皮层显示出较少的睡眠梭状波(图16A-16D)。mTBI小鼠在损伤的同侧也有局灶性癫痫棘波(图16A-16D)。接下来,为了确定阻断C1q是否可以防止这些变化,我们在mTBI后24小时开始用抗C1q抗体或同种型对照治疗小鼠,并分析mTBI后三周的ECoG。用抗C1q抗体治疗的小鼠表现出正常数量的睡眠梭状波(图16B、16D、16E),并且癫痫棘波比用同种型对照治疗的小鼠少(图17B-17F)。这些结果表明,mTBI导致mTBI周围皮层中睡眠梭状波的损失,并引起癫痫棘波,并且在mTBI后阻断C1q介导的途径可以防止这两种结果。

[0552] 通过引用并入

[0553] 本文提及的所有出版物、专利和专利申请在此通过引用以其整体并入,如同特别地且单独地指出将每个单独的出版物、专利或专利申请通过引用并入一样。如有冲突,则以本申请(包括本文的任何定义)为准。

[0554] 等效方案

[0555] 本领域技术人员仅仅使用常规试验将认识到或者能够确定本文所描述的发明的具体实施方案的许多等效方案。此类等效物意图由以下权利要求涵盖。

[0001]	序列表															
[0002]	<110> 安尼艾克松股份有限公司(ANNEXON, INC.)															
[0003]	J·大卫格莱斯顿研究所-根据J·大卫格莱斯顿遗嘱的遗嘱信托 (THE J. DAVID GLADSTONE INSTITUTES, A TESTAMENTARY TRUST															
[0004]	ESTABLISHED UNDER THE WILL OF J. DAVID GLADSTONE)															
[0005]	<120> 用于治疗癫痫的组合物和方法															
[0006]	<130> ANH-01025															
[0007]	<140>															
[0008]	<141>															
[0009]	<150> 63/020,245															
[0010]	<151> 2020-05-05															
[0011]	<160> 86															
[0012]	<170> PatentIn version 3.5															
[0013]	<210> 1															
[0014]	<211> 245															
[0015]	<212> PRT															
[0016]	<213> 智人(Homo sapiens)															
[0017]	<400> 1															
[0018]	Met	Glu	Gly	Pro	Arg	Gly	Trp	Leu	Val	Leu	Cys	Val	Leu	Ala	Ile	Ser
[0019]	1				5					10					15	
[0020]	Leu	Ala	Ser	Met	Val	Thr	Glu	Asp	Leu	Cys	Arg	Ala	Pro	Asp	Gly	Lys
[0021]					20					25					30	
[0022]	Lys	Gly	Glu	Ala	Gly	Arg	Pro	Gly	Arg	Arg	Gly	Arg	Pro	Gly	Leu	Lys
[0023]					35					40					45	
[0024]	Gly	Glu	Gln	Gly	Glu	Pro	Gly	Ala	Pro	Gly	Ile	Arg	Thr	Gly	Ile	Gln
[0025]					50					55					60	
[0026]	Gly	Leu	Lys	Gly	Asp	Gln	Gly	Glu	Pro	Gly	Pro	Ser	Gly	Asn	Pro	Gly
[0027]	65					70					75					80
[0028]	Lys	Val	Gly	Tyr	Pro	Gly	Pro	Ser	Gly	Pro	Leu	Gly	Ala	Arg	Gly	Ile
[0029]					85						90					95
[0030]	Pro	Gly	Ile	Lys	Gly	Thr	Lys	Gly	Ser	Pro	Gly	Asn	Ile	Lys	Asp	Gln
[0031]					100						105					110
[0032]	Pro	Arg	Pro	Ala	Phe	Ser	Ala	Ile	Arg	Arg	Asn	Pro	Pro	Met	Gly	Gly
[0033]					115						120					125
[0034]	Asn	Val	Val	Ile	Phe	Asp	Thr	Val	Ile	Thr	Asn	Gln	Glu	Glu	Pro	Tyr
[0035]					130						135					140
[0036]	Gln	Asn	His	Ser	Gly	Arg	Phe	Val	Cys	Thr	Val	Pro	Gly	Tyr	Tyr	Tyr
[0037]	145					150					155					160

[0038]	Phe Thr Phe Gln Val Leu Ser Gln Trp Glu Ile Cys Leu Ser Ile Val
[0039]	165 170 175
[0040]	Ser Ser Ser Arg Gly Gln Val Arg Arg Ser Leu Gly Phe Cys Asp Thr
[0041]	180 185 190
[0042]	Thr Asn Lys Gly Leu Phe Gln Val Val Ser Gly Gly Met Val Leu Gln
[0043]	195 200 205
[0044]	Leu Gln Gln Gly Asp Gln Val Trp Val Glu Lys Asp Pro Lys Lys Gly
[0045]	210 215 220
[0046]	His Ile Tyr Gln Gly Ser Glu Ala Asp Ser Val Phe Ser Gly Phe Leu
[0047]	225 230 235 240
[0048]	Ile Phe Pro Ser Ala
[0049]	245
[0050]	<210> 2
[0051]	<211> 253
[0052]	<212> PRT
[0053]	<213> 智人(Homo sapiens)
[0054]	<400> 2
[0055]	Met Met Met Lys Ile Pro Trp Gly Ser Ile Pro Val Leu Met Leu Leu
[0056]	1 5 10 15
[0057]	Leu Leu Leu Gly Leu Ile Asp Ile Ser Gln Ala Gln Leu Ser Cys Thr
[0058]	20 25 30
[0059]	Gly Pro Pro Ala Ile Pro Gly Ile Pro Gly Ile Pro Gly Thr Pro Gly
[0060]	35 40 45
[0061]	Pro Asp Gly Gln Pro Gly Thr Pro Gly Ile Lys Gly Glu Lys Gly Leu
[0062]	50 55 60
[0063]	Pro Gly Leu Ala Gly Asp His Gly Glu Phe Gly Glu Lys Gly Asp Pro
[0064]	65 70 75 80
[0065]	Gly Ile Pro Gly Asn Pro Gly Lys Val Gly Pro Lys Gly Pro Met Gly
[0066]	85 90 95
[0067]	Pro Lys Gly Gly Pro Gly Ala Pro Gly Ala Pro Gly Pro Lys Gly Glu
[0068]	100 105 110
[0069]	Ser Gly Asp Tyr Lys Ala Thr Gln Lys Ile Ala Phe Ser Ala Thr Arg
[0070]	115 120 125
[0071]	Thr Ile Asn Val Pro Leu Arg Arg Asp Gln Thr Ile Arg Phe Asp His
[0072]	130 135 140
[0073]	Val Ile Thr Asn Met Asn Asn Asn Tyr Glu Pro Arg Ser Gly Lys Phe
[0074]	145 150 155 160
[0075]	Thr Cys Lys Val Pro Gly Leu Tyr Tyr Phe Thr Tyr His Ala Ser Ser
[0076]	165 170 175

[0077]	Arg Gly Asn Leu Cys Val Asn Leu Met Arg Gly Arg Glu Arg Ala Gln
[0078]	180 185 190
[0079]	Lys Val Val Thr Phe Cys Asp Tyr Ala Tyr Asn Thr Phe Gln Val Thr
[0080]	195 200 205
[0081]	Thr Gly Gly Met Val Leu Lys Leu Glu Gln Gly Glu Asn Val Phe Leu
[0082]	210 215 220
[0083]	Gln Ala Thr Asp Lys Asn Ser Leu Leu Gly Met Glu Gly Ala Asn Ser
[0084]	225 230 235 240
[0085]	Ile Phe Ser Gly Phe Leu Leu Phe Pro Asp Met Glu Ala
[0086]	245 250
[0087]	<210> 3
[0088]	<211> 245
[0089]	<212> PRT
[0090]	<213> 智人(Homo sapiens)
[0091]	<400> 3
[0092]	Met Asp Val Gly Pro Ser Ser Leu Pro His Leu Gly Leu Lys Leu Leu
[0093]	1 5 10 15
[0094]	Leu Leu Leu Leu Leu Leu Pro Leu Arg Gly Gln Ala Asn Thr Gly Cys
[0095]	20 25 30
[0096]	Tyr Gly Ile Pro Gly Met Pro Gly Leu Pro Gly Ala Pro Gly Lys Asp
[0097]	35 40 45
[0098]	Gly Tyr Asp Gly Leu Pro Gly Pro Lys Gly Glu Pro Gly Ile Pro Ala
[0099]	50 55 60
[0100]	Ile Pro Gly Ile Arg Gly Pro Lys Gly Gln Lys Gly Glu Pro Gly Leu
[0101]	65 70 75 80
[0102]	Pro Gly His Pro Gly Lys Asn Gly Pro Met Gly Pro Pro Gly Met Pro
[0103]	85 90 95
[0104]	Gly Val Pro Gly Pro Met Gly Ile Pro Gly Glu Pro Gly Glu Glu Gly
[0105]	100 105 110
[0106]	Arg Tyr Lys Gln Lys Phe Gln Ser Val Phe Thr Val Thr Arg Gln Thr
[0107]	115 120 125
[0108]	His Gln Pro Pro Ala Pro Asn Ser Leu Ile Arg Phe Asn Ala Val Leu
[0109]	130 135 140
[0110]	Thr Asn Pro Gln Gly Asp Tyr Asp Thr Ser Thr Gly Lys Phe Thr Cys
[0111]	145 150 155 160
[0112]	Lys Val Pro Gly Leu Tyr Tyr Phe Val Tyr His Ala Ser His Thr Ala
[0113]	165 170 175
[0114]	Asn Leu Cys Val Leu Leu Tyr Arg Ser Gly Val Lys Val Val Thr Phe
[0115]	180 185 190

[0116]	Cys Gly His Thr Ser Lys Thr Asn Gln Val Asn Ser Gly Gly Val Leu
[0117]	195 200 205
[0118]	Leu Arg Leu Gln Val Gly Glu Glu Val Trp Leu Ala Val Asn Asp Tyr
[0119]	210 215 220
[0120]	Tyr Asp Met Val Gly Ile Gln Gly Ser Asp Ser Val Phe Ser Gly Phe
[0121]	225 230 235 240
[0122]	Leu Leu Phe Pro Asp
[0123]	245
[0124]	<210> 4
[0125]	<211> 107
[0126]	<212> PRT
[0127]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0128]	<220>
[0129]	<223> 人工序列的描述:合成
[0130]	多肽
[0131]	<400> 4
[0132]	Asp Val Gln Ile Thr Gln Ser Pro Ser Tyr Leu Ala Ala Ser Pro Gly
[0133]	1 5 10 15
[0134]	Glu Thr Ile Thr Ile Asn Cys Arg Ala Ser Lys Ser Ile Asn Lys Tyr
[0135]	20 25 30
[0136]	Leu Ala Trp Tyr Gln Glu Lys Pro Gly Lys Thr Asn Lys Leu Leu Ile
[0137]	35 40 45
[0138]	Tyr Ser Gly Ser Thr Leu Gln Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly
[0139]	50 55 60
[0140]	Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
[0141]	65 70 75 80
[0142]	Glu Asp Phe Ala Met Tyr Tyr Cys Gln Gln His Asn Glu Tyr Pro Leu
[0143]	85 90 95
[0144]	Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
[0145]	100 105
[0146]	<210> 5
[0147]	<211> 11
[0148]	<212> PRT
[0149]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0150]	<220>
[0151]	<223> 人工序列的描述:合成
[0152]	肽
[0153]	<400> 5
[0154]	Arg Ala Ser Lys Ser Ile Asn Lys Tyr Leu Ala

[0155]	1	5	10
[0156]	<210> 6		
[0157]	<211> 7		
[0158]	<212> PRT		
[0159]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)		
[0160]	<220>		
[0161]	<223> 人工序列的描述:合成		
[0162]	肽		
[0163]	<400> 6		
[0164]	Ser Gly Ser Thr Leu Gln Ser		
[0165]	1	5	
[0166]	<210> 7		
[0167]	<211> 9		
[0168]	<212> PRT		
[0169]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)		
[0170]	<220>		
[0171]	<223> 人工序列的描述:合成		
[0172]	肽		
[0173]	<400> 7		
[0174]	Gln Gln His Asn Glu Tyr Pro Leu Thr		
[0175]	1	5	
[0176]	<210> 8		
[0177]	<211> 121		
[0178]	<212> PRT		
[0179]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)		
[0180]	<220>		
[0181]	<223> 人工序列的描述:合成		
[0182]	多肽		
[0183]	<400> 8		
[0184]	Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala		
[0185]	1	5	10 15
[0186]	Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ser Ser Gly Tyr His Phe Thr Ser Tyr		
[0187]	20 25 30		
[0188]	Trp Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile		
[0189]	35 40 45		
[0190]	Gly Val Ile His Pro Asn Ser Gly Ser Ile Asn Tyr Asn Glu Lys Phe		
[0191]	50 55 60		
[0192]	Glu Ser Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr		
[0193]	65	70	75 80

[0194]	Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
[0195]	85 90 95
[0196]	Ala Gly Glu Arg Asp Ser Thr Glu Val Leu Pro Met Asp Tyr Trp Gly
[0197]	100 105 110
[0198]	Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
[0199]	115 120
[0200]	<210> 9
[0201]	<211> 10
[0202]	<212> PRT
[0203]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0204]	<220>
[0205]	<223> 人工序列的描述:合成
[0206]	肽
[0207]	<400> 9
[0208]	Gly Tyr His Phe Thr Ser Tyr Trp Met His
[0209]	1 5 10
[0210]	<210> 10
[0211]	<211> 17
[0212]	<212> PRT
[0213]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0214]	<220>
[0215]	<223> 人工序列的描述:合成
[0216]	肽
[0217]	<400> 10
[0218]	Val Ile His Pro Asn Ser Gly Ser Ile Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Glu
[0219]	1 5 10 15
[0220]	Ser
[0221]	<210> 11
[0222]	<211> 12
[0223]	<212> PRT
[0224]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0225]	<220>
[0226]	<223> 人工序列的描述:合成
[0227]	肽
[0228]	<400> 11
[0229]	Glu Arg Asp Ser Thr Glu Val Leu Pro Met Asp Tyr
[0230]	1 5 10
[0231]	<210> 12
[0232]	<211> 321

- [0233] <212> DNA
- [0234] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0235] <220>
- [0236] <223> 人工序列的描述:合成
- [0237] 多核苷酸
- [0238] <400> 12
- [0239] gatgtccaga taacccagtc tccatcttat cttgctgcat ctccctggaga aaccattact 60
- [0240] attaatgca gggcaagtaa gagcattaac aaatatttag cctggtatca agagaaacct 120
- [0241] gggaaaacta ataagcttct tatctactct ggatccactt tgcaatctgg aattccatca 180
- [0242] aggttcagtg gcagtgatc tggtagatc ttactctca ccatcagtag cctggagcct 240
- [0243] gaagattttg caatgtatta ctgtcaaca cataatgaat acccgctcac gttcggtgct 300
- [0244] gggaccaagc tggagctgaa a 321
- [0245] <210> 13
- [0246] <211> 363
- [0247] <212> DNA
- [0248] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0249] <220>
- [0250] <223> 人工序列的描述:合成
- [0251] 多核苷酸
- [0252] <400> 13
- [0253] caggtccaac tgcagcagcc tggggctgag ctggtaaagc ctggggcttc agtgaagttg 60
- [0254] tcctgcaagt cttctggcta ccatttcacc agctactgga tgcactgggt gaagcagagg 120
- [0255] cctggacaag gccttgagtg gattggagtg attcatccta atagtggtag tattaactac 180
- [0256] aatgagaagt tcgagagcaa ggccacactg actgtagaca aatcctccag cacagcctac 240
- [0257] atgcaactca gcagcctgac atctgaggac tcggcggtct attattgtgc aggagagaga 300
- [0258] gattctacgg aggttctccc tatggactac tggggctcaag gaacctcagt caccgtctcc 360
- [0259] tca 363
- [0260] <210> 14
- [0261] <400> 14
- [0262] 000
- [0263] <210> 15
- [0264] <400> 15
- [0265] 000
- [0266] <210> 16
- [0267] <211> 31
- [0268] <212> PRT
- [0269] <213> 智人(Homo sapiens)
- [0270] <400> 16
- [0271] Gly Leu Phe Gln Val Val Ser Gly Gly Met Val Leu Gln Leu Gln Gln

[0272]	1	5	10	15
[0273]	Gly Asp Gln Val Trp Val Glu Lys Asp Pro Lys Lys Gly His Ile			
[0274]	20	25	30	
[0275]	<210> 17			
[0276]	<211> 26			
[0277]	<212> PRT			
[0278]	<213> 智人 (Homo sapiens)			
[0279]	<400> 17			
[0280]	Gly Leu Phe Gln Val Val Ser Gly Gly Met Val Leu Gln Leu Gln Gln			
[0281]	1	5	10	15
[0282]	Gly Asp Gln Val Trp Val Glu Lys Asp Pro			
[0283]	20	25		
[0284]	<210> 18			
[0285]	<211> 20			
[0286]	<212> PRT			
[0287]	<213> 智人 (Homo sapiens)			
[0288]	<400> 18			
[0289]	Ser Gly Gly Met Val Leu Gln Leu Gln Gln Gly Asp Gln Val Trp Val			
[0290]	1	5	10	15
[0291]	Glu Lys Asp Pro			
[0292]	20			
[0293]	<210> 19			
[0294]	<211> 18			
[0295]	<212> PRT			
[0296]	<213> 智人 (Homo sapiens)			
[0297]	<400> 19			
[0298]	Ser Gly Gly Met Val Leu Gln Leu Gln Gln Gly Asp Gln Val Trp Val			
[0299]	1	5	10	15
[0300]	Glu Lys			
[0301]	<210> 20			
[0302]	<211> 23			
[0303]	<212> PRT			
[0304]	<213> 智人 (Homo sapiens)			
[0305]	<400> 20			
[0306]	Trp Leu Ala Val Asn Asp Tyr Tyr Asp Met Val Gly Ile Gln Gly Ser			
[0307]	1	5	10	15
[0308]	Asp Ser Val Phe Ser Gly Phe			
[0309]	20			
[0310]	<210> 21			

[0311]	<211>	16
[0312]	<212>	PRT
[0313]	<213>	智人(Homo sapiens)
[0314]	<400>	21
[0315]	Tyr Asp Met Val Gly Ile Gln Gly Ser Asp Ser Val Phe Ser Gly Phe	
[0316]	1	5 10 15
[0317]	<210>	22
[0318]	<211>	8
[0319]	<212>	PRT
[0320]	<213>	智人(Homo sapiens)
[0321]	<400>	22
[0322]	Tyr Asp Met Val Gly Ile Gln Gly	
[0323]	1	5
[0324]	<210>	23
[0325]	<211>	23
[0326]	<212>	PRT
[0327]	<213>	智人(Homo sapiens)
[0328]	<400>	23
[0329]	His Thr Ala Asn Leu Cys Val Leu Leu Tyr Arg Ser Gly Val Lys Val	
[0330]	1	5 10 15
[0331]	Val Thr Phe Cys Gly His Thr	
[0332]		20
[0333]	<210>	24
[0334]	<211>	9
[0335]	<212>	PRT
[0336]	<213>	智人(Homo sapiens)
[0337]	<400>	24
[0338]	Arg Ser Gly Val Lys Val Val Thr Phe	
[0339]	1	5
[0340]	<210>	25
[0341]	<400>	25
[0342]	000	
[0343]	<210>	26
[0344]	<400>	26
[0345]	000	
[0346]	<210>	27
[0347]	<400>	27
[0348]	000	
[0349]	<210>	28

[0350] <400> 28
 [0351] 000
 [0352] <210> 29
 [0353] <400> 29
 [0354] 000
 [0355] <210> 30
 [0356] <400> 30
 [0357] 000
 [0358] <210> 31
 [0359] <211> 121
 [0360] <212> PRT
 [0361] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 [0362] <220>
 [0363] <223> 人工序列的描述:合成
 [0364] 多肽
 [0365] <400> 31
 [0366] Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Leu Lys Lys Pro Gly Ala
 [0367] 1 5 10 15
 [0368] Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ser Ser Gly Tyr His Phe Thr Ser Tyr
 [0369] 20 25 30
 [0370] Trp Met His Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 [0371] 35 40 45
 [0372] Gly Val Ile His Pro Asn Ser Gly Ser Ile Asn Tyr Asn Glu Lys Phe
 [0373] 50 55 60
 [0374] Glu Ser Lys Ala Thr Ile Thr Val Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 [0375] 65 70 75 80
 [0376] Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 [0377] 85 90 95
 [0378] Ala Gly Glu Arg Asp Ser Thr Glu Val Leu Pro Met Asp Tyr Trp Gly
 [0379] 100 105 110
 [0380] Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
 [0381] 115 120
 [0382] <210> 32
 [0383] <211> 121
 [0384] <212> PRT
 [0385] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 [0386] <220>
 [0387] <223> 人工序列的描述:合成
 [0388] 多肽

[0389] <400> 32
 [0390] Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Leu Lys Lys Pro Gly Ala
 [0391] 1 5 10 15
 [0392] Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ser Ser Gly Tyr His Phe Thr Ser Tyr
 [0393] 20 25 30
 [0394] Trp Met His Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 [0395] 35 40 45
 [0396] Gly Val Ile His Pro Asn Ser Gly Ser Ile Asn Tyr Asn Glu Lys Phe
 [0397] 50 55 60
 [0398] Glu Ser Arg Ala Thr Ile Thr Val Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 [0399] 65 70 75 80
 [0400] Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 [0401] 85 90 95
 [0402] Ala Gly Glu Arg Asp Ser Thr Glu Val Leu Pro Met Asp Tyr Trp Gly
 [0403] 100 105 110
 [0404] Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 [0405] 115 120
 [0406] <210> 33
 [0407] <211> 121
 [0408] <212> PRT
 [0409] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 [0410] <220>
 [0411] <223> 人工序列的描述:合成
 [0412] 多肽
 [0413] <400> 33
 [0414] Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Leu Lys Lys Pro Gly Ala
 [0415] 1 5 10 15
 [0416] Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ser Ser Gly Tyr His Phe Thr Ser Tyr
 [0417] 20 25 30
 [0418] Trp Met His Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 [0419] 35 40 45
 [0420] Gly Val Ile His Pro Asn Ser Gly Ser Ile Asn Tyr Asn Glu Lys Phe
 [0421] 50 55 60
 [0422] Glu Ser Arg Val Thr Ile Thr Val Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 [0423] 65 70 75 80
 [0424] Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 [0425] 85 90 95
 [0426] Ala Gly Glu Arg Asp Ser Thr Glu Val Leu Pro Met Asp Tyr Trp Gly
 [0427] 100 105 110

[0428] Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 [0429] 115 120
 [0430] <210> 34
 [0431] <211> 121
 [0432] <212> PRT
 [0433] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 [0434] <220>
 [0435] <223> 人工序列的描述:合成
 [0436] 多肽
 [0437] <400> 34
 [0438] Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Leu Lys Lys Pro Gly Ala
 [0439] 1 5 10 15
 [0440] Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ser Ser Gly Tyr His Phe Thr Ser Tyr
 [0441] 20 25 30
 [0442] Trp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 [0443] 35 40 45
 [0444] Gly Val Ile His Pro Asn Ser Gly Ser Ile Asn Tyr Asn Glu Lys Phe
 [0445] 50 55 60
 [0446] Glu Ser Arg Val Thr Ile Thr Val Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 [0447] 65 70 75 80
 [0448] Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 [0449] 85 90 95
 [0450] Ala Gly Glu Arg Asp Ser Thr Glu Val Leu Pro Met Asp Tyr Trp Gly
 [0451] 100 105 110
 [0452] Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 [0453] 115 120
 [0454] <210> 35
 [0455] <211> 107
 [0456] <212> PRT
 [0457] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 [0458] <220>
 [0459] <223> 人工序列的描述:合成
 [0460] 多肽
 [0461] <400> 35
 [0462] Asp Val Gln Ile Thr Gln Ser Pro Ser Tyr Leu Ala Ala Ser Leu Gly
 [0463] 1 5 10 15
 [0464] Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Arg Ala Ser Lys Ser Ile Asn Lys Tyr
 [0465] 20 25 30
 [0466] Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Thr Asn Lys Leu Leu Ile

[0467]	35	40	45
[0468]	Tyr Ser Gly Ser Thr Leu Gln Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly		
[0469]	50	55	60
[0470]	Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro		
[0471]	65	70	75
[0472]	Glu Asp Phe Ala Met Tyr Tyr Cys Gln Gln His Asn Glu Tyr Pro Leu		
[0473]	85	90	95
[0474]	Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys		
[0475]	100	105	
[0476]	<210> 36		
[0477]	<211> 107		
[0478]	<212> PRT		
[0479]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)		
[0480]	<220>		
[0481]	<223> 人工序列的描述:合成		
[0482]	多肽		
[0483]	<400> 36		
[0484]	Asp Val Gln Ile Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly		
[0485]	1	5	10
[0486]	Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Arg Ala Ser Lys Ser Ile Asn Lys Tyr		
[0487]	20	25	30
[0488]	Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Asn Lys Leu Leu Ile		
[0489]	35	40	45
[0490]	Tyr Ser Gly Ser Thr Leu Gln Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly		
[0491]	50	55	60
[0492]	Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro		
[0493]	65	70	75
[0494]	Glu Asp Phe Ala Met Tyr Tyr Cys Gln Gln His Asn Glu Tyr Pro Leu		
[0495]	85	90	95
[0496]	Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys		
[0497]	100	105	
[0498]	<210> 37		
[0499]	<211> 107		
[0500]	<212> PRT		
[0501]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)		
[0502]	<220>		
[0503]	<223> 人工序列的描述:合成		
[0504]	多肽		
[0505]	<400> 37		

[0506]	Asp Val Gln Ile Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly
[0507]	1 5 10 15
[0508]	Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Arg Ala Ser Lys Ser Ile Asn Lys Tyr
[0509]	20 25 30
[0510]	Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
[0511]	35 40 45
[0512]	Tyr Ser Gly Ser Thr Leu Gln Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
[0513]	50 55 60
[0514]	Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
[0515]	65 70 75 80
[0516]	Glu Asp Phe Ala Met Tyr Tyr Cys Gln Gln His Asn Glu Tyr Pro Leu
[0517]	85 90 95
[0518]	Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
[0519]	100 105
[0520]	<210> 38
[0521]	<211> 107
[0522]	<212> PRT
[0523]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0524]	<220>
[0525]	<223> 人工序列的描述:合成
[0526]	多肽
[0527]	<400> 38
[0528]	Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly
[0529]	1 5 10 15
[0530]	Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Arg Ala Ser Lys Ser Ile Asn Lys Tyr
[0531]	20 25 30
[0532]	Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
[0533]	35 40 45
[0534]	Tyr Ser Gly Ser Thr Leu Gln Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
[0535]	50 55 60
[0536]	Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
[0537]	65 70 75 80
[0538]	Glu Asp Phe Ala Met Tyr Tyr Cys Gln Gln His Asn Glu Tyr Pro Leu
[0539]	85 90 95
[0540]	Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
[0541]	100 105
[0542]	<210> 39
[0543]	<211> 229
[0544]	<212> PRT

[0545] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 [0546] <220>
 [0547] <223> 人工序列的描述:合成
 [0548] 多肽
 [0549] <400> 39
 [0550] Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Leu Lys Lys Pro Gly Ala
 [0551] 1 5 10 15
 [0552] Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ser Ser Gly Tyr His Phe Thr Ser Tyr
 [0553] 20 25 30
 [0554] Trp Met His Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 [0555] 35 40 45
 [0556] Gly Val Ile His Pro Asn Ser Gly Ser Ile Asn Tyr Asn Glu Lys Phe
 [0557] 50 55 60
 [0558] Glu Ser Arg Val Thr Ile Thr Val Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 [0559] 65 70 75 80
 [0560] Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 [0561] 85 90 95
 [0562] Ala Gly Glu Arg Asp Ser Thr Glu Val Leu Pro Met Asp Tyr Trp Gly
 [0563] 100 105 110
 [0564] Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
 [0565] 115 120 125
 [0566] Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
 [0567] 130 135 140
 [0568] Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
 [0569] 145 150 155 160
 [0570] Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
 [0571] 165 170 175
 [0572] Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
 [0573] 180 185 190
 [0574] Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
 [0575] 195 200 205
 [0576] Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
 [0577] 210 215 220
 [0578] Asp Lys Thr His Thr
 [0579] 225
 [0580] <210> 40
 [0581] <211> 214
 [0582] <212> PRT
 [0583] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0584]	<220>
[0585]	<223> 人工序列的描述:合成
[0586]	多肽
[0587]	<400> 40
[0588]	Asp Val Gln Ile Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly
[0589]	1 5 10 15
[0590]	Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Arg Ala Ser Lys Ser Ile Asn Lys Tyr
[0591]	20 25 30
[0592]	Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
[0593]	35 40 45
[0594]	Tyr Ser Gly Ser Thr Leu Gln Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
[0595]	50 55 60
[0596]	Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
[0597]	65 70 75 80
[0598]	Glu Asp Phe Ala Met Tyr Tyr Cys Gln Gln His Asn Glu Tyr Pro Leu
[0599]	85 90 95
[0600]	Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
[0601]	100 105 110
[0602]	Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
[0603]	115 120 125
[0604]	Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
[0605]	130 135 140
[0606]	Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
[0607]	145 150 155 160
[0608]	Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
[0609]	165 170 175
[0610]	Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
[0611]	180 185 190
[0612]	Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
[0613]	195 200 205
[0614]	Phe Asn Arg Gly Glu Cys
[0615]	210
[0616]	<210> 41
[0617]	<400> 41
[0618]	000
[0619]	<210> 42
[0620]	<400> 42
[0621]	000
[0622]	<210> 43

[0623]	<400>	43
[0624]	000	
[0625]	<210>	44
[0626]	<400>	44
[0627]	000	
[0628]	<210>	45
[0629]	<400>	45
[0630]	000	
[0631]	<210>	46
[0632]	<400>	46
[0633]	000	
[0634]	<210>	47
[0635]	<211>	327
[0636]	<212>	PRT
[0637]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)
[0638]	<220>	
[0639]	<223>	人工序列的描述:合成
[0640]	多肽	
[0641]	<400>	47
[0642]	Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg	
[0643]	1 5 10 15	
[0644]	Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr	
[0645]	20 25 30	
[0646]	Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser	
[0647]	35 40 45	
[0648]	Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser	
[0649]	50 55 60	
[0650]	Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr	
[0651]	65 70 75 80	
[0652]	Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys	
[0653]	85 90 95	
[0654]	Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro	
[0655]	100 105 110	
[0656]	Glu Phe Glu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys	
[0657]	115 120 125	
[0658]	Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val	
[0659]	130 135 140	
[0660]	Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp	
[0661]	145 150 155 160	

[0662]	Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe
[0663]	165 170 175
[0664]	Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
[0665]	180 185 190
[0666]	Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu
[0667]	195 200 205
[0668]	Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
[0669]	210 215 220
[0670]	Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys
[0671]	225 230 235 240
[0672]	Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
[0673]	245 250 255
[0674]	Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
[0675]	260 265 270
[0676]	Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
[0677]	275 280 285
[0678]	Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser
[0679]	290 295 300
[0680]	Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
[0681]	305 310 315 320
[0682]	Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
[0683]	325
[0684]	<210> 48
[0685]	<400> 48
[0686]	000
[0687]	<210> 49
[0688]	<400> 49
[0689]	000
[0690]	<210> 50
[0691]	<400> 50
[0692]	000
[0693]	<210> 51
[0694]	<211> 12
[0695]	<212> PRT
[0696]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0697]	<220>
[0698]	<223> 人工序列的描述:合成
[0699]	肽
[0700]	<400> 51

[0701]	Ser Ser Val Ser Ser Ser Tyr Leu His Trp Tyr Gln
[0702]	1 5 10
[0703]	<210> 52
[0704]	<211> 10
[0705]	<212> PRT
[0706]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0707]	<220>
[0708]	<223> 人工序列的描述:合成
[0709]	肽
[0710]	<400> 52
[0711]	Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro
[0712]	1 5 10
[0713]	<210> 53
[0714]	<211> 10
[0715]	<212> PRT
[0716]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0717]	<220>
[0718]	<223> 人工序列的描述:合成
[0719]	肽
[0720]	<400> 53
[0721]	His Gln Tyr Tyr Arg Leu Pro Pro Ile Thr
[0722]	1 5 10
[0723]	<210> 54
[0724]	<211> 12
[0725]	<212> PRT
[0726]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0727]	<220>
[0728]	<223> 人工序列的描述:合成
[0729]	肽
[0730]	<400> 54
[0731]	Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr Ala Met Ser Trp Val
[0732]	1 5 10
[0733]	<210> 55
[0734]	<211> 10
[0735]	<212> PRT
[0736]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0737]	<220>
[0738]	<223> 人工序列的描述:合成
[0739]	肽

[0779] <220>
 [0780] <223> 人工序列的描述:合成
 [0781] 多肽
 [0782] <400> 58
 [0783] Gln Val Lys Leu Glu Glu Ser Gly Gly Ala Leu Val Lys Pro Gly Gly
 [0784] 1 5 10 15
 [0785] Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr
 [0786] 20 25 30
 [0787] Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ile Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val
 [0788] 35 40 45
 [0789] Ala Thr Ile Ser Ser Gly Gly Ser His Thr Tyr Tyr Leu Asp Ser Val
 [0790] 50 55 60
 [0791] Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Arg Asp Thr Leu Tyr
 [0792] 65 70 75 80
 [0793] Leu Gln Met Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
 [0794] 85 90 95
 [0795] Ala Arg Leu Phe Thr Gly Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 [0796] 100 105 110
 [0797] Ser Val Thr
 [0798] 115
 [0799] <210> 59
 [0800] <400> 59
 [0801] 000
 [0802] <210> 60
 [0803] <400> 60
 [0804] 000
 [0805] <210> 61
 [0806] <400> 61
 [0807] 000
 [0808] <210> 62
 [0809] <211> 12
 [0810] <212> PRT
 [0811] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 [0812] <220>
 [0813] <223> 人工序列的描述:合成
 [0814] 肽
 [0815] <400> 62
 [0816] Thr Ala Ser Ser Ser Val Ser Ser Ser Tyr Leu His
 [0817] 1 5 10

[0818] <210> 63
[0819] <211> 7
[0820] <212> PRT
[0821] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0822] <220>
[0823] <223> 人工序列的描述:合成
[0824] 肽
[0825] <400> 63
[0826] Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser
[0827] 1 5
[0828] <210> 64
[0829] <211> 5
[0830] <212> PRT
[0831] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0832] <220>
[0833] <223> 人工序列的描述:合成
[0834] 肽
[0835] <400> 64
[0836] Asn Tyr Ala Met Ser
[0837] 1 5
[0838] <210> 65
[0839] <211> 17
[0840] <212> PRT
[0841] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0842] <220>
[0843] <223> 人工序列的描述:合成
[0844] 肽
[0845] <400> 65
[0846] Thr Ile Ser Ser Gly Gly Ser His Thr Tyr Tyr Leu Asp Ser Val Lys
[0847] 1 5 10 15
[0848] Gly
[0849] <210> 66
[0850] <211> 9
[0851] <212> PRT
[0852] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0853] <220>
[0854] <223> 人工序列的描述:合成
[0855] 肽
[0856] <400> 66

[0857]	Leu Phe Thr Gly Tyr Ala Met Asp Tyr
[0858]	1 5
[0859]	<210> 67
[0860]	<211> 109
[0861]	<212> PRT
[0862]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0863]	<220>
[0864]	<223> 人工序列的描述:合成
[0865]	多肽
[0866]	<400> 67
[0867]	Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Leu Gly
[0868]	1 5 10 15
[0869]	Glu Arg Val Thr Met Thr Cys Thr Ala Ser Ser Ser Val Ser Ser Ser
[0870]	20 25 30
[0871]	Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys Leu Trp
[0872]	35 40 45
[0873]	Ile Tyr Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser
[0874]	50 55 60
[0875]	Gly Ser Gly Ser Gly Thr Phe Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu
[0876]	65 70 75 80
[0877]	Ala Glu Asp Asp Ala Thr Tyr Tyr Cys His Gln Tyr Tyr Arg Leu Pro
[0878]	85 90 95
[0879]	Pro Ile Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
[0880]	100 105
[0881]	<210> 68
[0882]	<211> 118
[0883]	<212> PRT
[0884]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0885]	<220>
[0886]	<223> 人工序列的描述:合成
[0887]	多肽
[0888]	<400> 68
[0889]	Glu Val Met Leu Val Glu Ser Gly Gly Ala Leu Val Lys Pro Gly Gly
[0890]	1 5 10 15
[0891]	Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr
[0892]	20 25 30
[0893]	Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ile Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val
[0894]	35 40 45
[0895]	Ala Thr Ile Ser Ser Gly Gly Ser His Thr Tyr Tyr Leu Asp Ser Val

[0896]	50	55	60
[0897]	Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Arg Asp Thr Leu Tyr		
[0898]	65	70	75
[0899]	Leu Gln Met Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys		80
[0900]		85	90
[0901]	Ala Arg Leu Phe Thr Gly Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr		95
[0902]		100	105
[0903]	Ser Val Thr Val Ser Ser		110
[0904]	115		
[0905]	<210> 69		
[0906]	<211> 20		
[0907]	<212> DNA		
[0908]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)		
[0909]	<220>		
[0910]	<223> 人工序列的描述:合成		
[0911]	引物		
[0912]	<400> 69		
[0913]	atggagacct ctcagggatg 20		
[0914]	<210> 70		
[0915]	<211> 20		
[0916]	<212> DNA		
[0917]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)		
[0918]	<220>		
[0919]	<223> 人工序列的描述:合成		
[0920]	引物		
[0921]	<400> 70		
[0922]	ataccagtcc ggatgccagc 20		
[0923]	<210> 71		
[0924]	<211> 20		
[0925]	<212> DNA		
[0926]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)		
[0927]	<220>		
[0928]	<223> 人工序列的描述:合成		
[0929]	引物		
[0930]	<400> 71		
[0931]	ataccagtcc ggatgccagc 20		
[0932]	<210> 72		
[0933]	<211> 25		
[0934]	<212> DNA		

[0935] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0936] <220>
[0937] <223> 人工序列的描述:合成
[0938] 引物
[0939] <400> 72
[0940] tcacccacac tgtgcccatc tacga 25
[0941] <210> 73
[0942] <211> 20
[0943] <212> DNA
[0944] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0945] <220>
[0946] <223> 人工序列的描述:合成
[0947] 引物
[0948] <400> 73
[0949] gacaaggcac cttcagaacc 20
[0950] <210> 74
[0951] <211> 22
[0952] <212> DNA
[0953] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0954] <220>
[0955] <223> 人工序列的描述:合成
[0956] 引物
[0957] <400> 74
[0958] cagcagctta gtcagggtta ca 22
[0959] <210> 75
[0960] <211> 23
[0961] <212> DNA
[0962] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0963] <220>
[0964] <223> 人工序列的描述:合成
[0965] 引物
[0966] <400> 75
[0967] gccatgccca ggtgcaagat caa 23
[0968] <210> 76
[0969] <211> 20
[0970] <212> DNA
[0971] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0972] <220>
[0973] <223> 人工序列的描述:合成

- [0974] 引物
[0975] <400> 76
[0976] tggctggctg ccctctgatg 20
[0977] <210> 77
[0978] <211> 22
[0979] <212> DNA
[0980] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0981] <220>
[0982] <223> 人工序列的描述:合成
[0983] 引物
[0984] <400> 77
[0985] tggacagtgg agcaactccg gt 22
[0986] <210> 78
[0987] <211> 23
[0988] <212> DNA
[0989] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0990] <220>
[0991] <223> 人工序列的描述:合成
[0992] 引物
[0993] <400> 78
[0994] ggtgggtact ccacaggctg gaa 23
[0995] <210> 79
[0996] <211> 20
[0997] <212> DNA
[0998] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0999] <220>
[1000] <223> 人工序列的描述:合成
[1001] 引物
[1002] <400> 79
[1003] ctcacccgcg ttactccat 20
[1004] <210> 80
[1005] <211> 20
[1006] <212> DNA
[1007] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1008] <220>
[1009] <223> 人工序列的描述:合成
[1010] 引物
[1011] <400> 80
[1012] tggtctgttc gatgctcagg 20

[1013]	<210> 81
[1014]	<211> 20
[1015]	<212> DNA
[1016]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1017]	<220>
[1018]	<223> 人工序列的描述:合成
[1019]	引物
[1020]	<400> 81
[1021]	agcaggtcat caagtcaggc 20
[1022]	<210> 82
[1023]	<211> 20
[1024]	<212> DNA
[1025]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1026]	<220>
[1027]	<223> 人工序列的描述:合成
[1028]	引物
[1029]	<400> 82
[1030]	gatgtagctg gtgttgggct 20
[1031]	<210> 83
[1032]	<211> 18
[1033]	<212> DNA
[1034]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1035]	<220>
[1036]	<223> 人工序列的描述:合成
[1037]	引物
[1038]	<400> 83
[1039]	accccctaaa taacctgg 18
[1040]	<210> 84
[1041]	<211> 20
[1042]	<212> DNA
[1043]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1044]	<220>
[1045]	<223> 人工序列的描述:合成
[1046]	引物
[1047]	<400> 84
[1048]	cctcatgtat ccttttttggga 20
[1049]	<210> 85
[1050]	<211> 20
[1051]	<212> DNA

- [1052] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1053] <220>
[1054] <223> 人工序列的描述:合成
[1055] 引物
[1056] <400> 85
[1057] aggggtacttt gcctgctgaa 20
[1058] <210> 86
[1059] <211> 20
[1060] <212> DNA
[1061] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1062] <220>
[1063] <223> 人工序列的描述:合成
[1064] 引物
[1065] <400> 86
[1066] tgtgaaggtg ctcttgatg 20

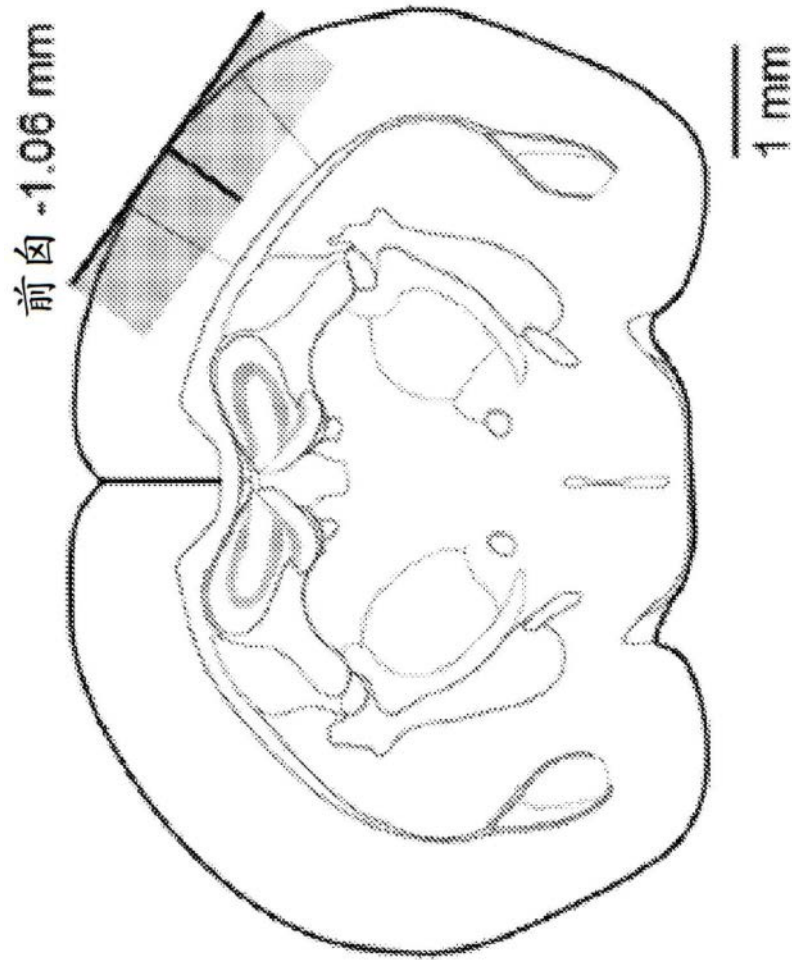


图1A

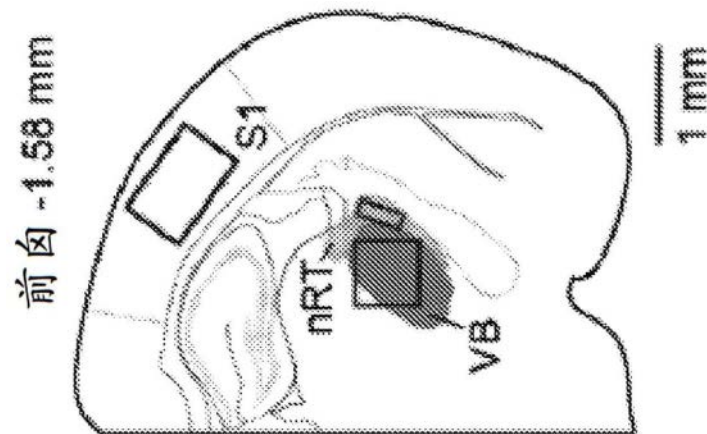


图1B

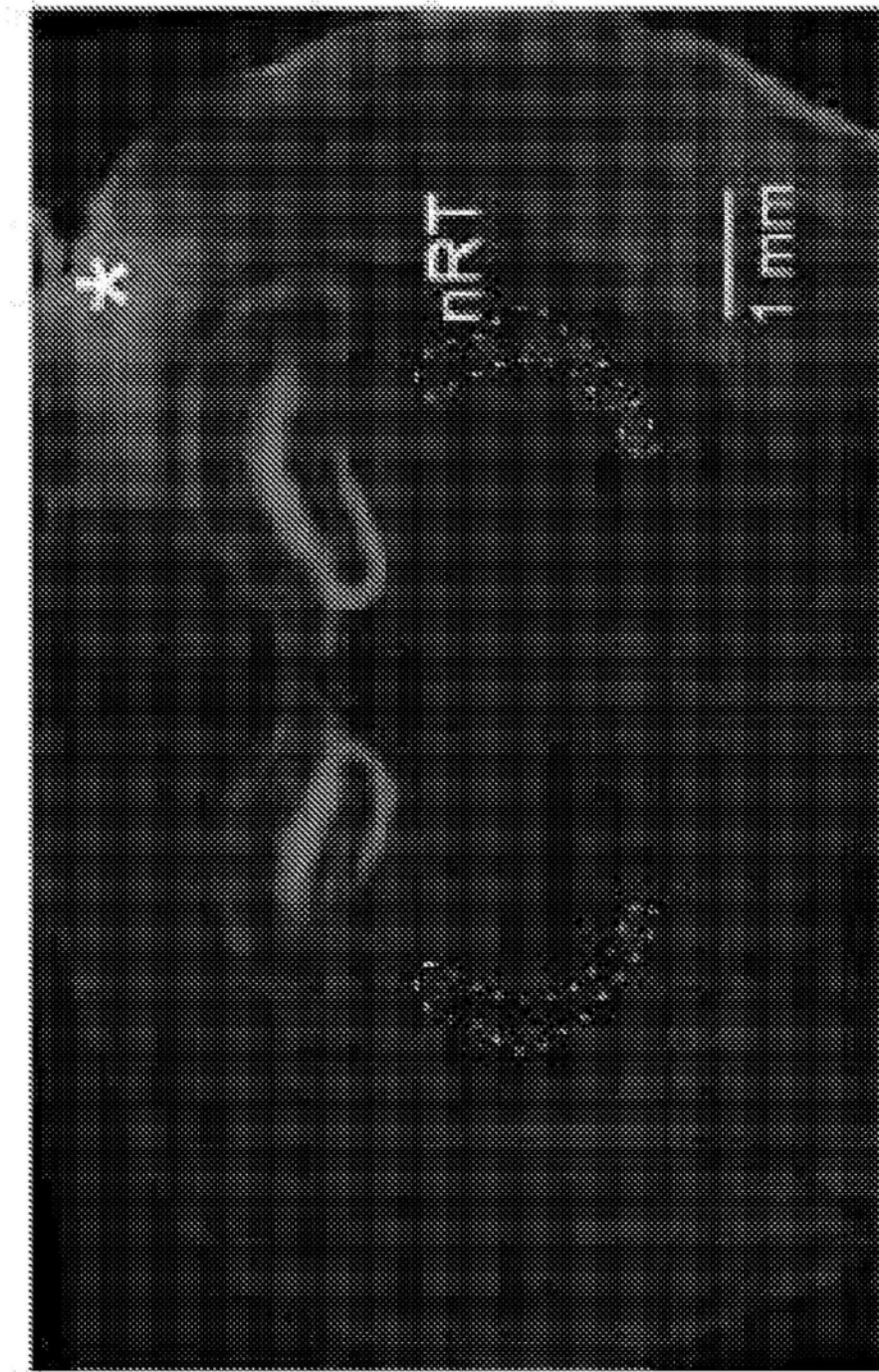


图1C

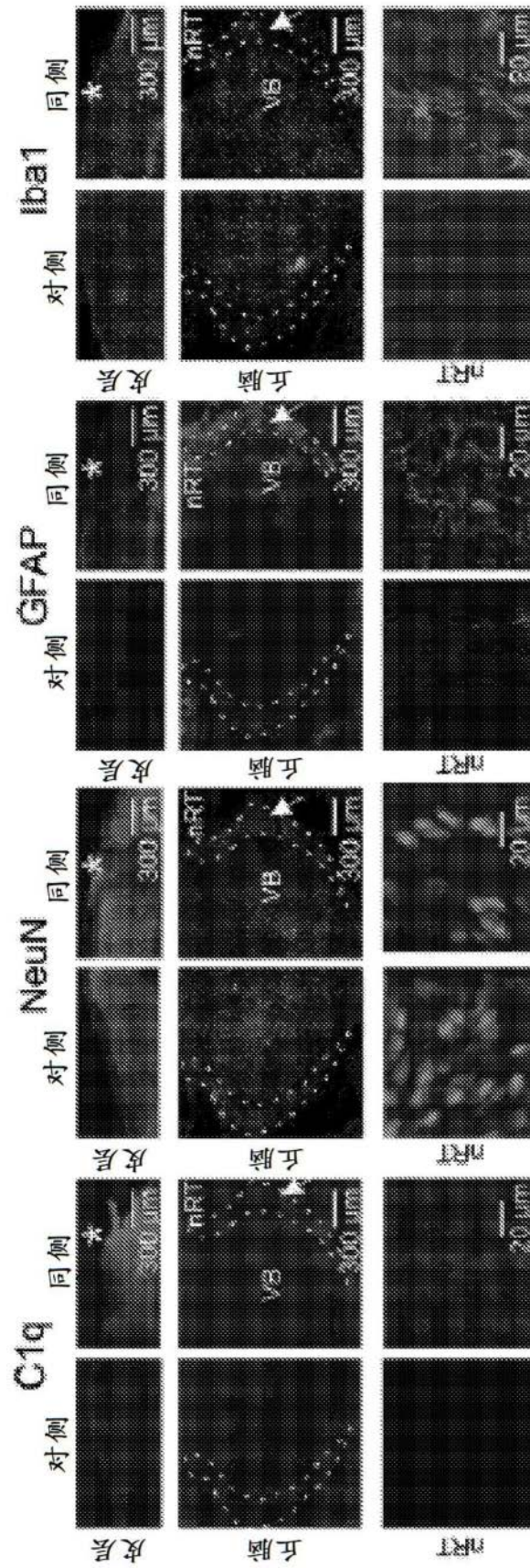


图1D

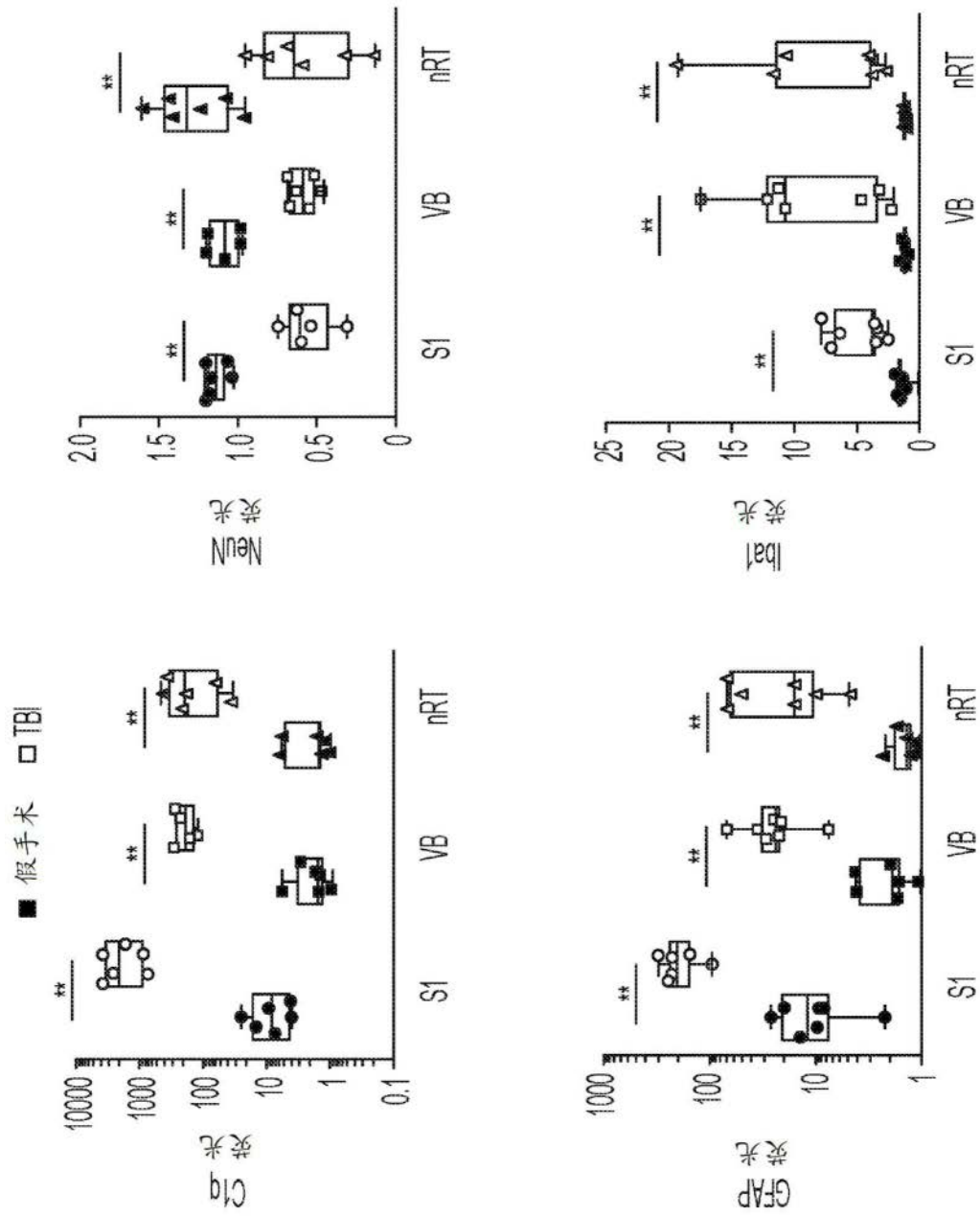


图1E

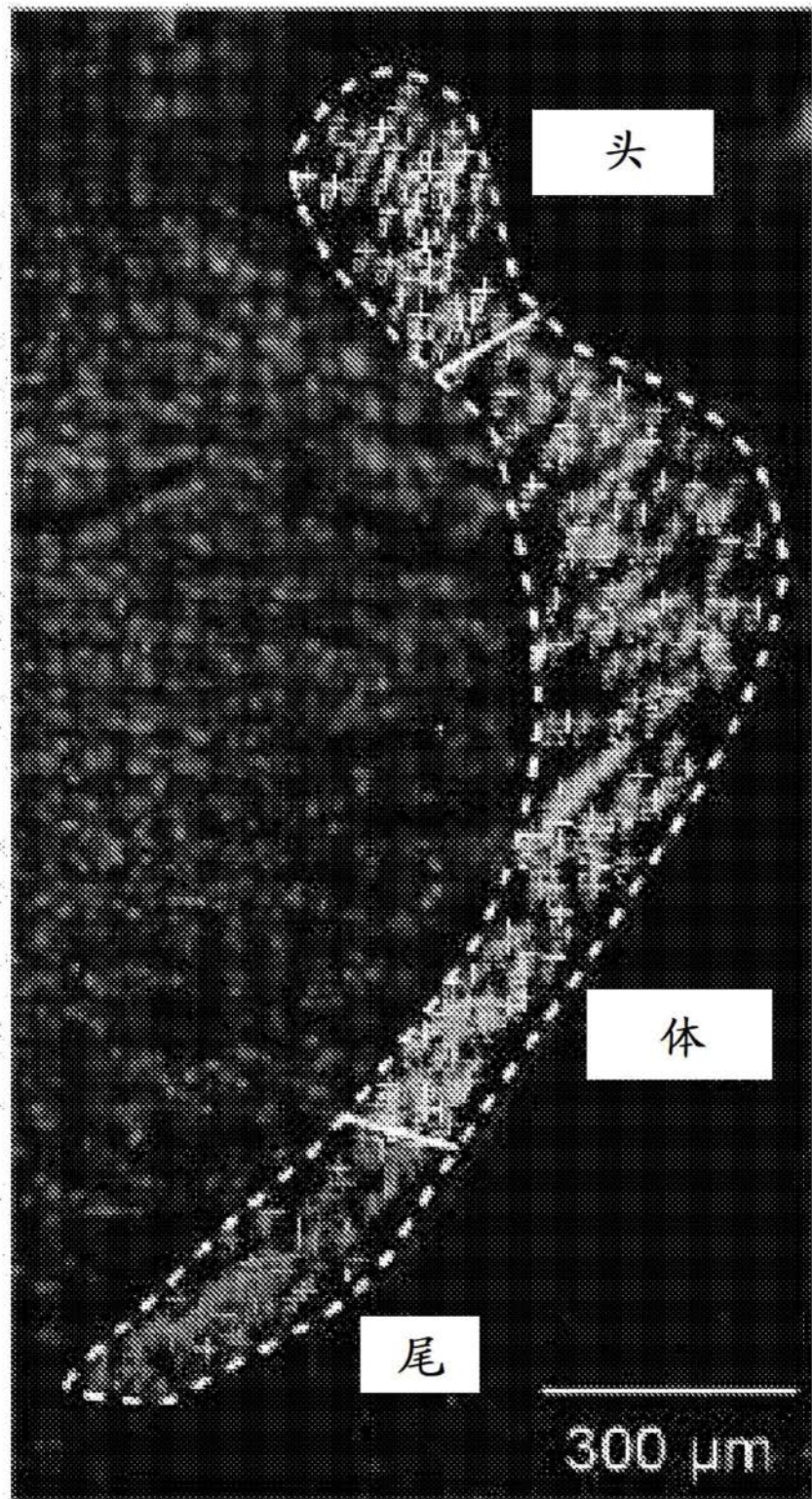


图2A

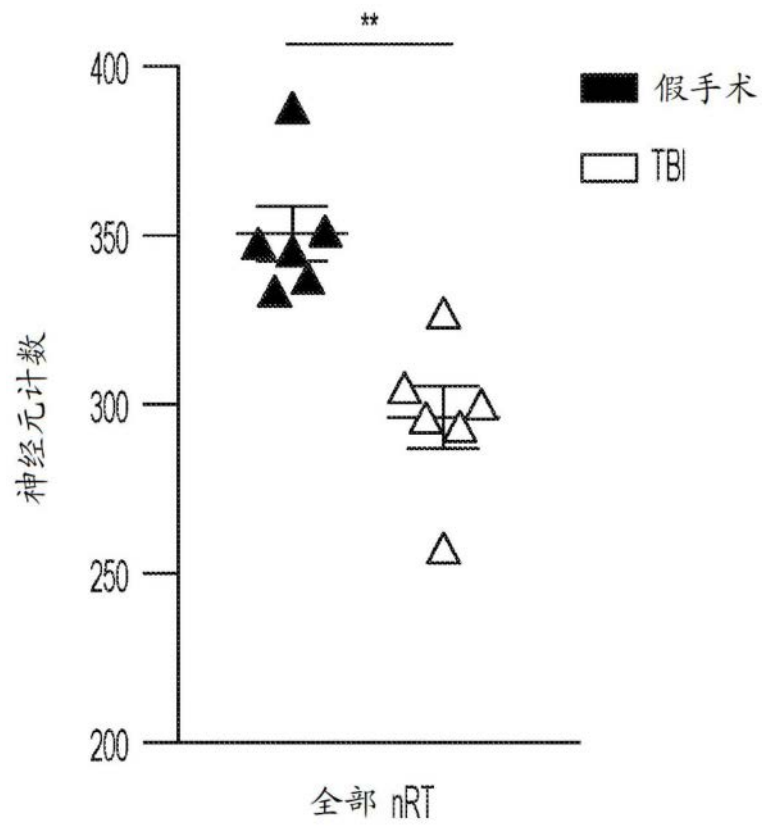


图2B

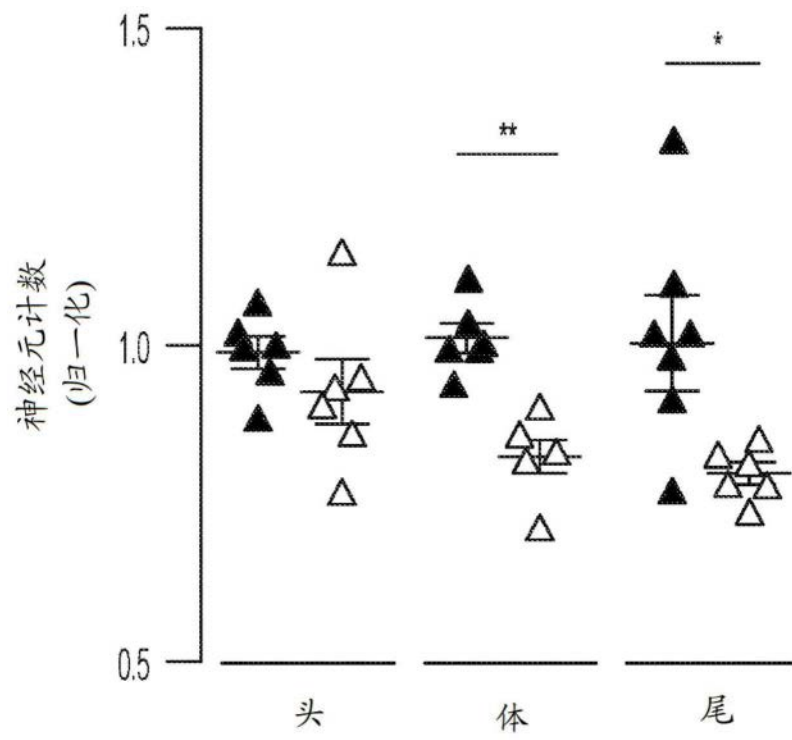


图2C

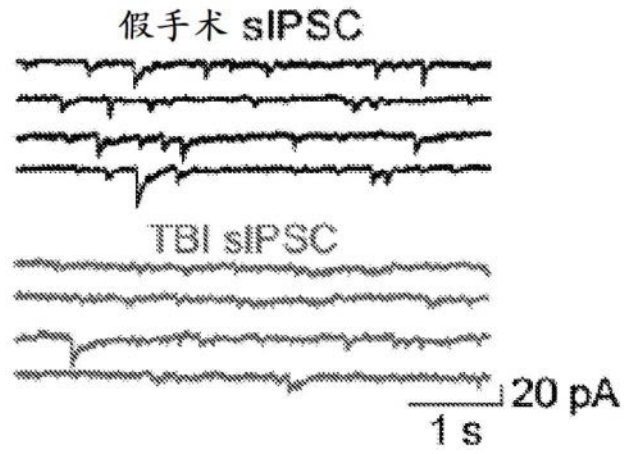


图2D

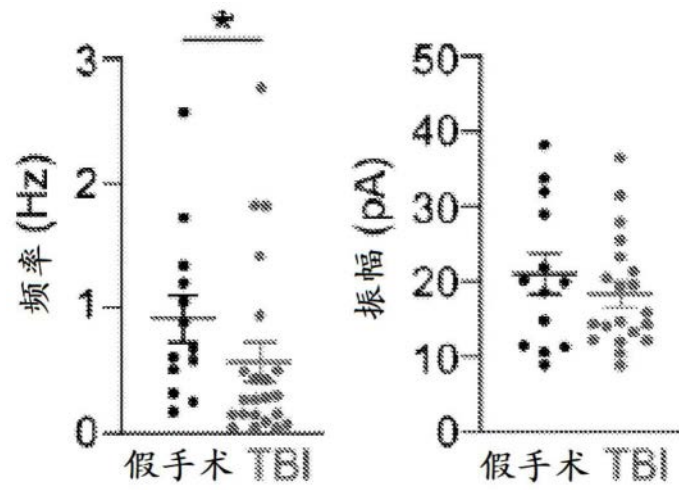


图2E

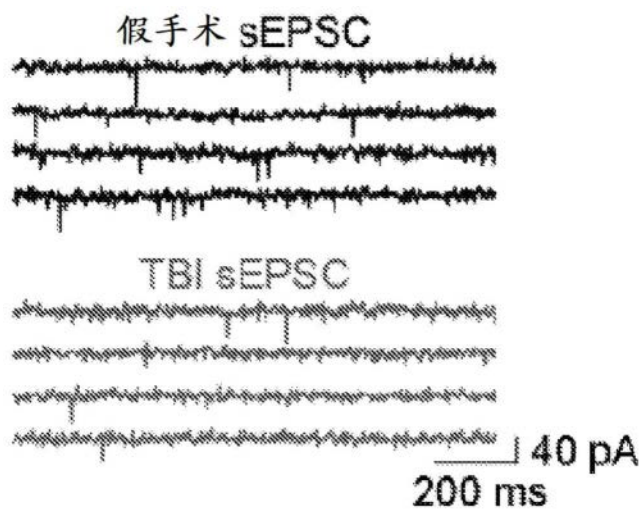


图2F

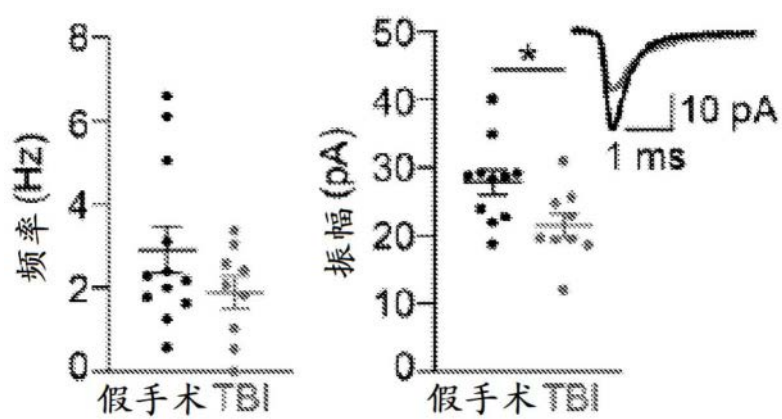


图2G

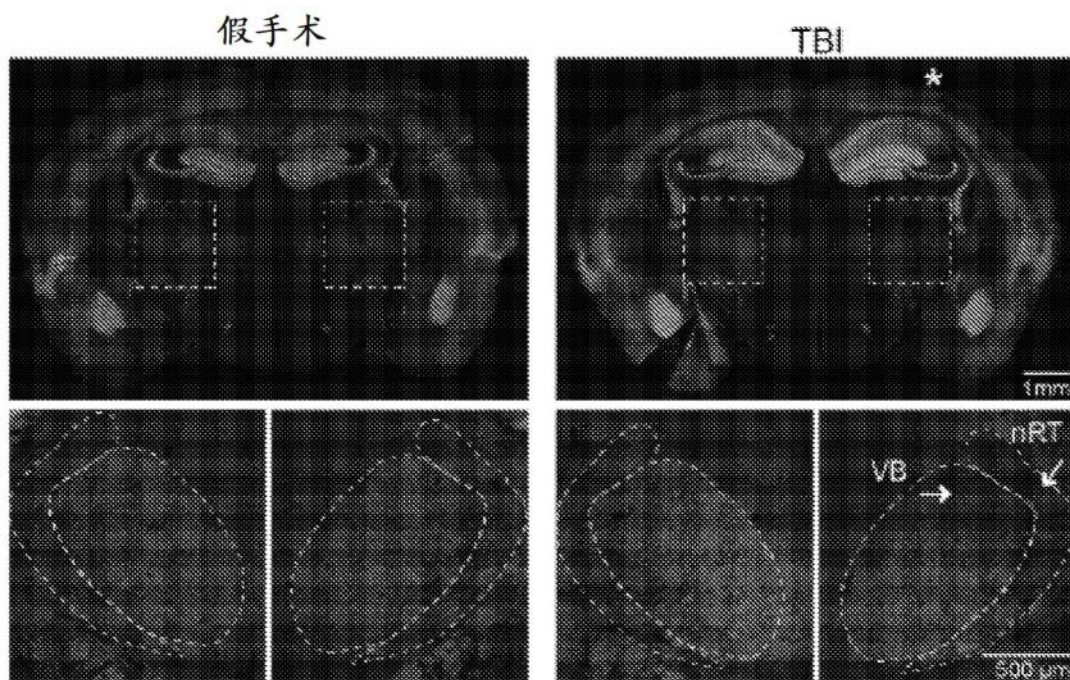


图2H

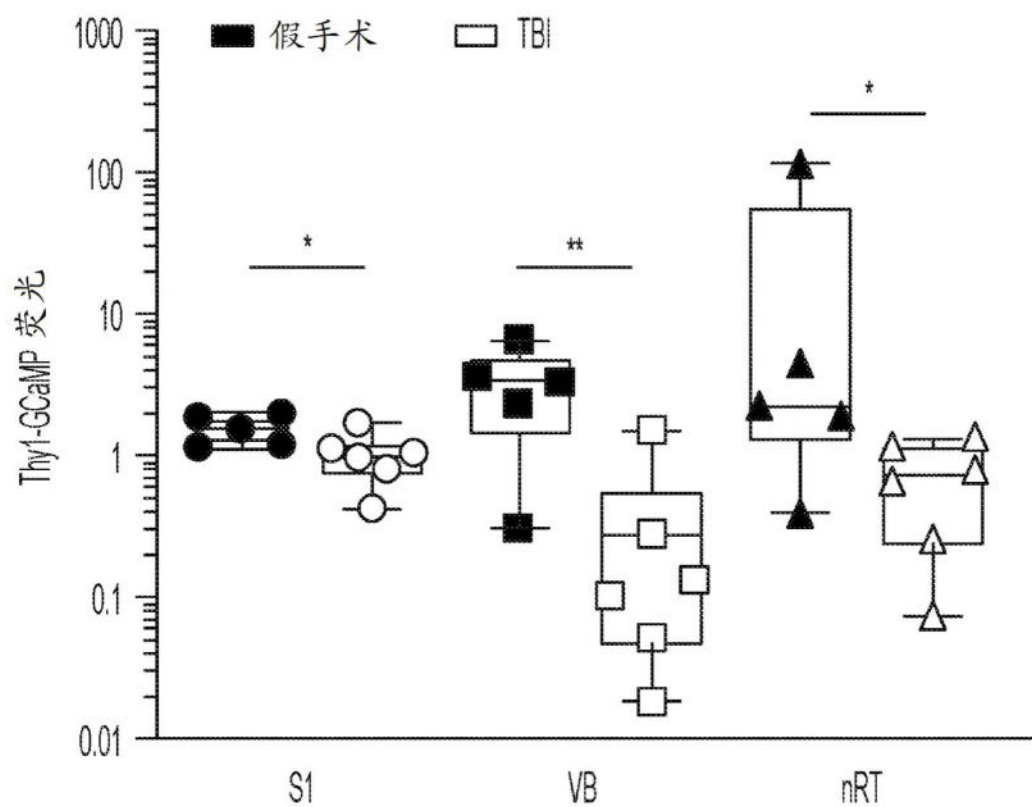


图2I

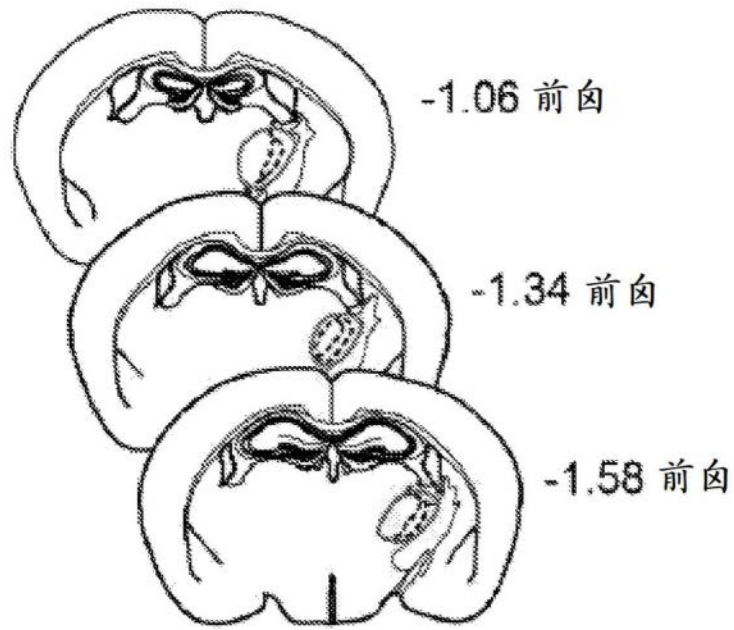


图3A

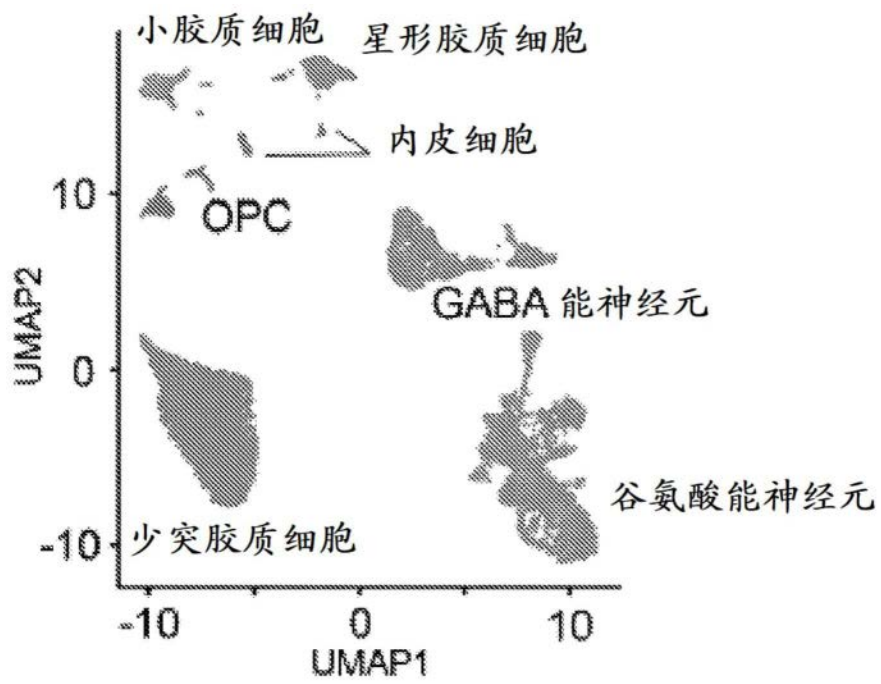


图3B

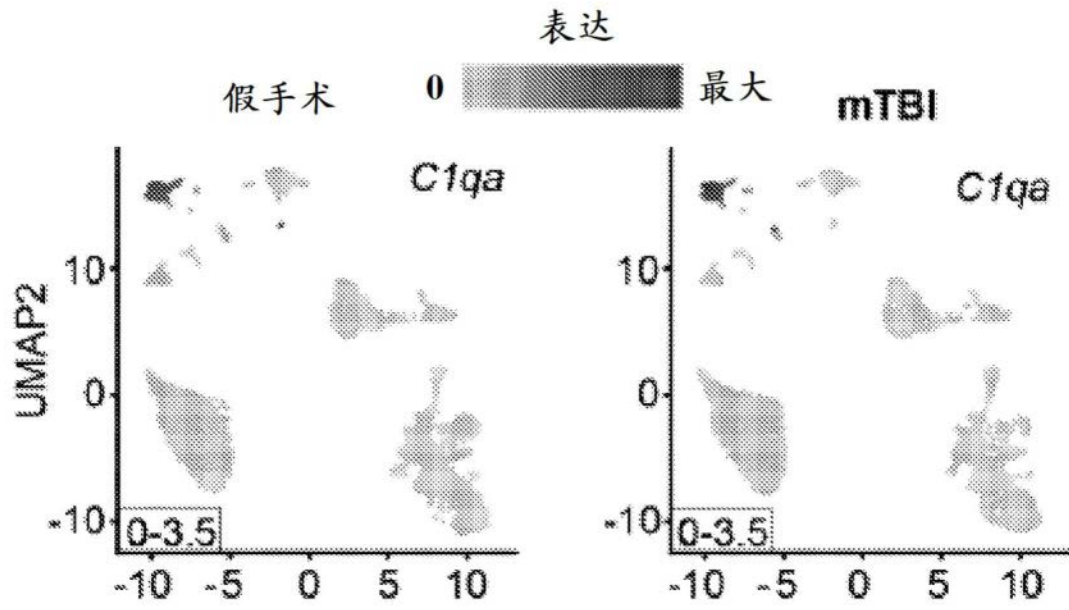


图3C

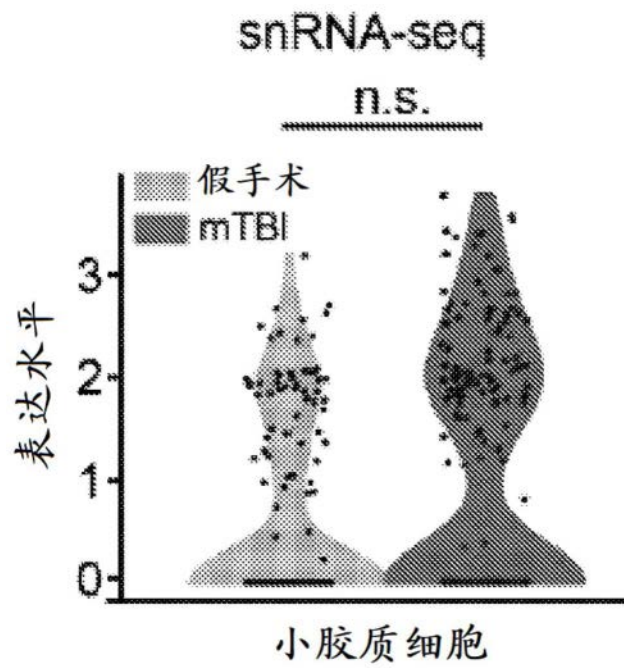


图3D

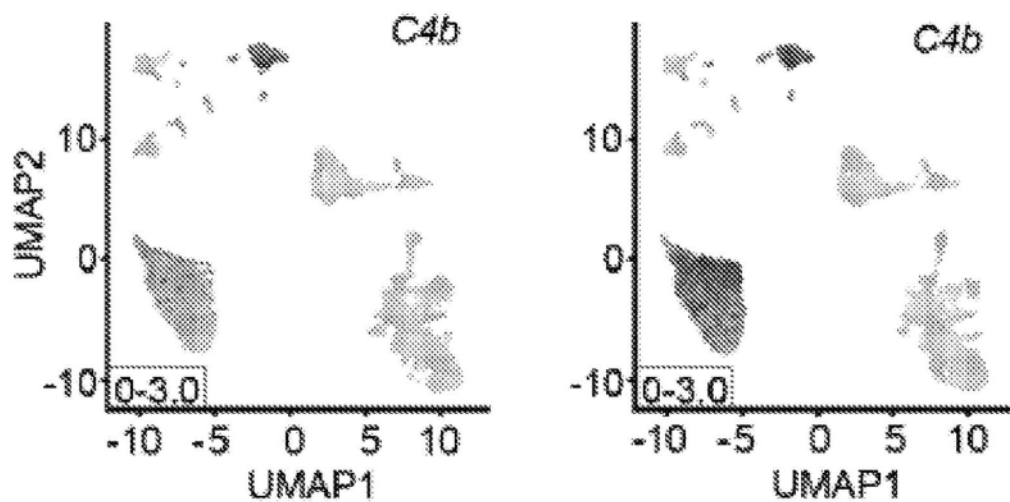


图3E

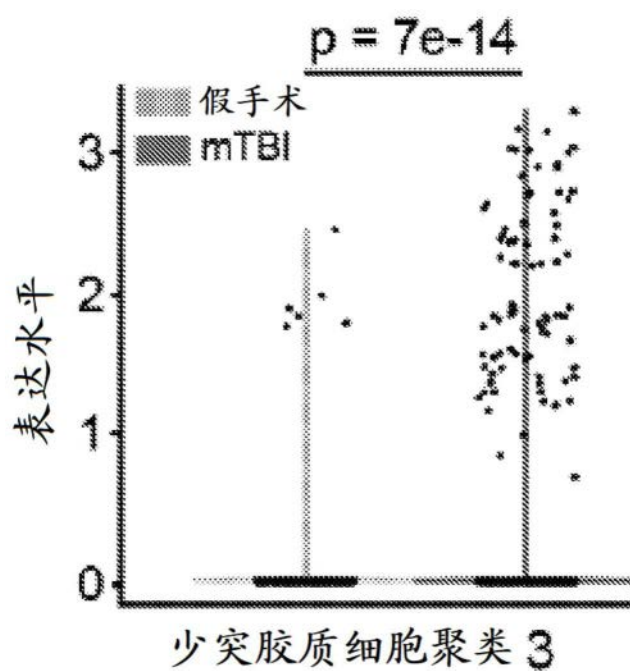


图3F

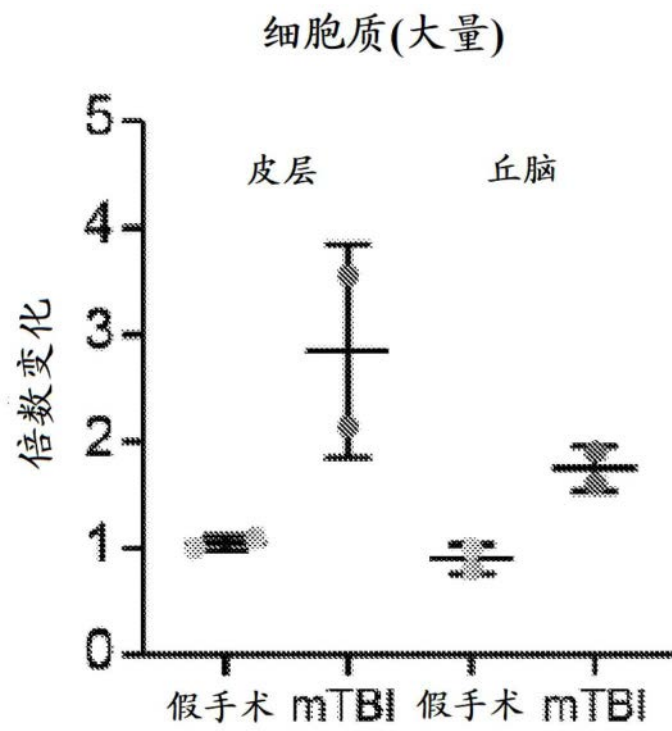


图3G

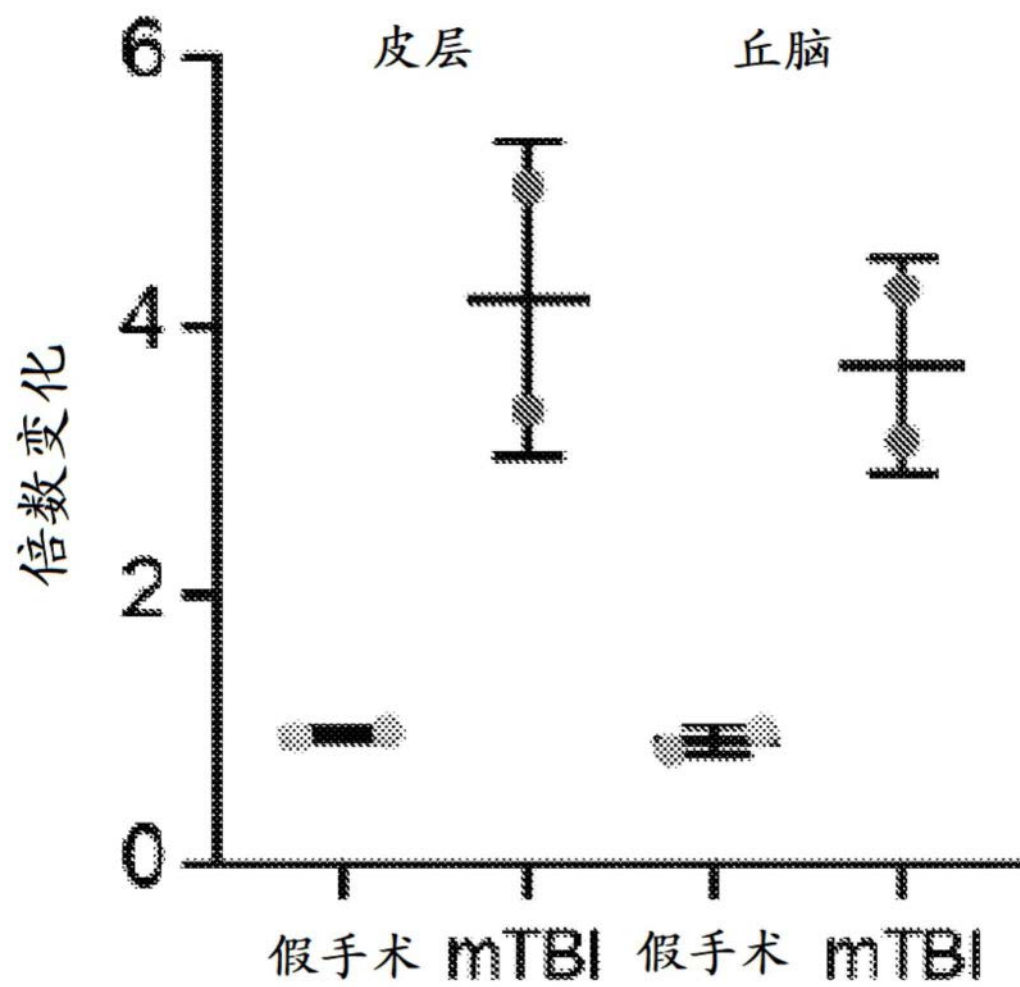


图3H

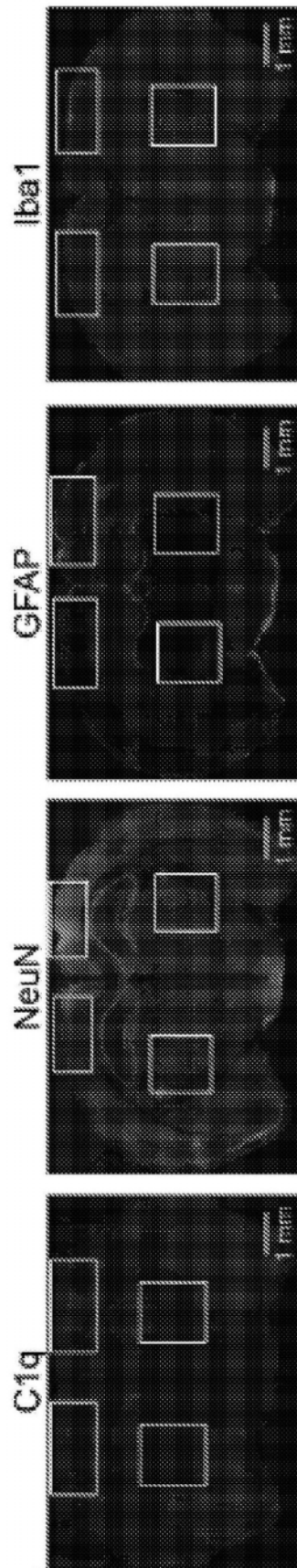


图4A

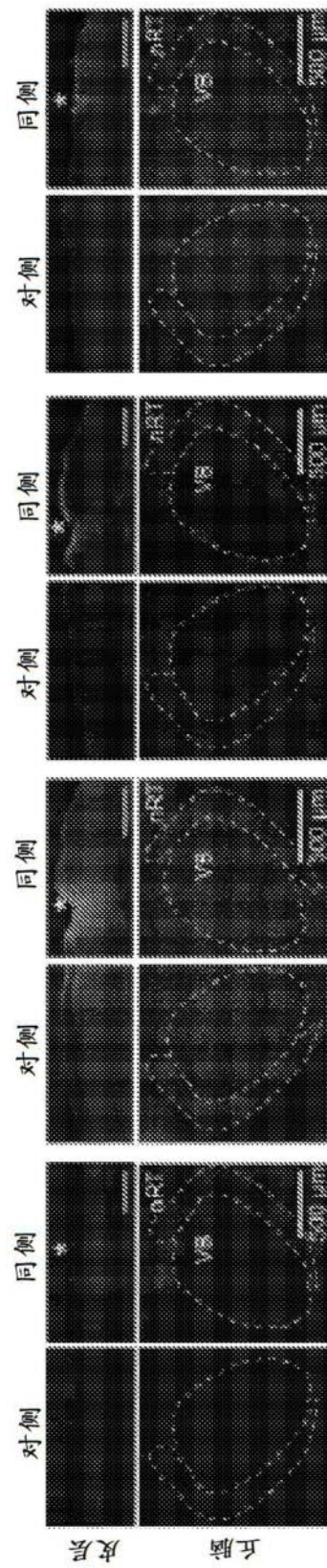


图4B

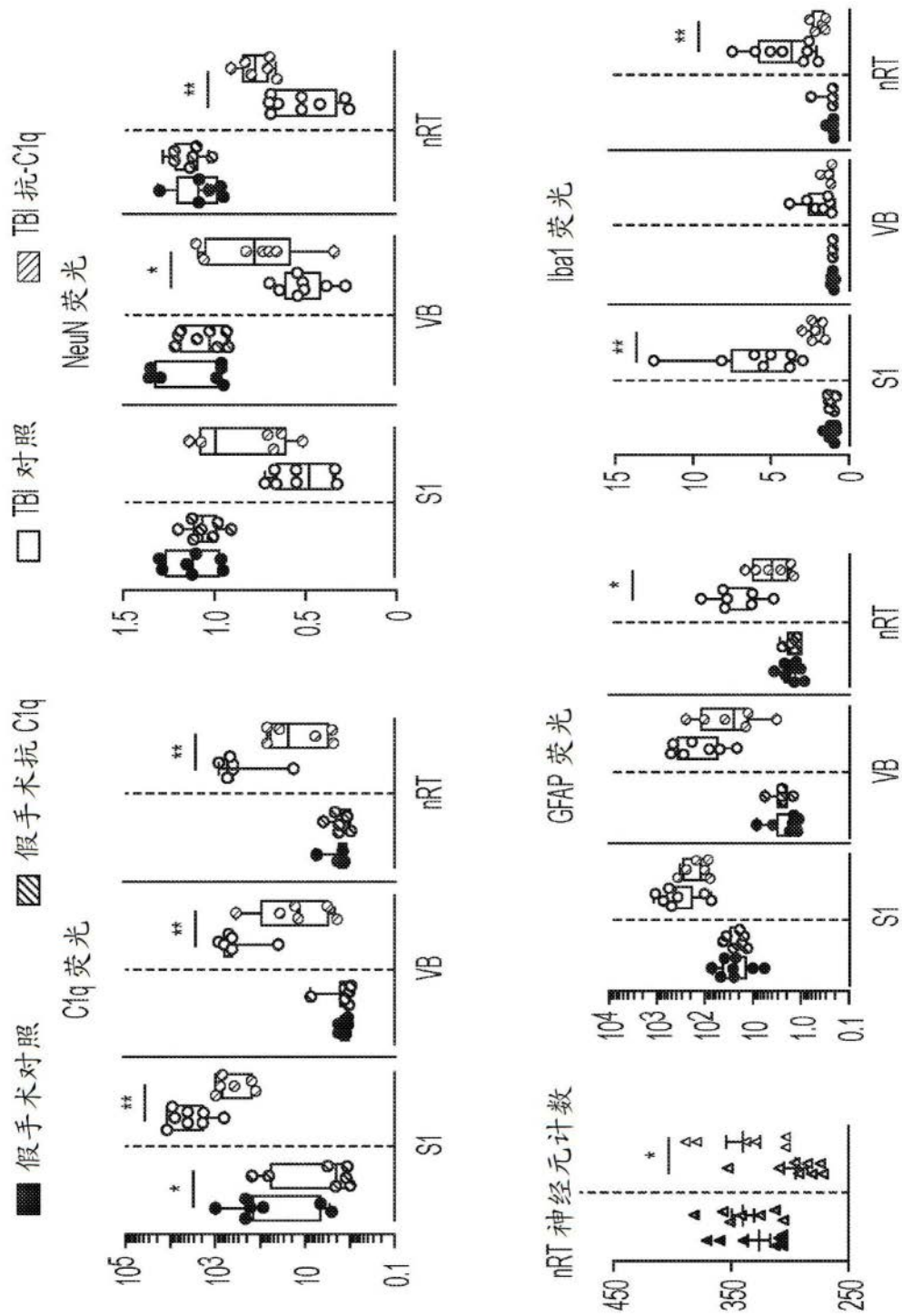


图4C

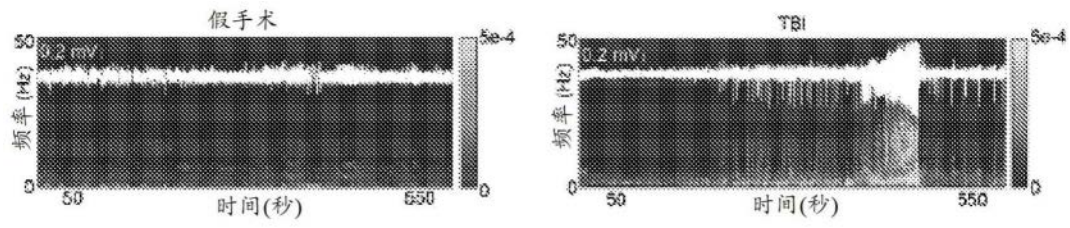


图5A

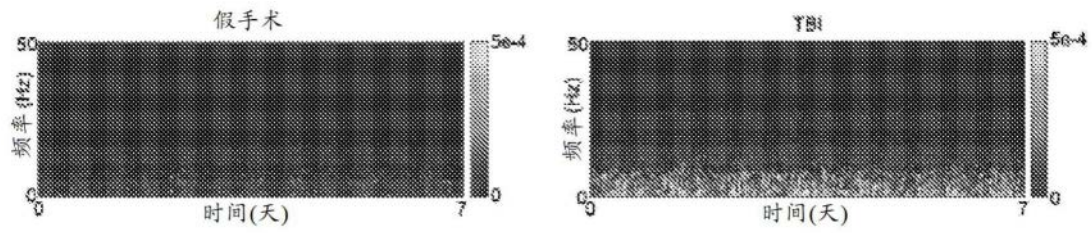


图5B

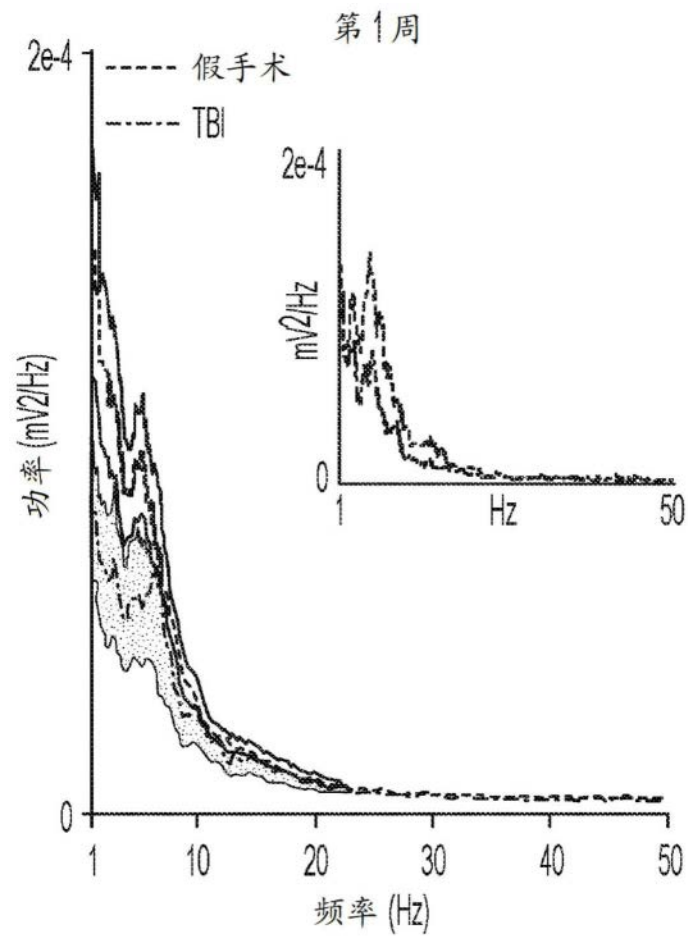


图5C

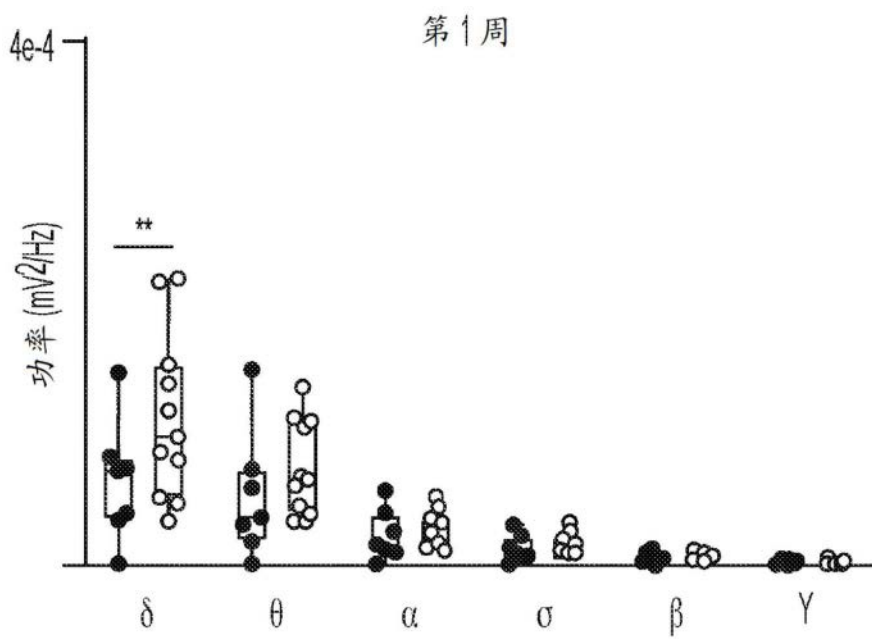


图5D

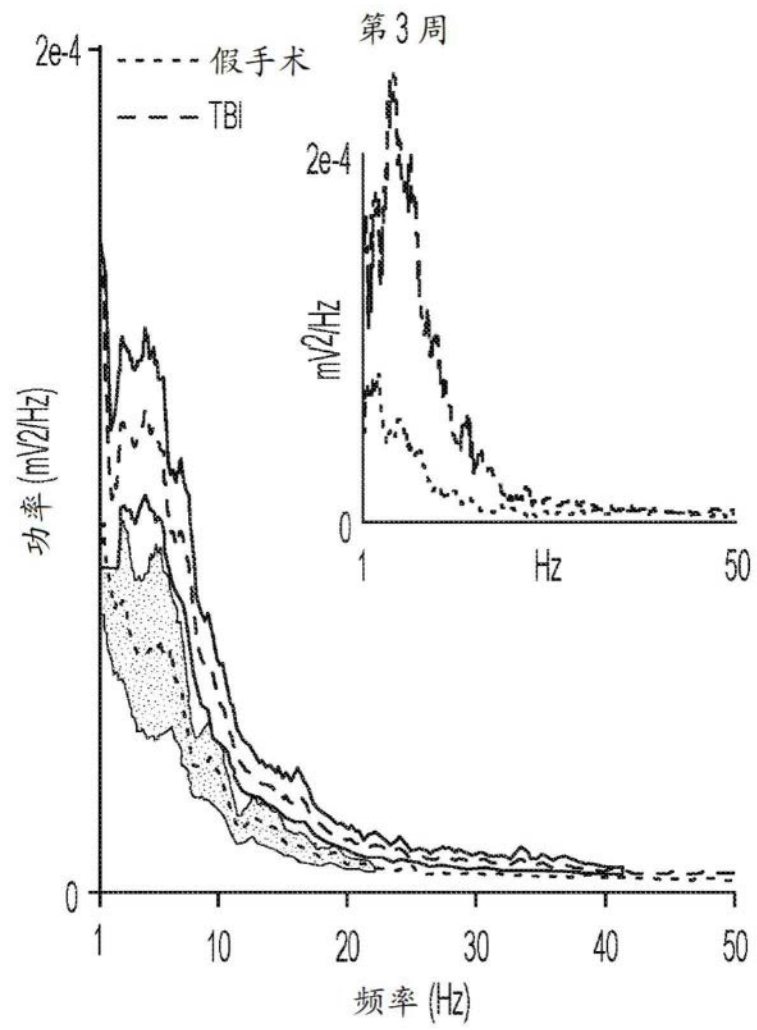


图5E

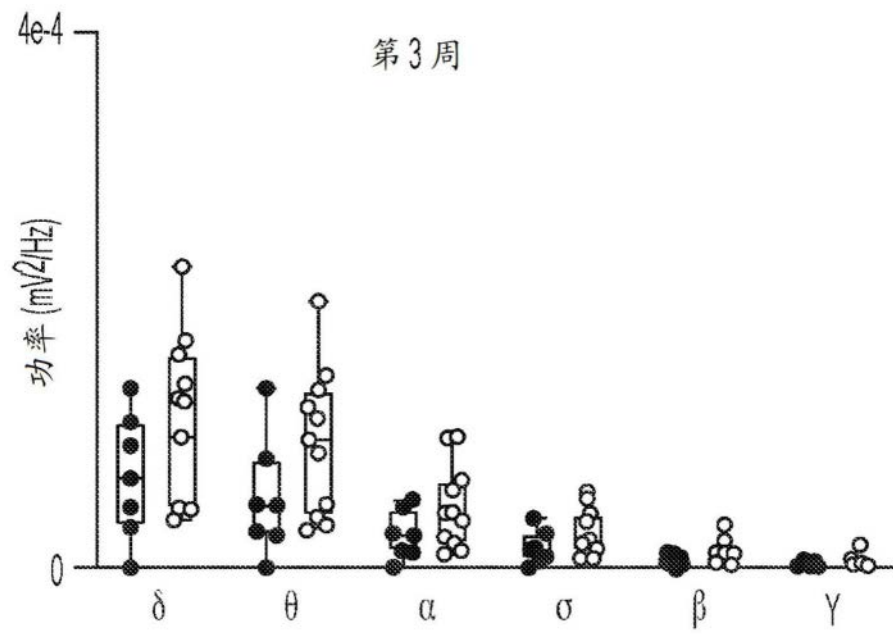


图5F

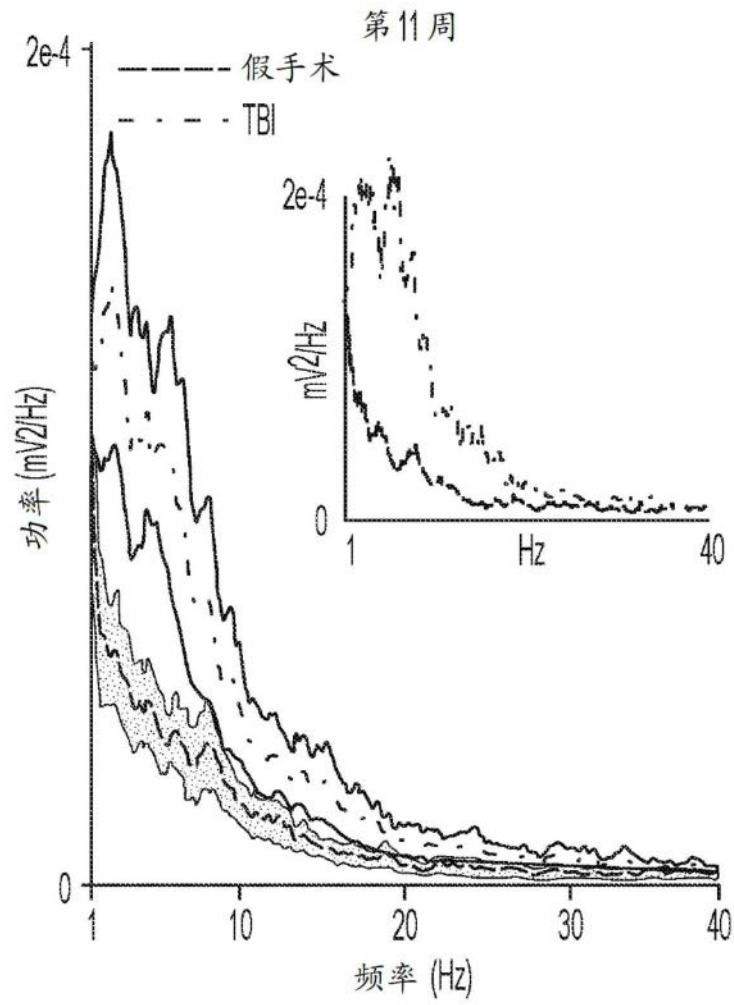


图5G

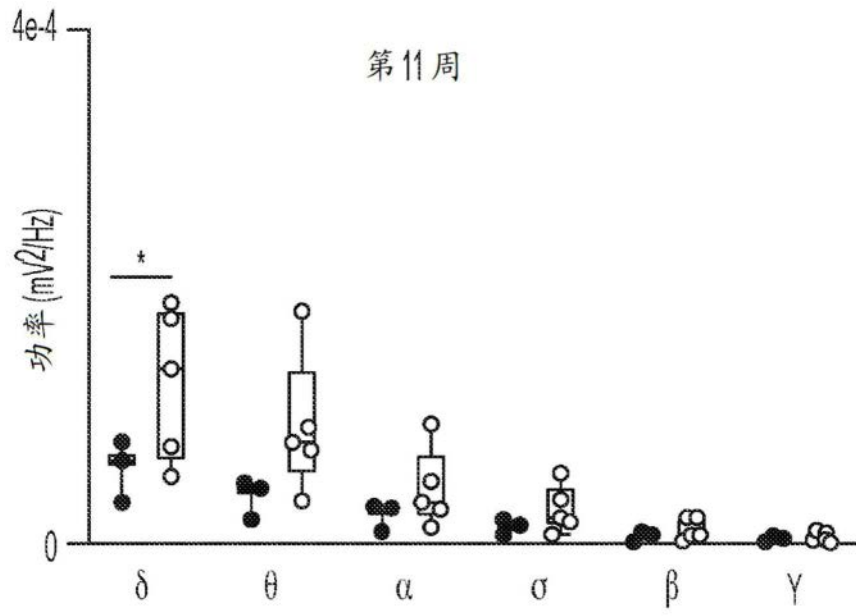


图5H

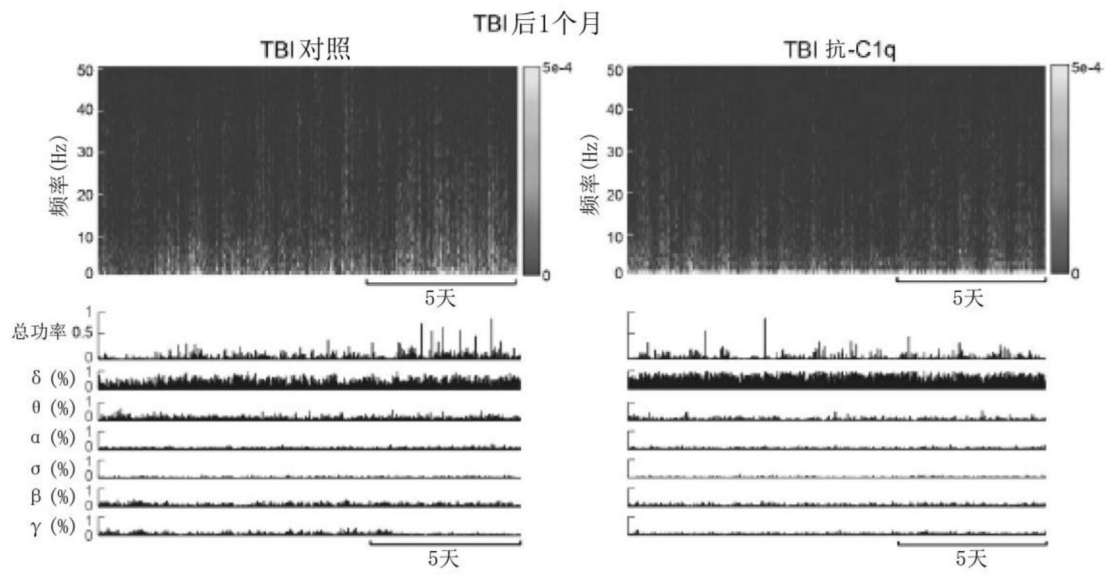


图6A

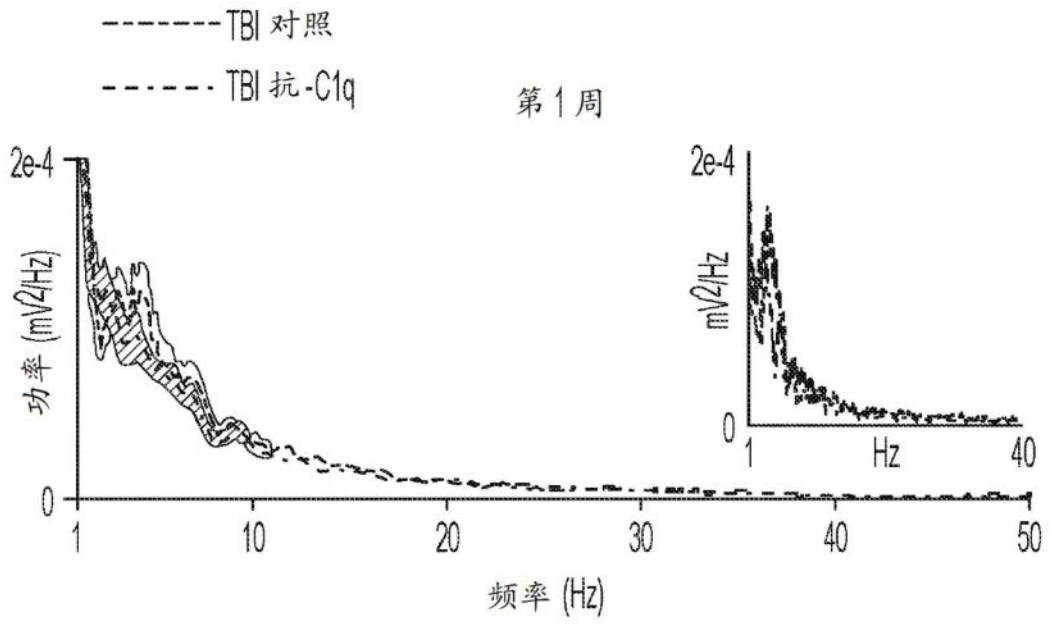


图6B

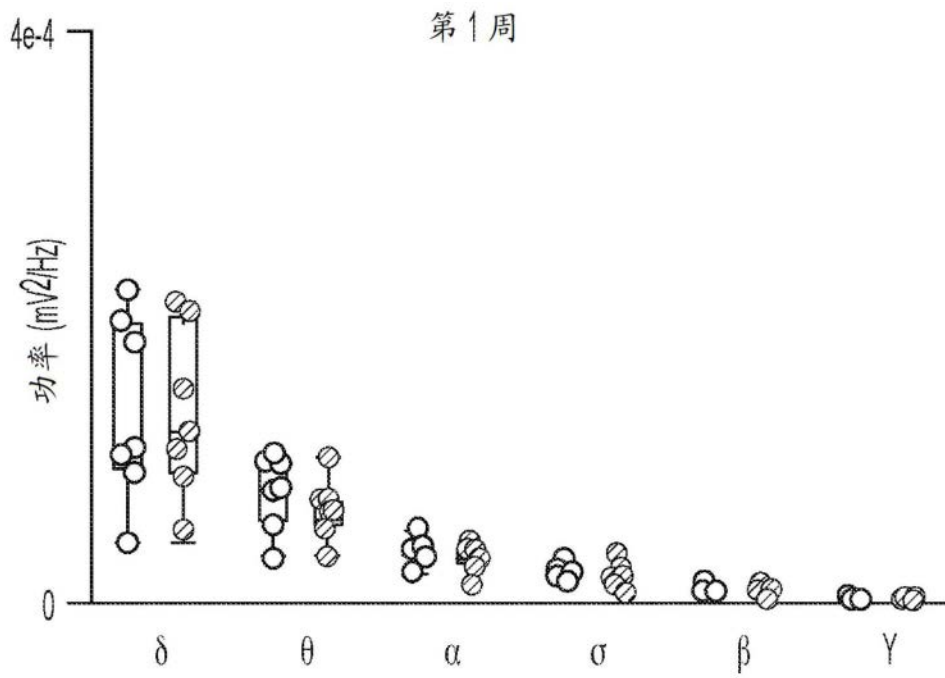


图6C

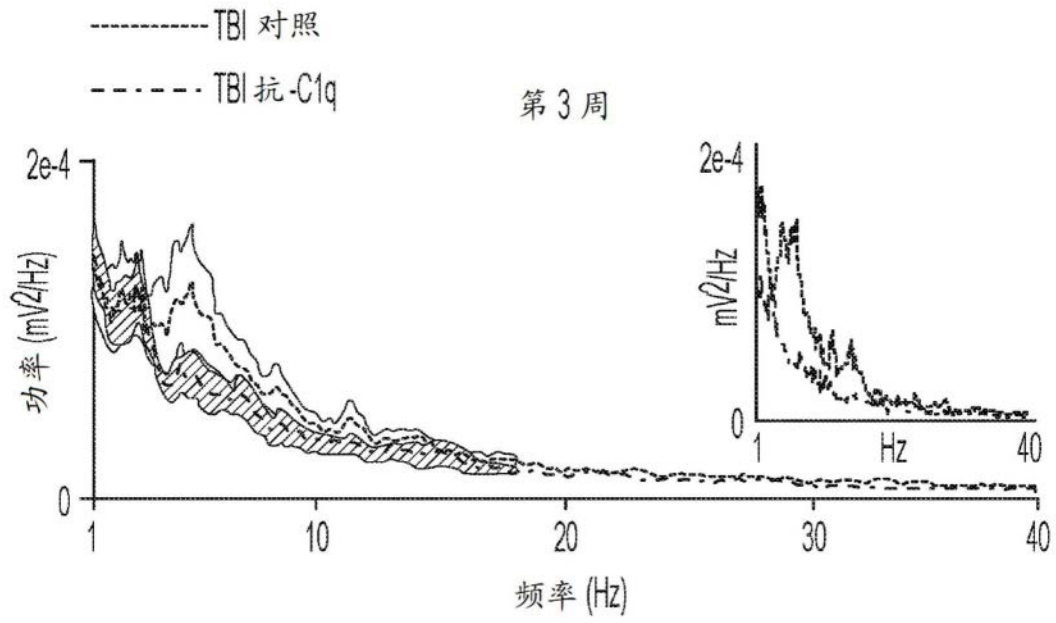


图6D

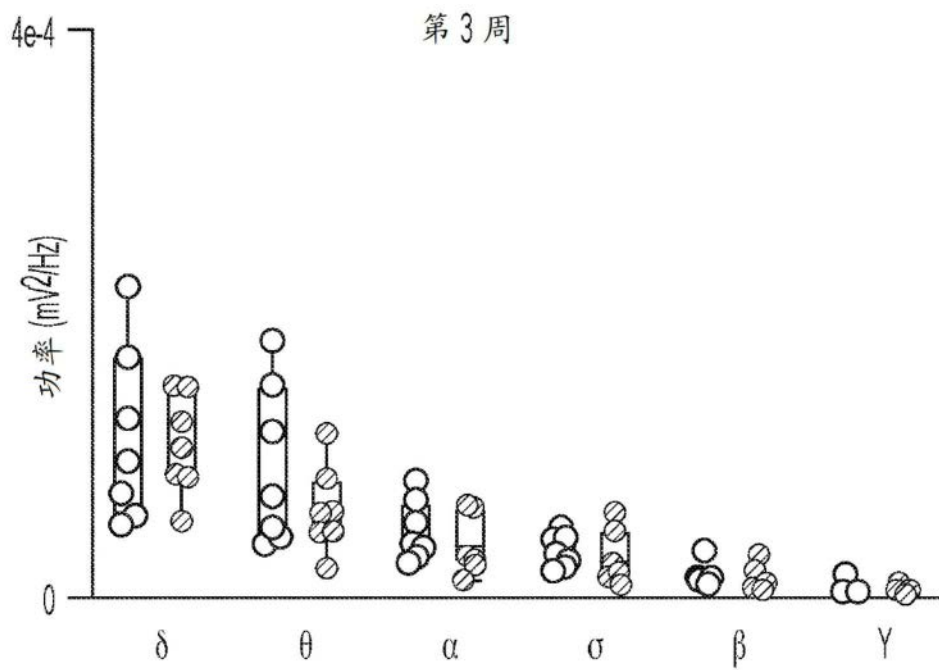


图6E

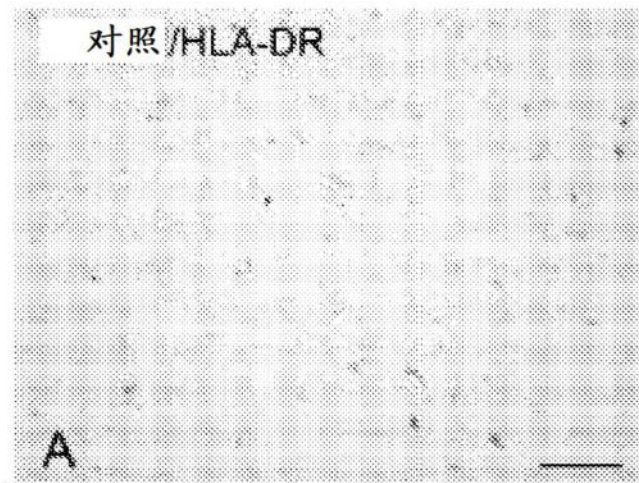


图7A

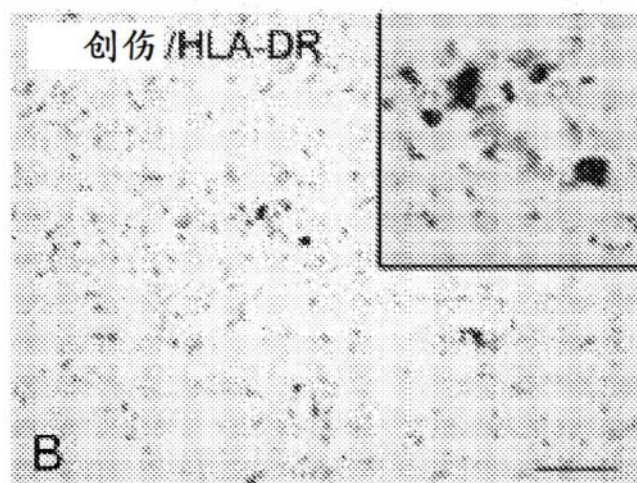


图7B

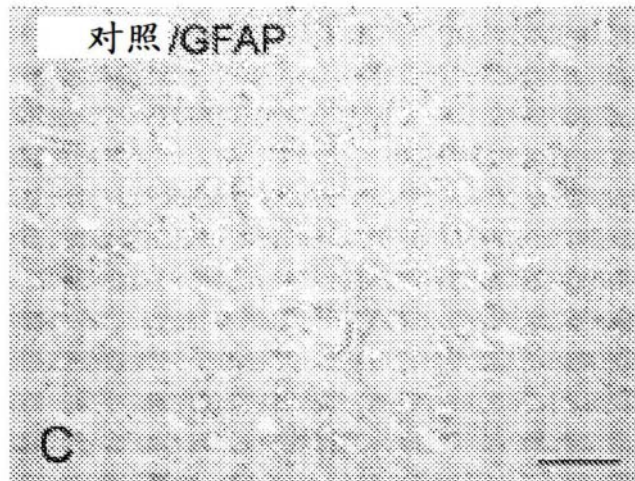


图7C

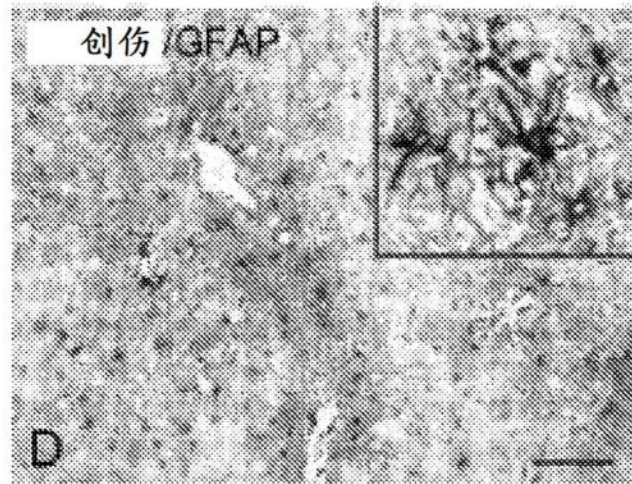


图7D

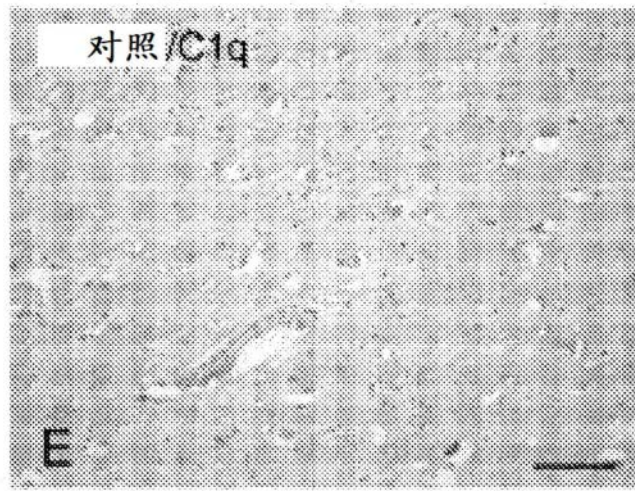


图7E

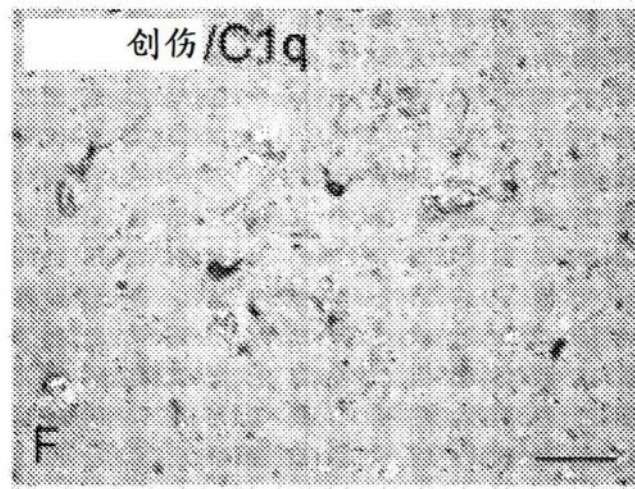


图7F

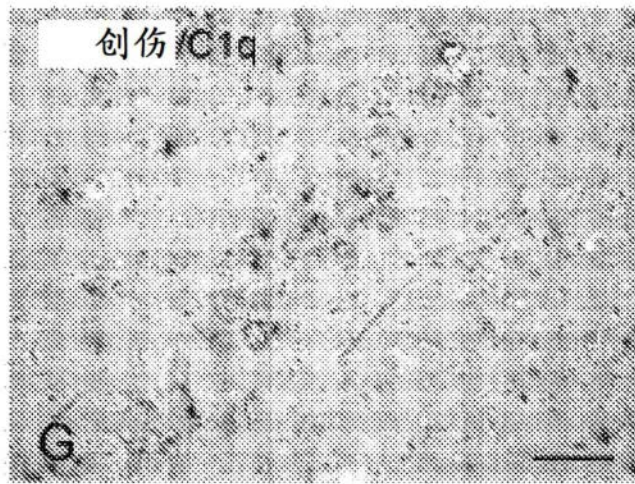


图7G

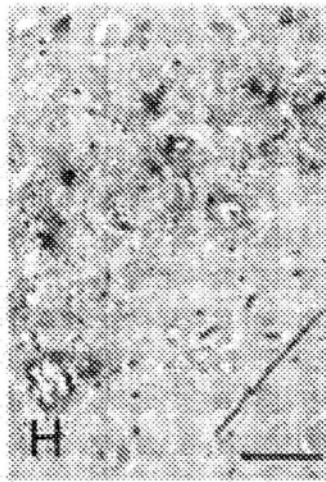


图7H



图7I

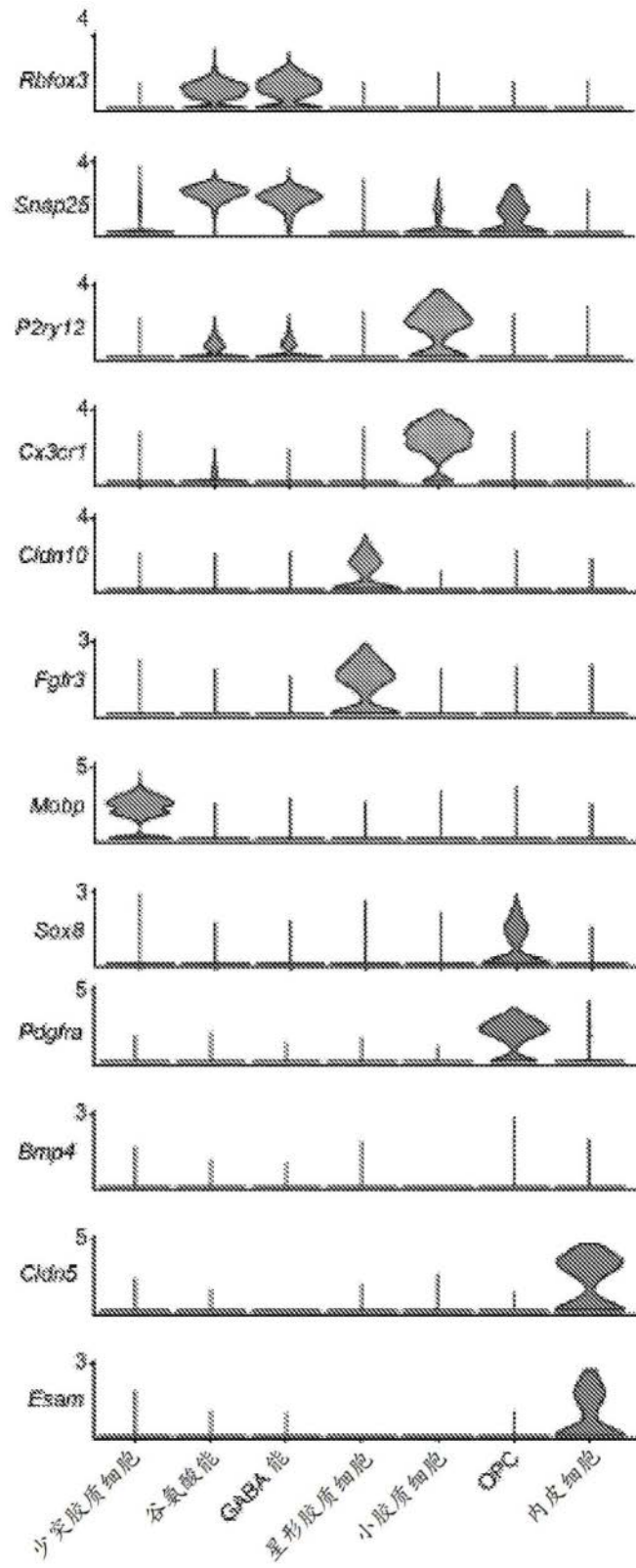


图8A

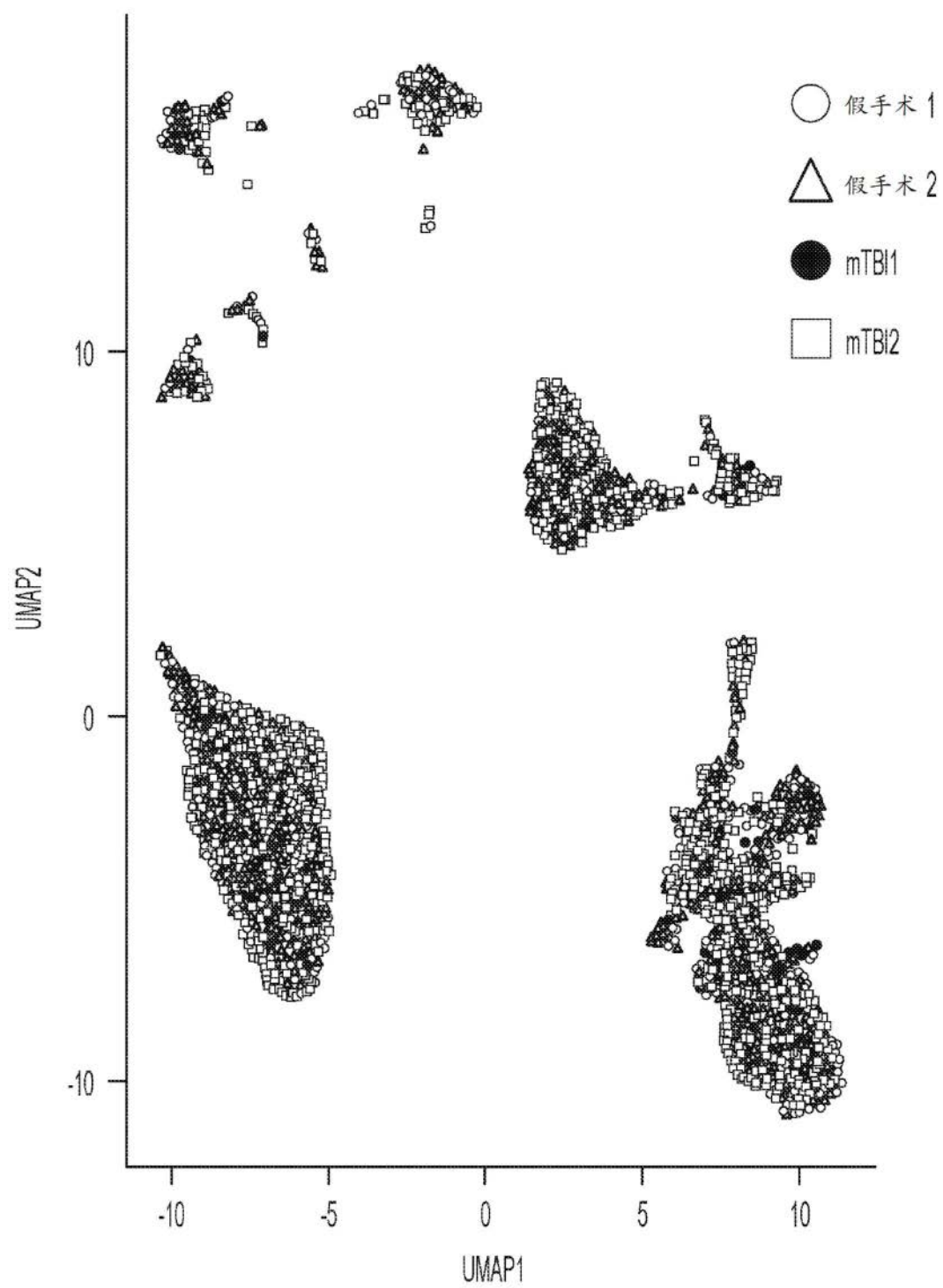


图8B

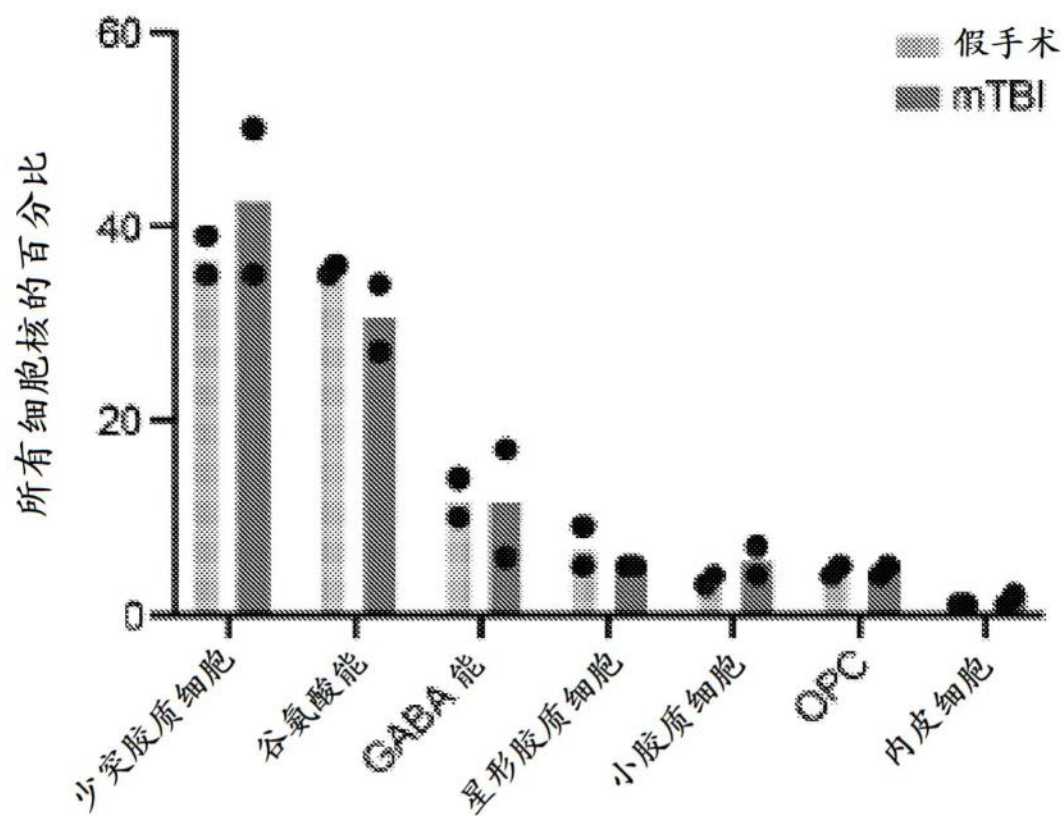


图8C

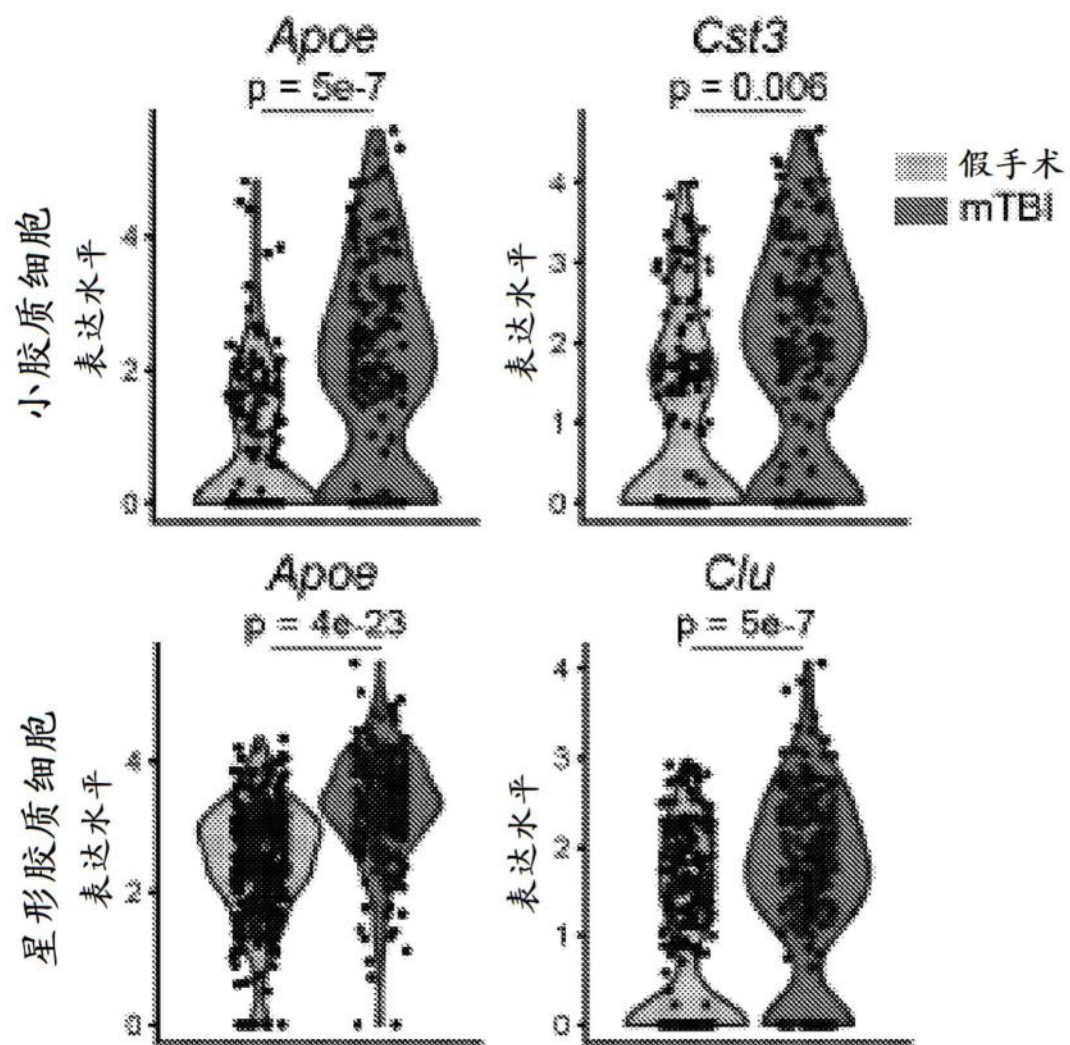


图9A

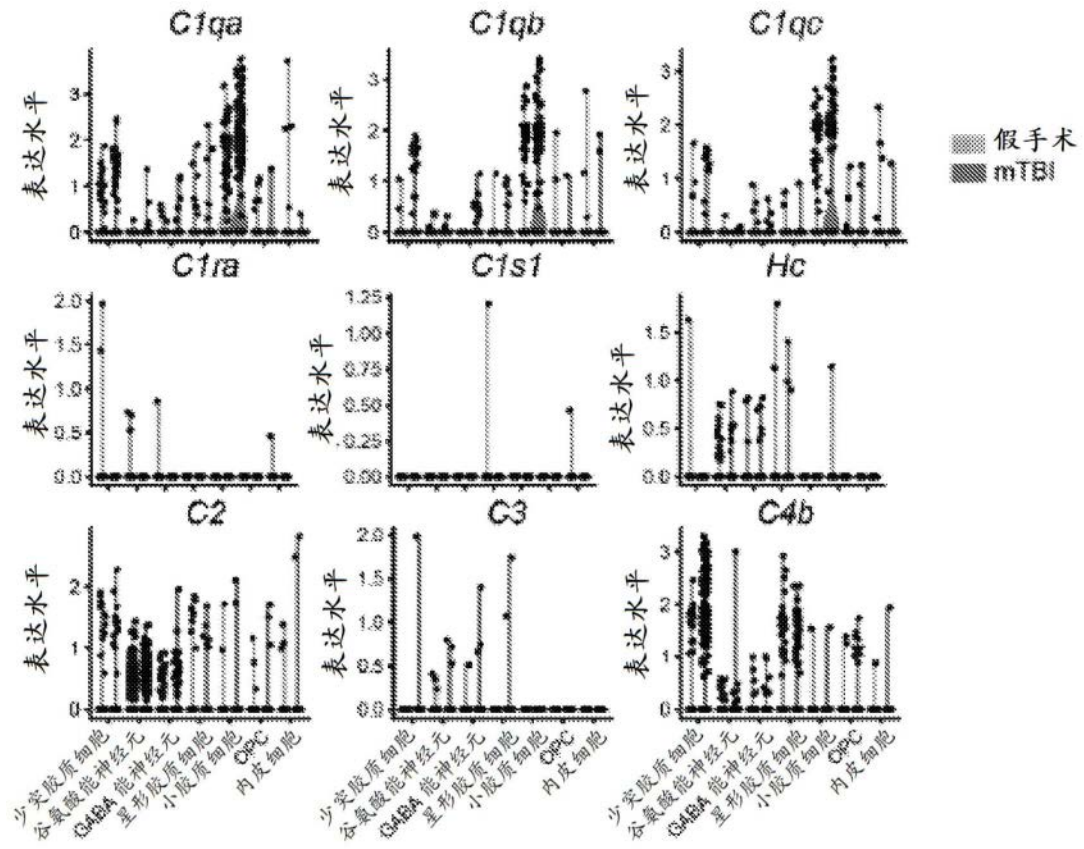


图9B

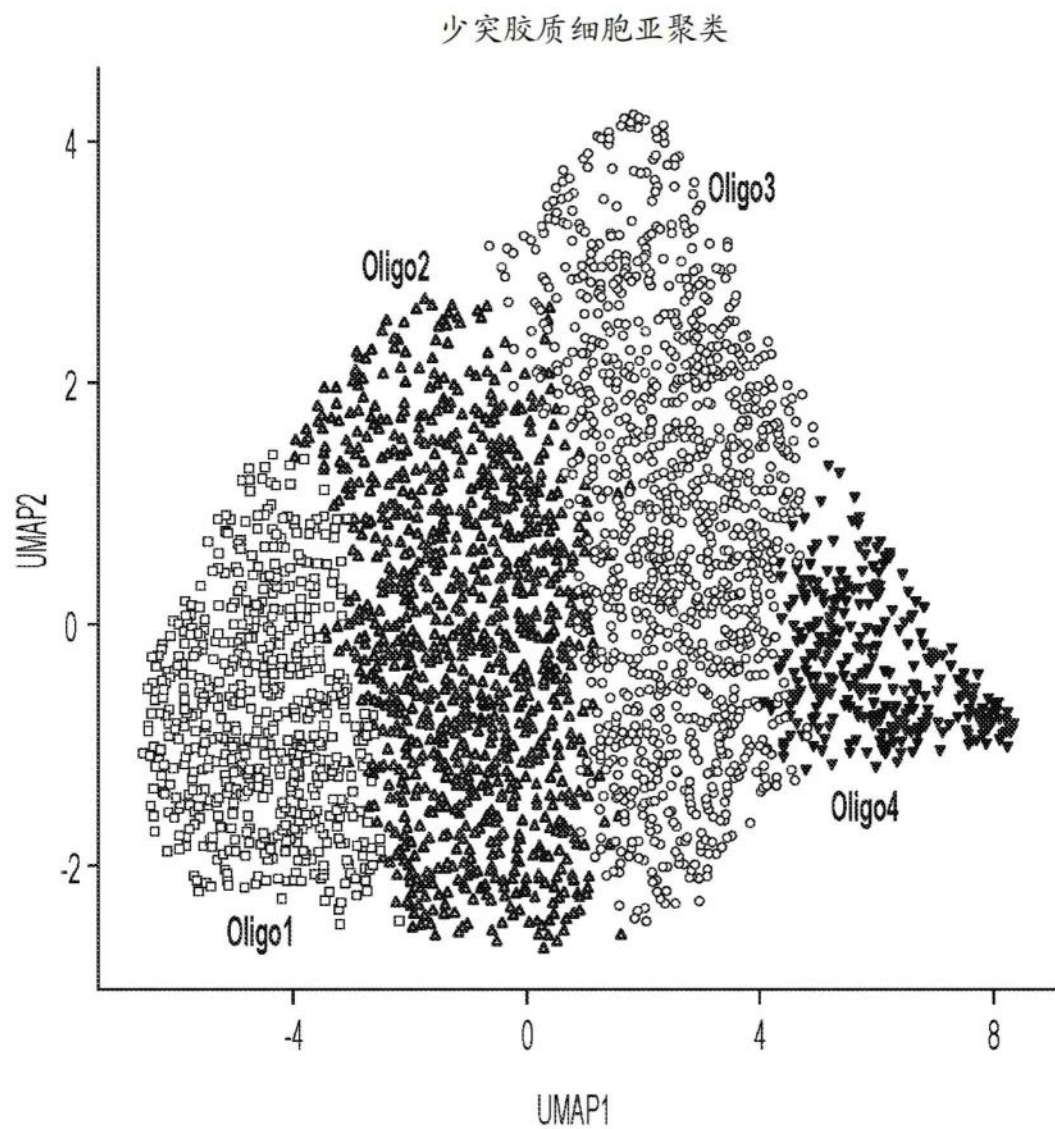


图9C

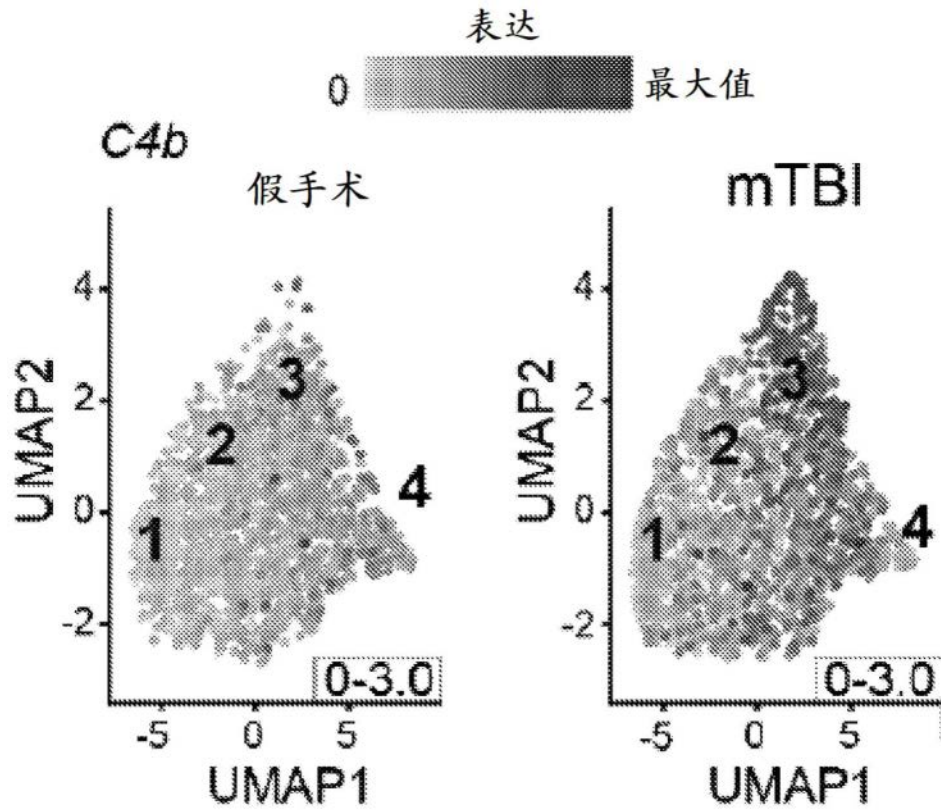


图9D

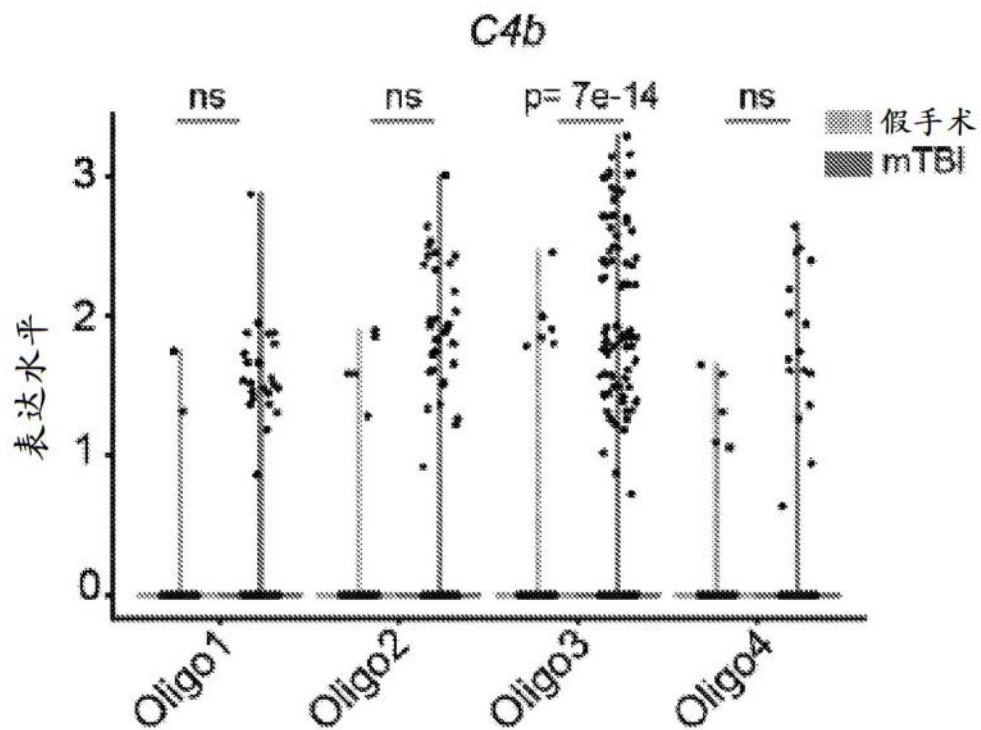


图9E

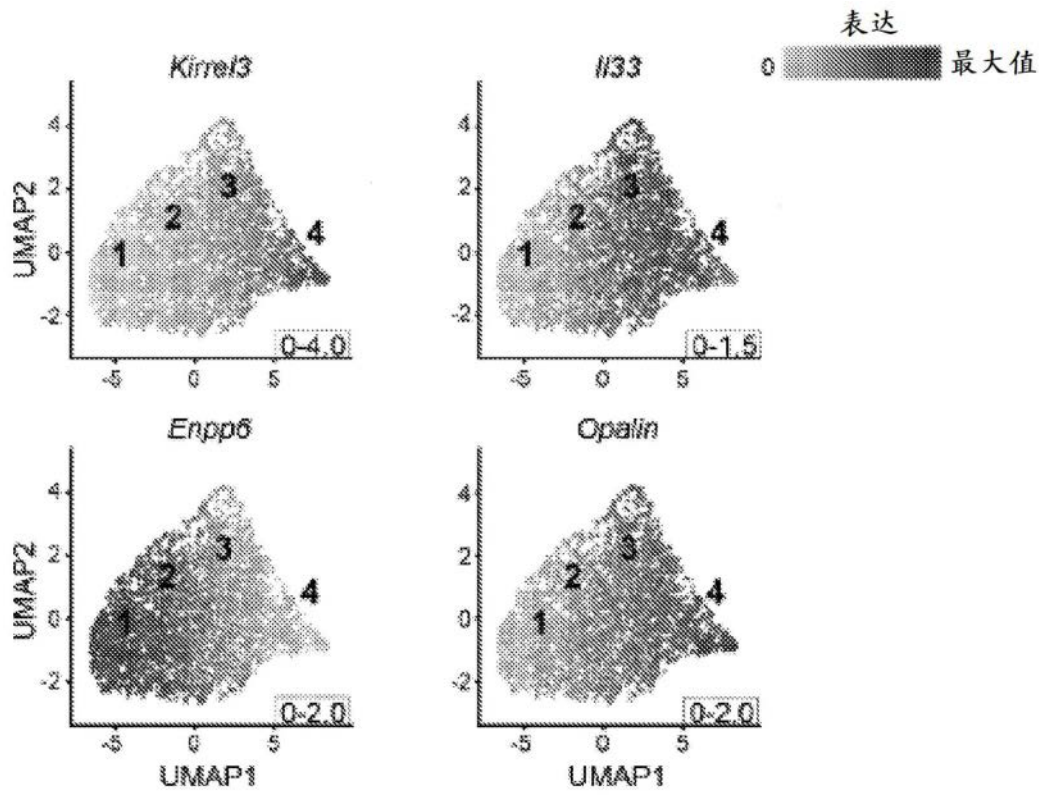


图9F

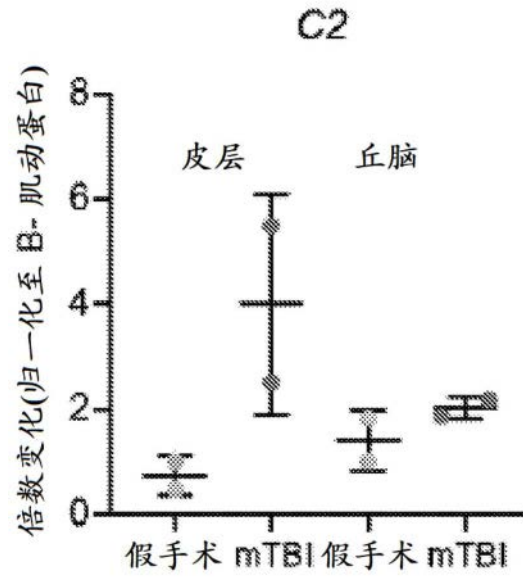


图9G

	snRNA-seq		细胞质 RNA (qPCR)
	细胞类型	DEG?	DEG?
C1qa	小胶质细胞	无	mTBI 皮层和丘脑中增加
C1r	未表达		未表达
C1s	未表达		未表达
C2	小百分比的谷氨酸能神经元	无	mTBI 皮层中增加
C3	未表达		未表达
C4b	小百分比的星形胶质细胞和少突胶质细胞	无	mTBI 皮层和丘脑中增加
Hc	未表达		未表达

图9H

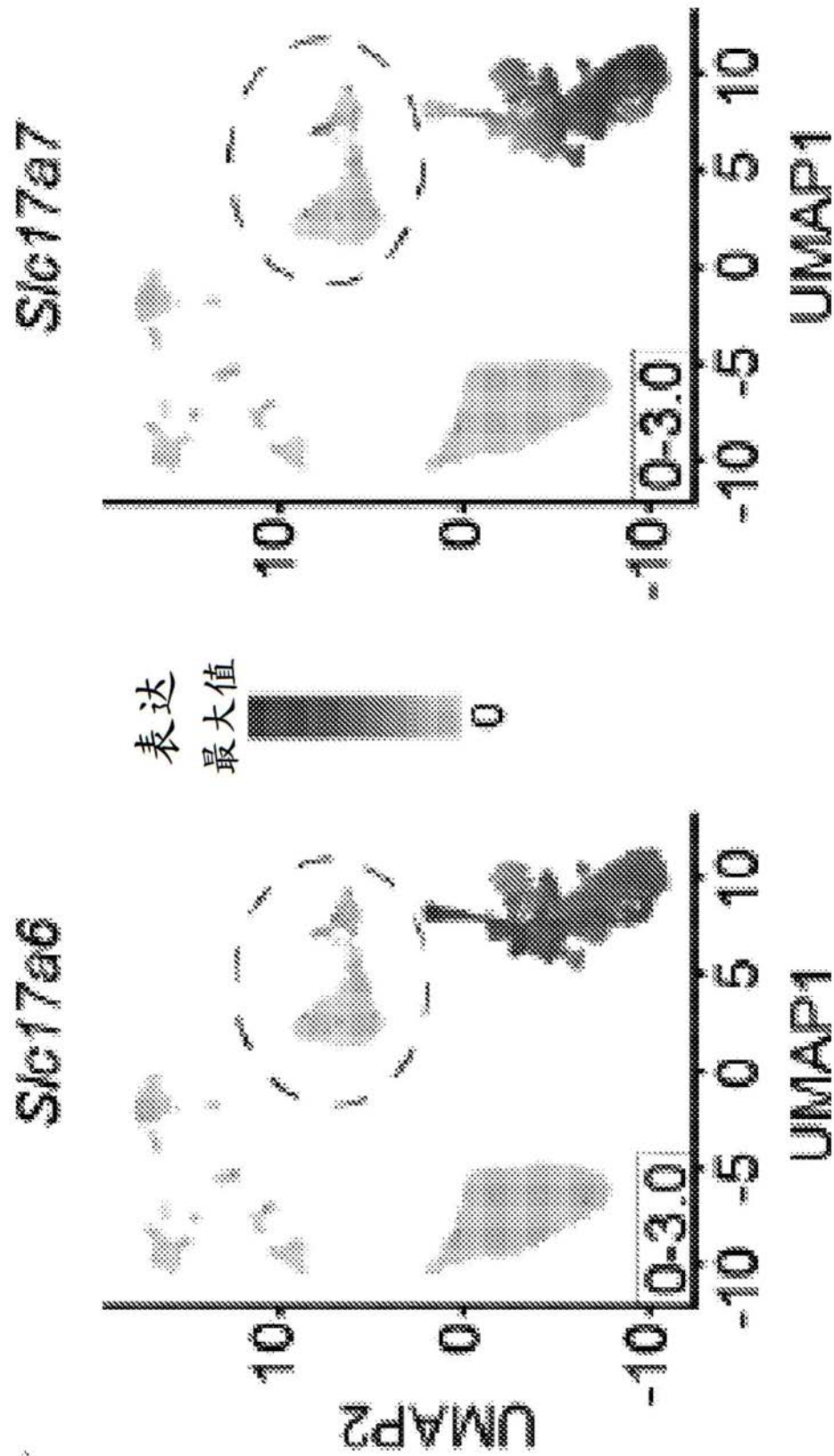


图10A

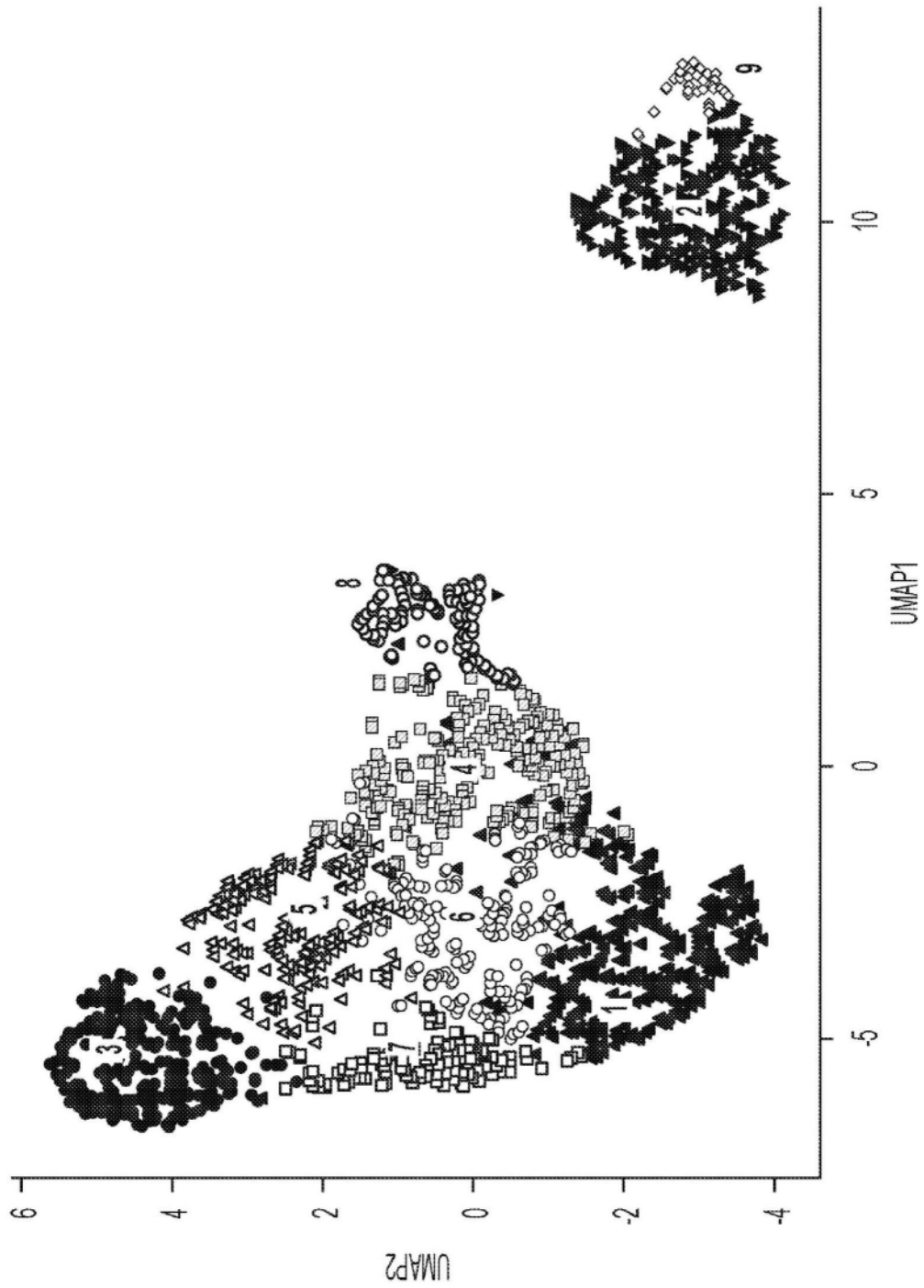


图10B

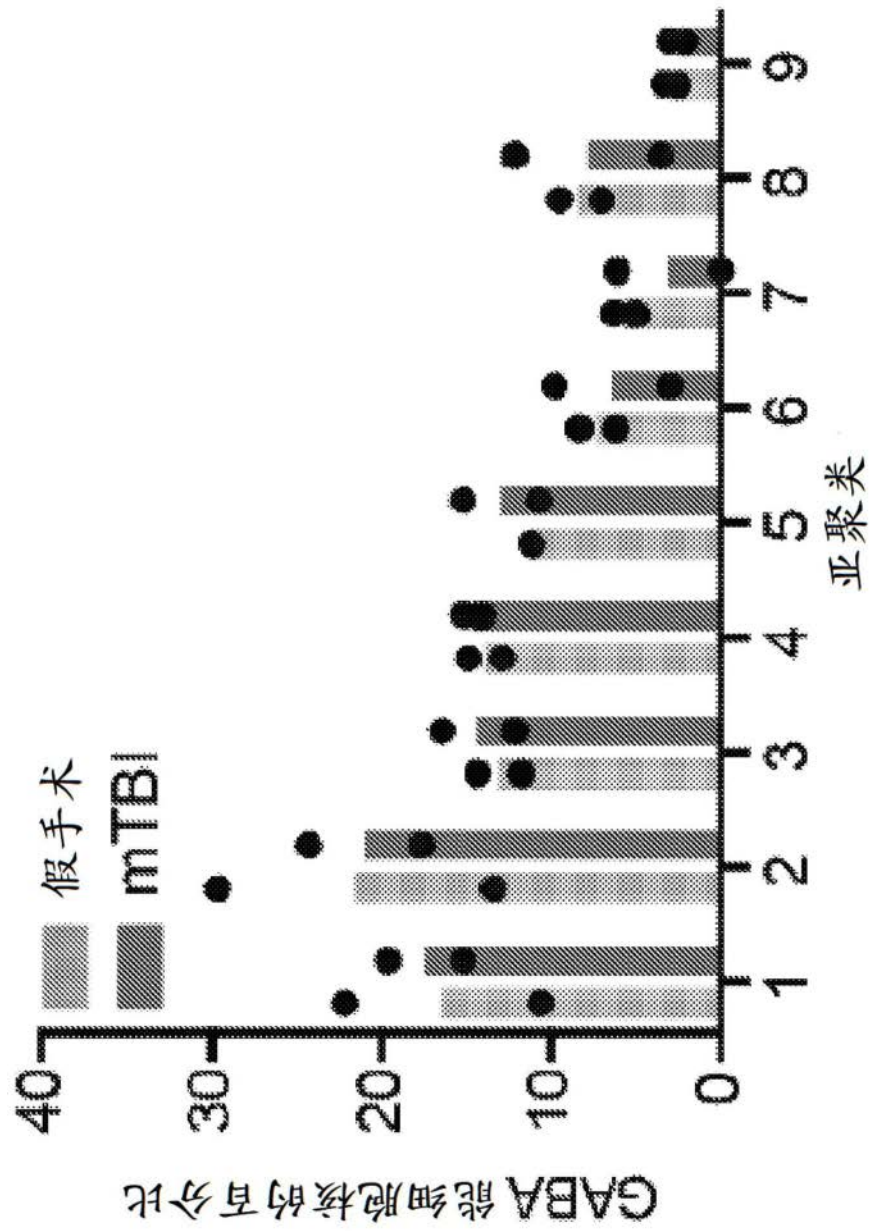


图10C

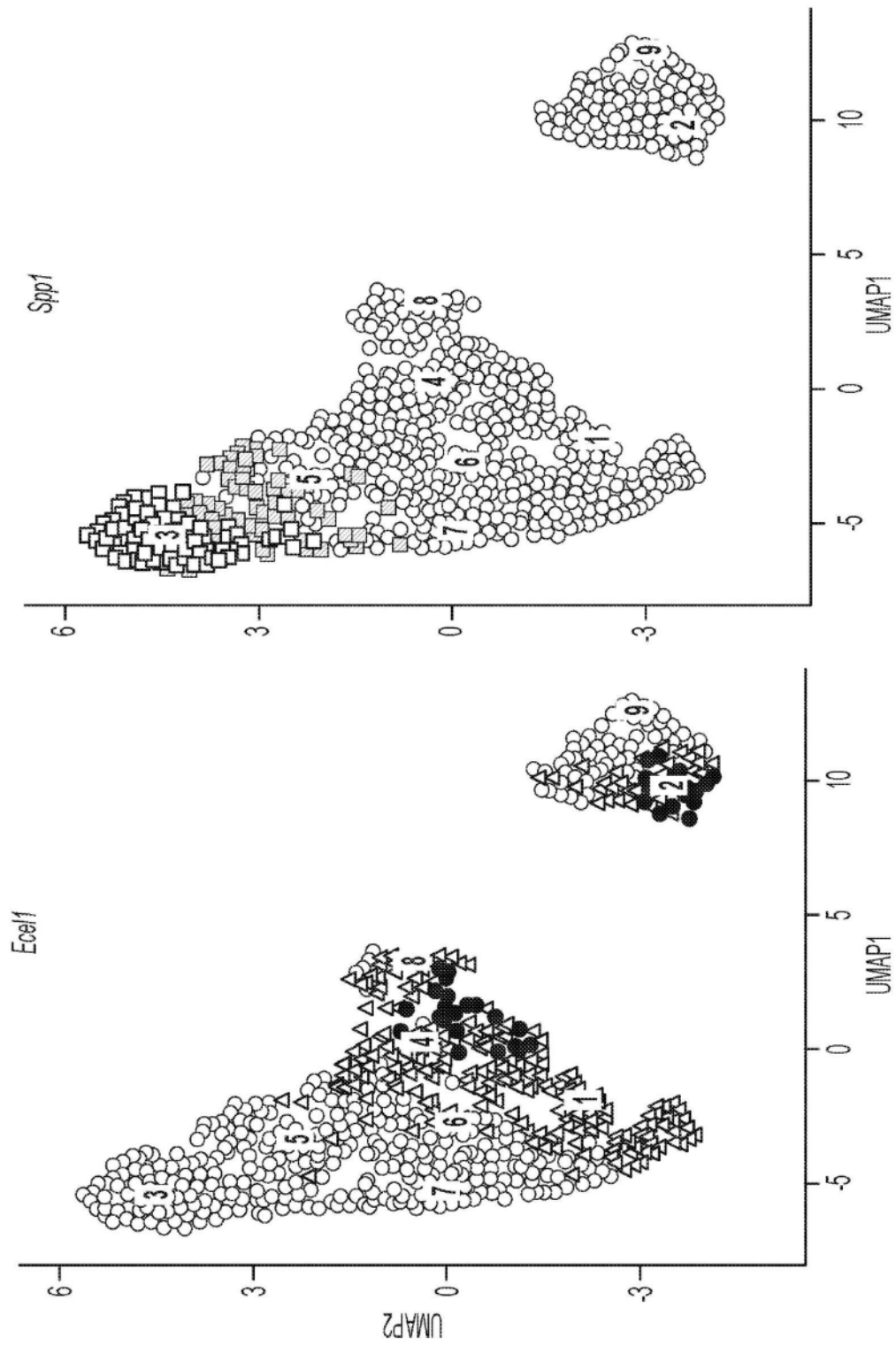


图10D

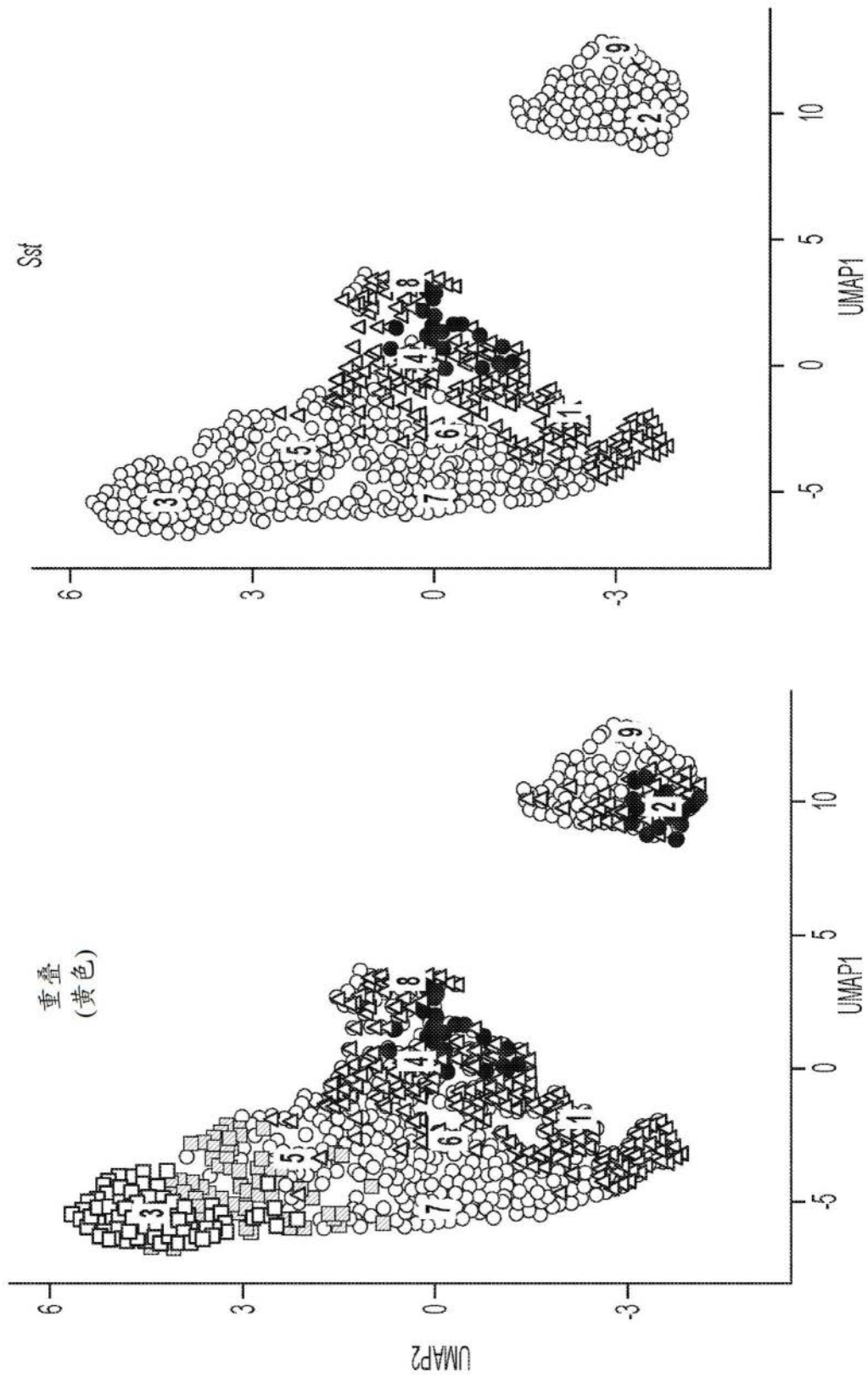


图10D续

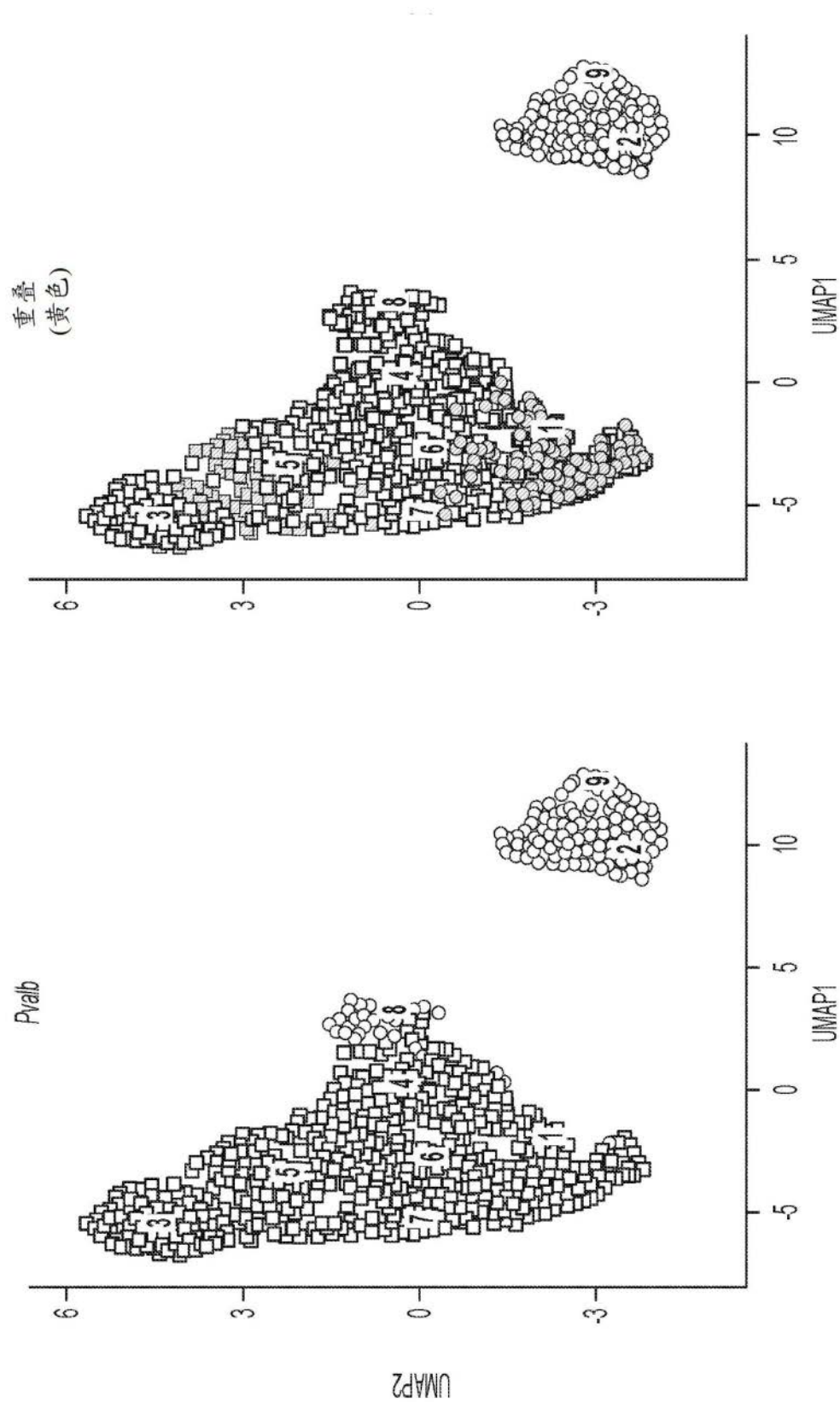


图10D续

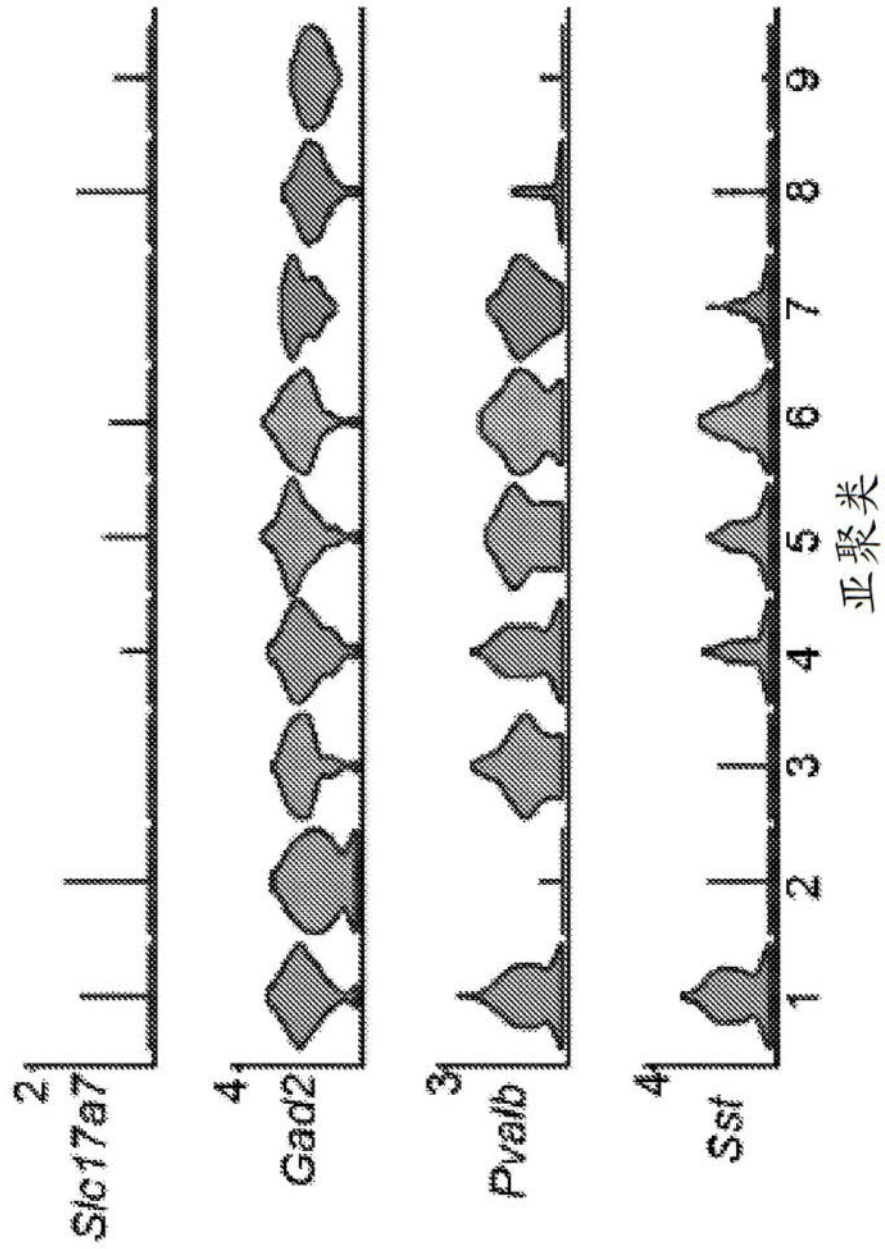


图10E

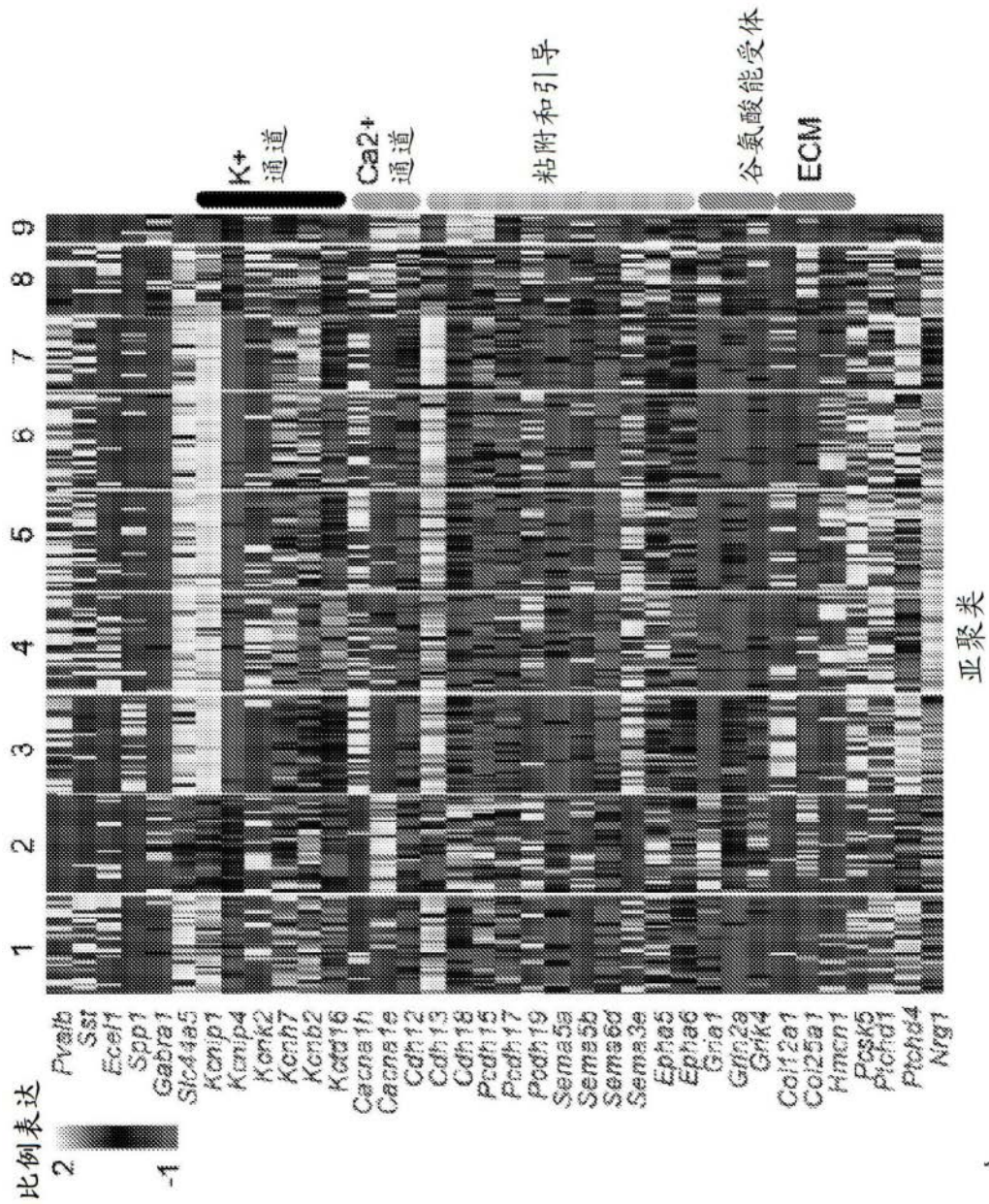


图10F

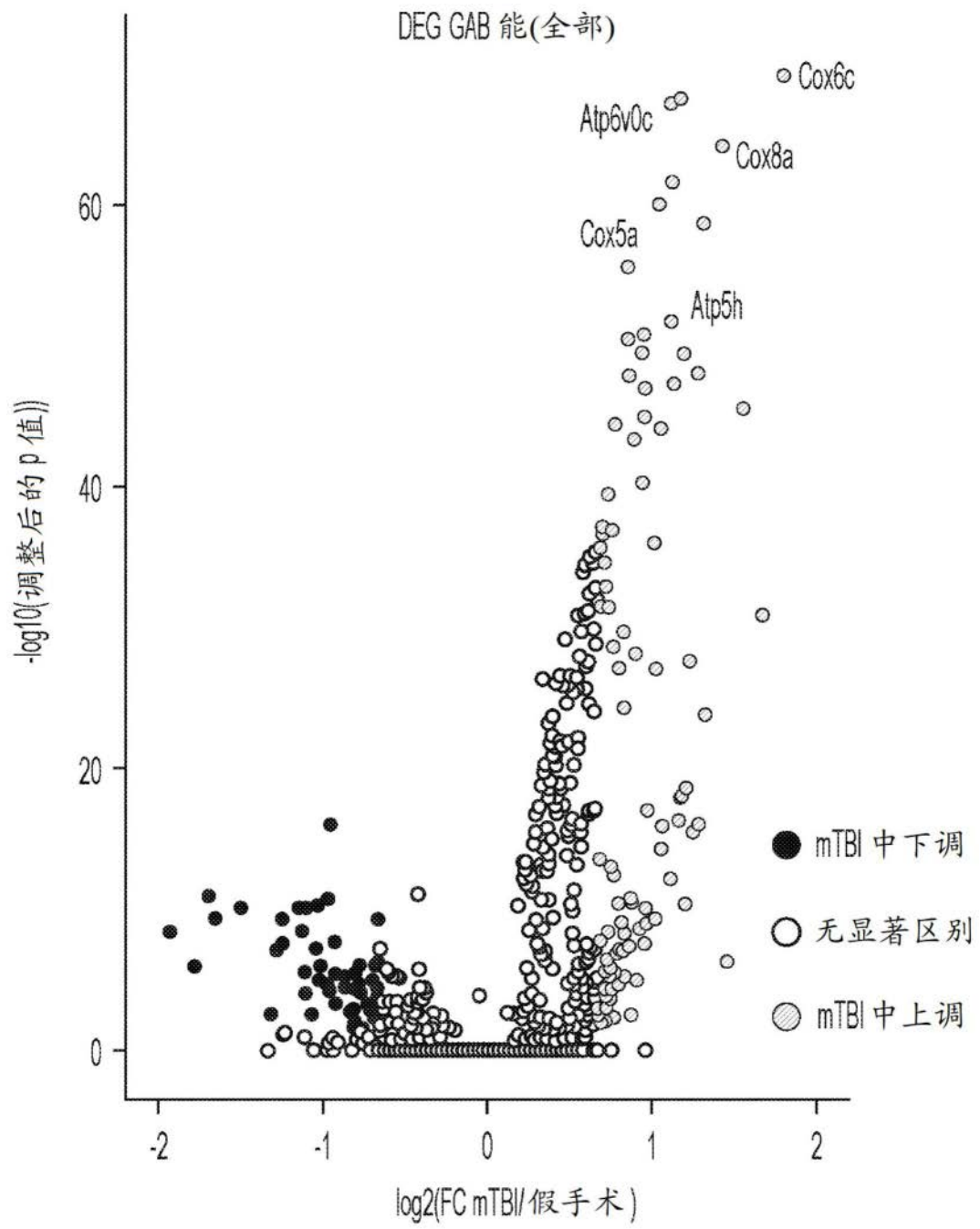


图10G

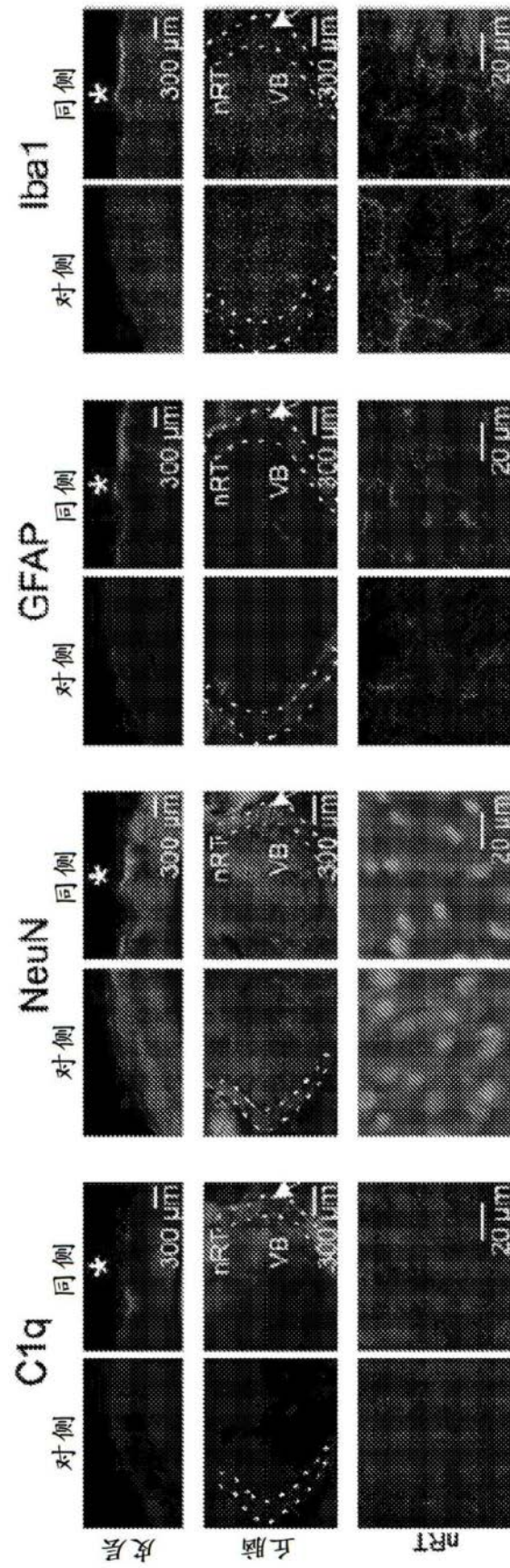


图11A

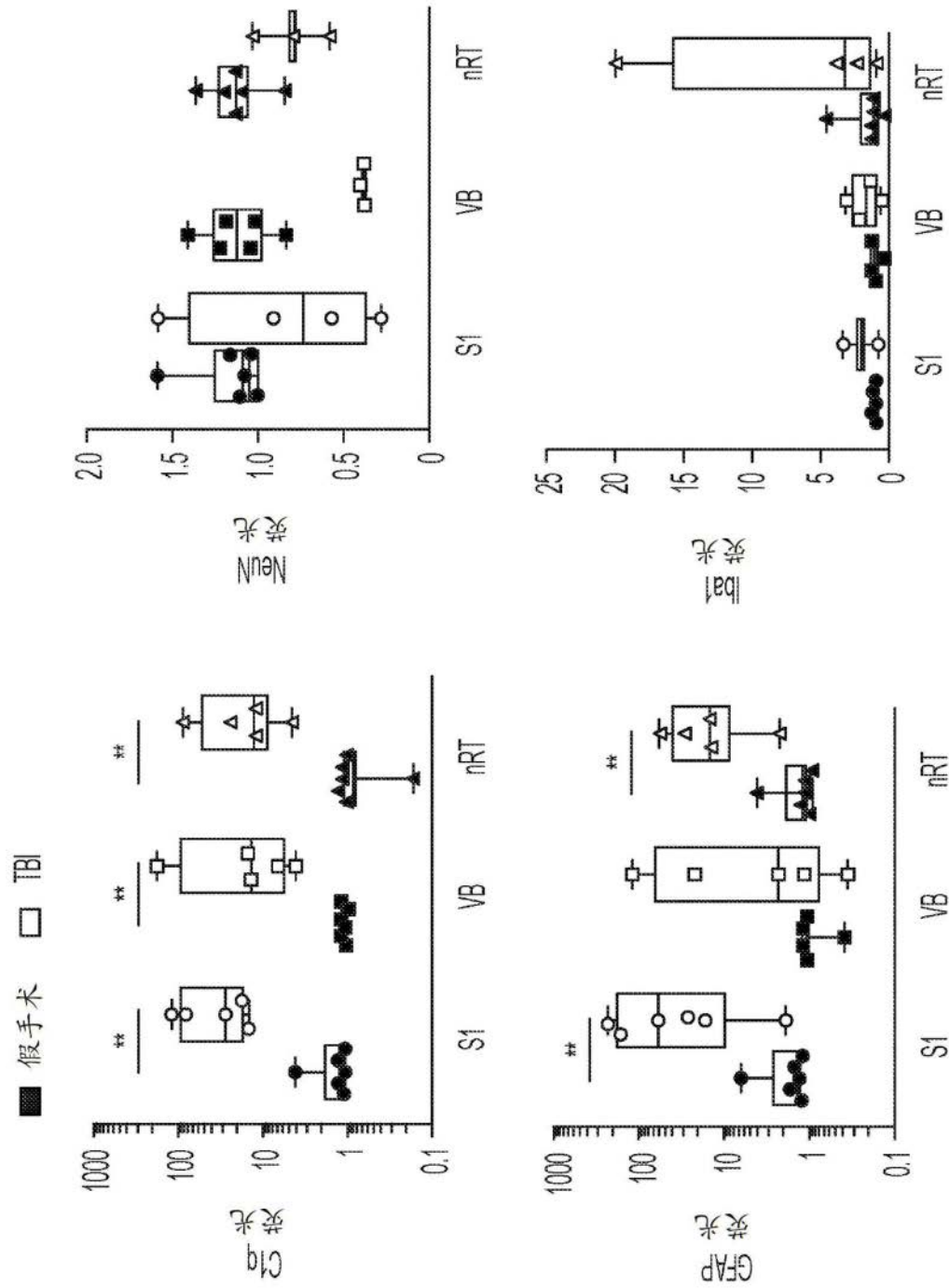


图11B

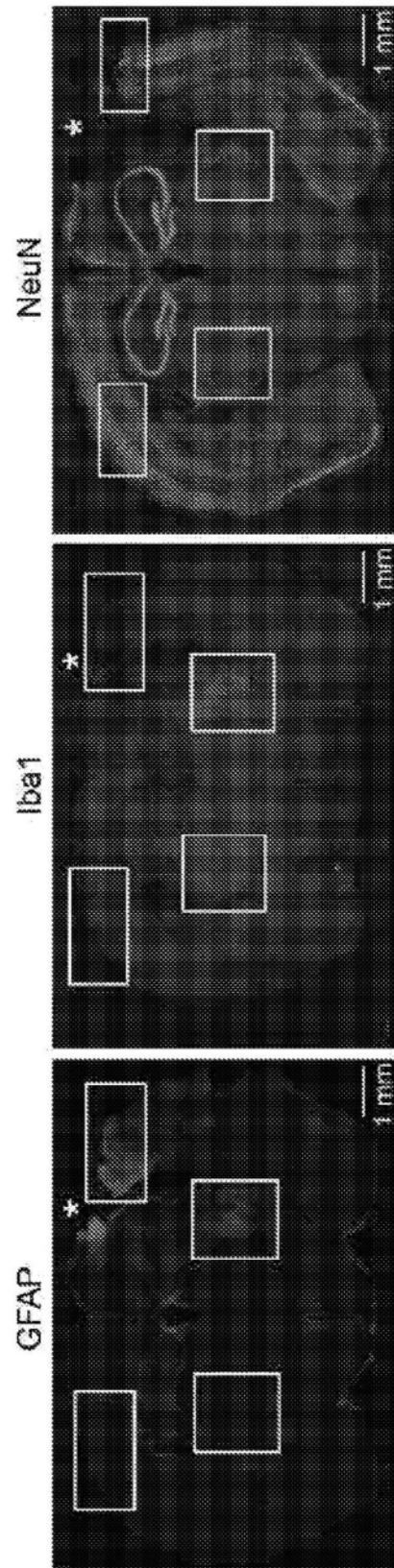


图12A

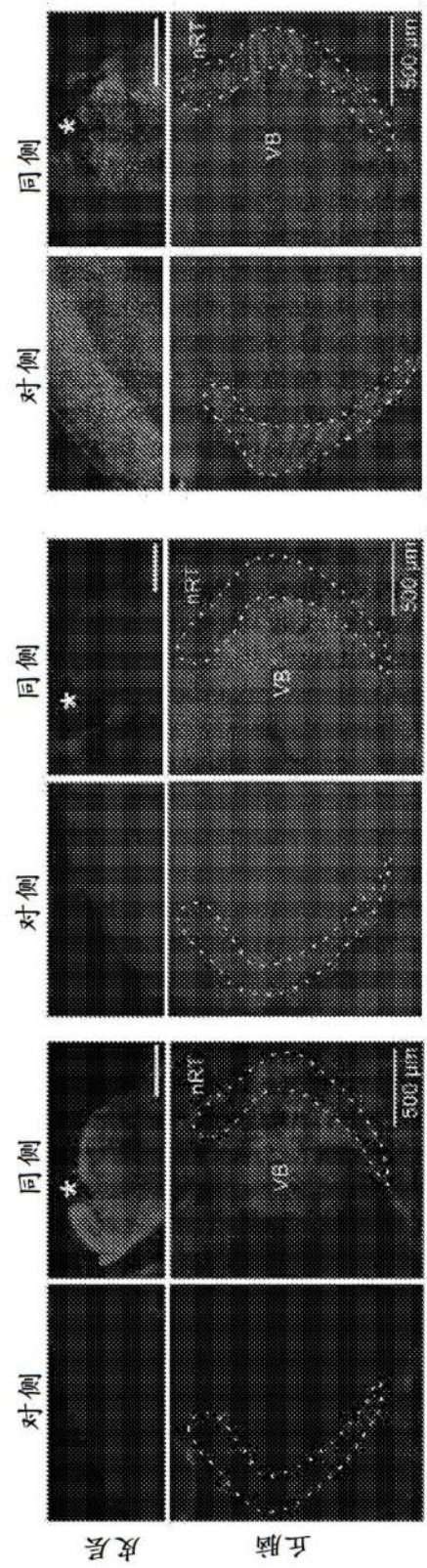


图12B

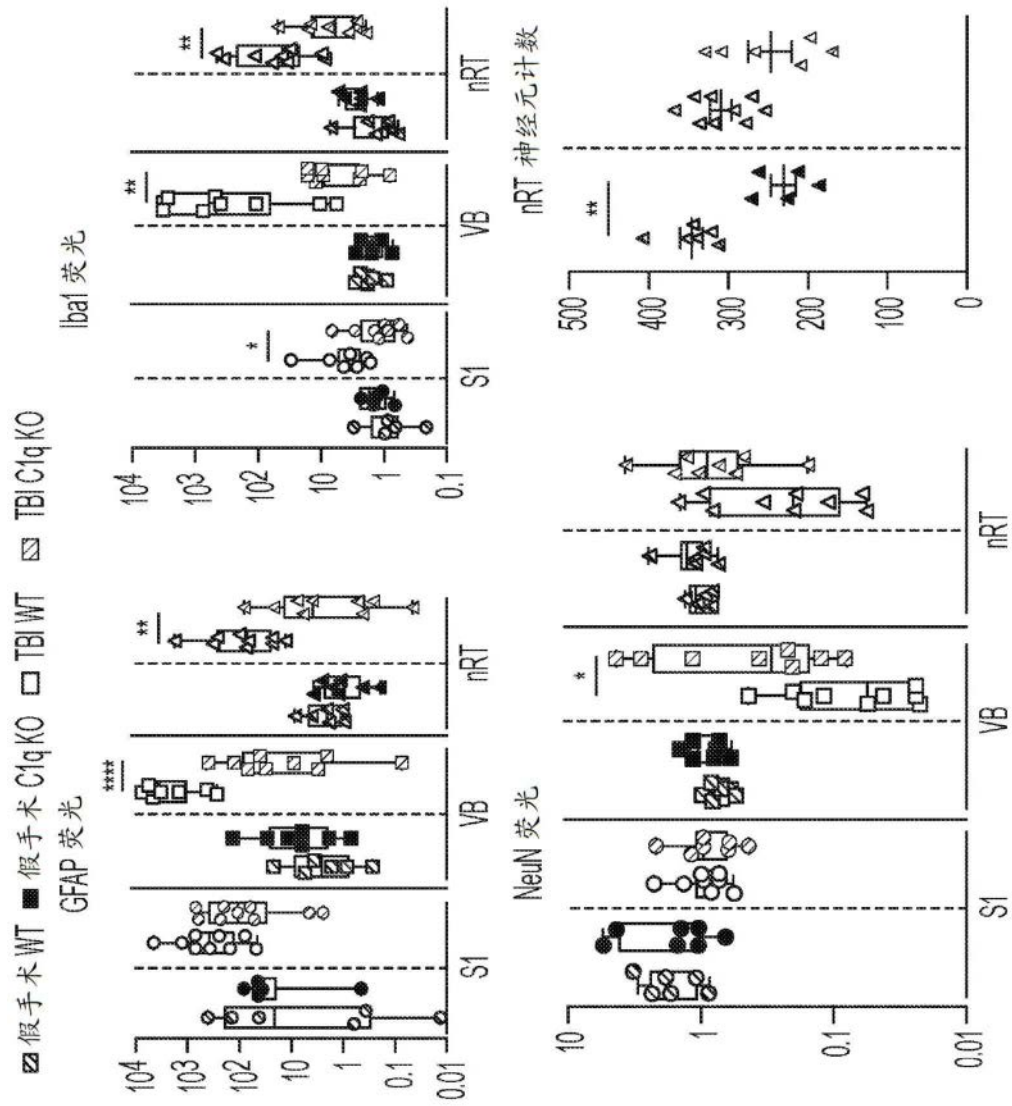


图12C

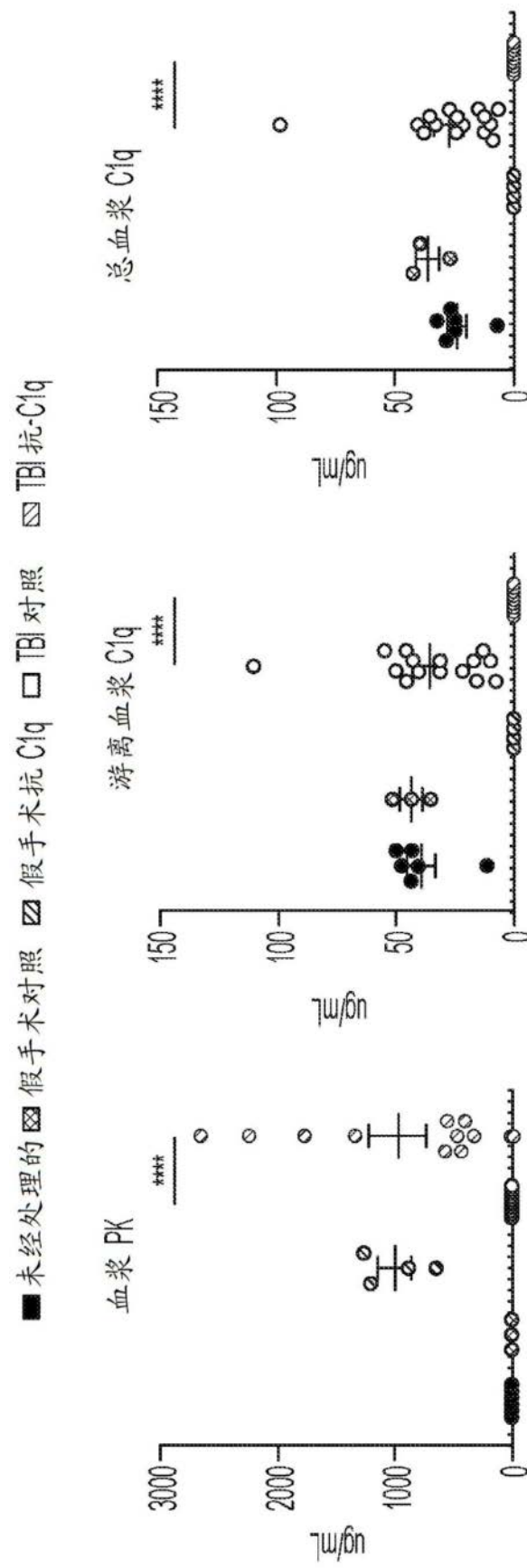


图13A

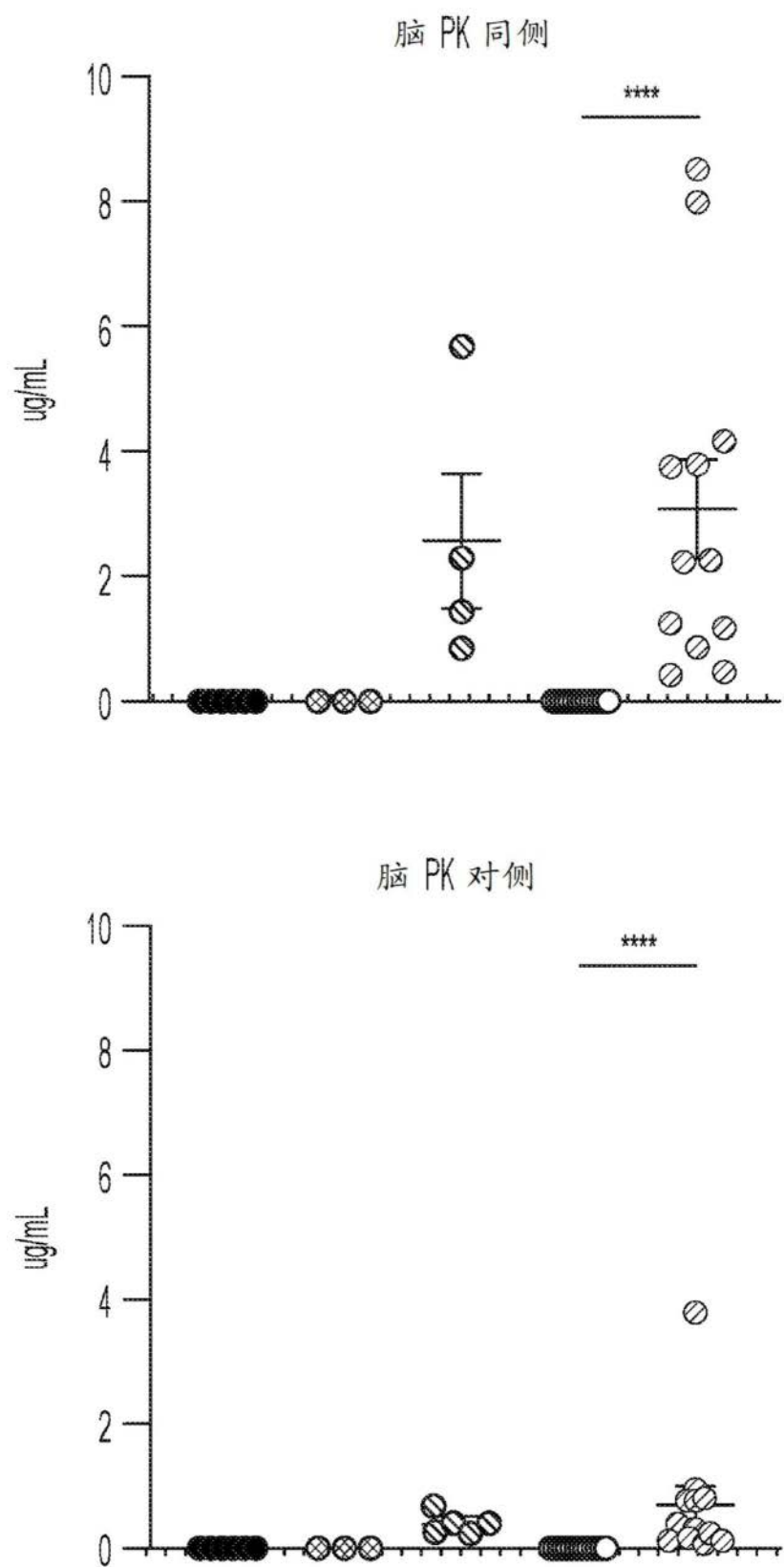


图13B

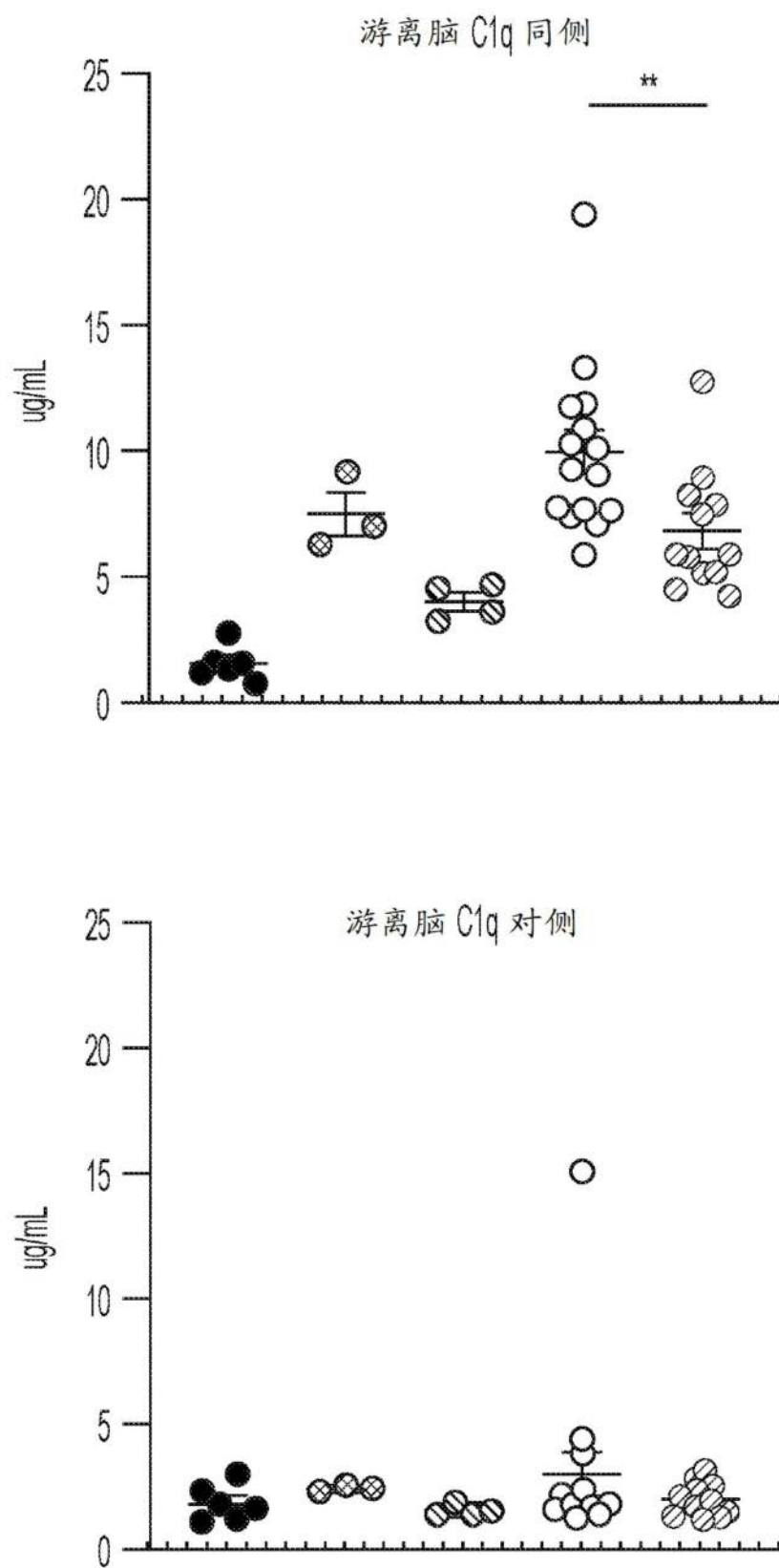


图13C

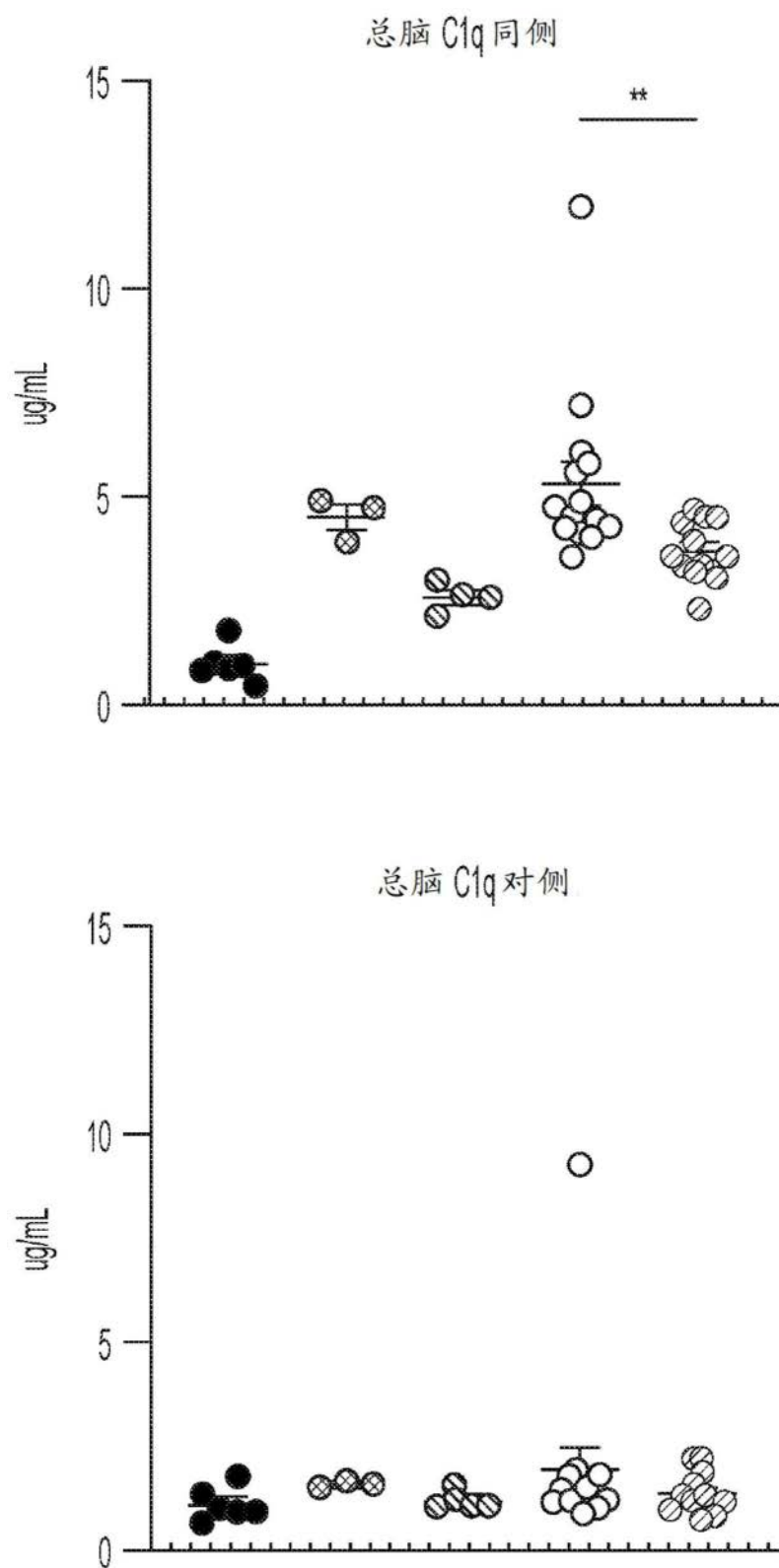


图13D

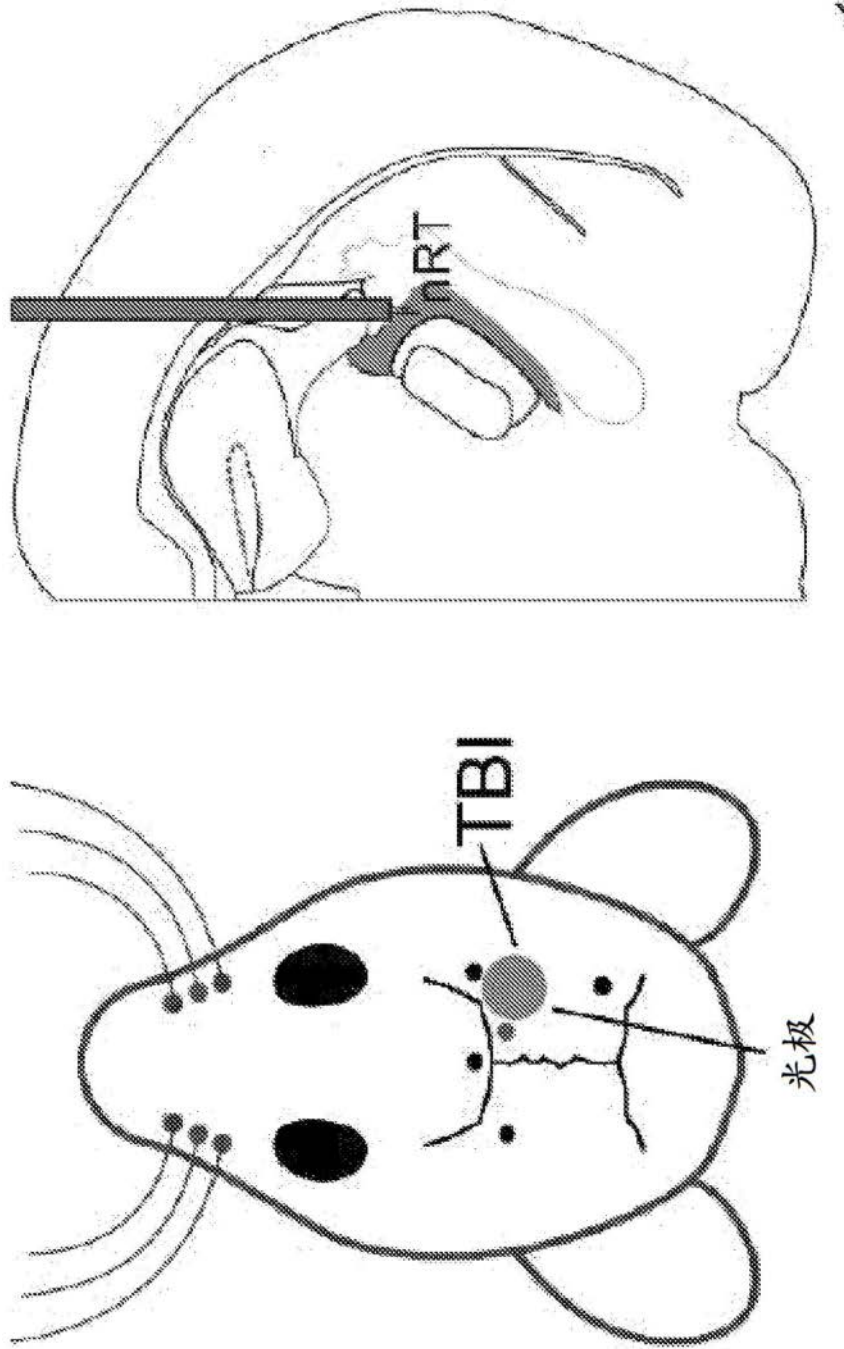


图14A

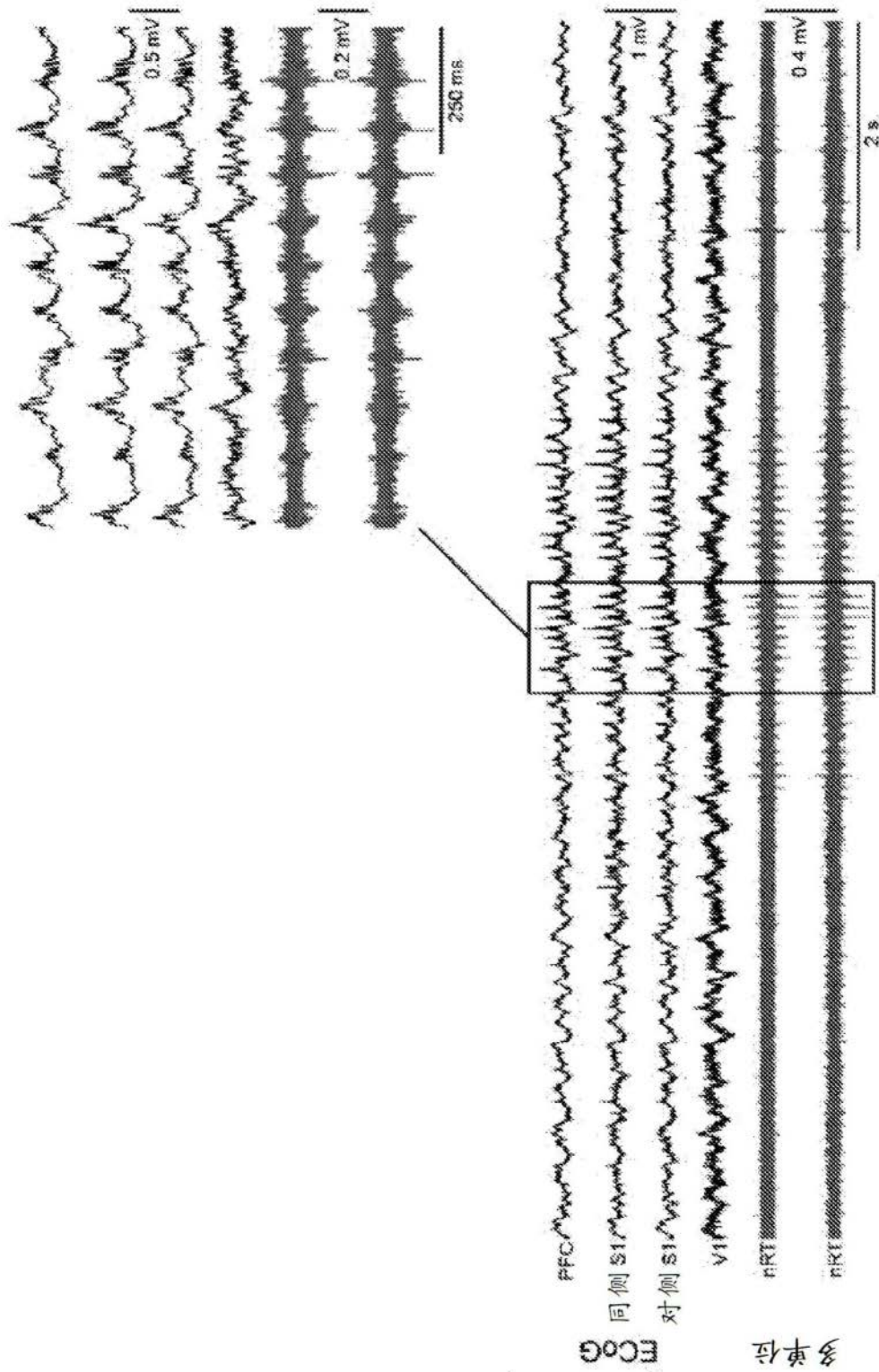


图14B

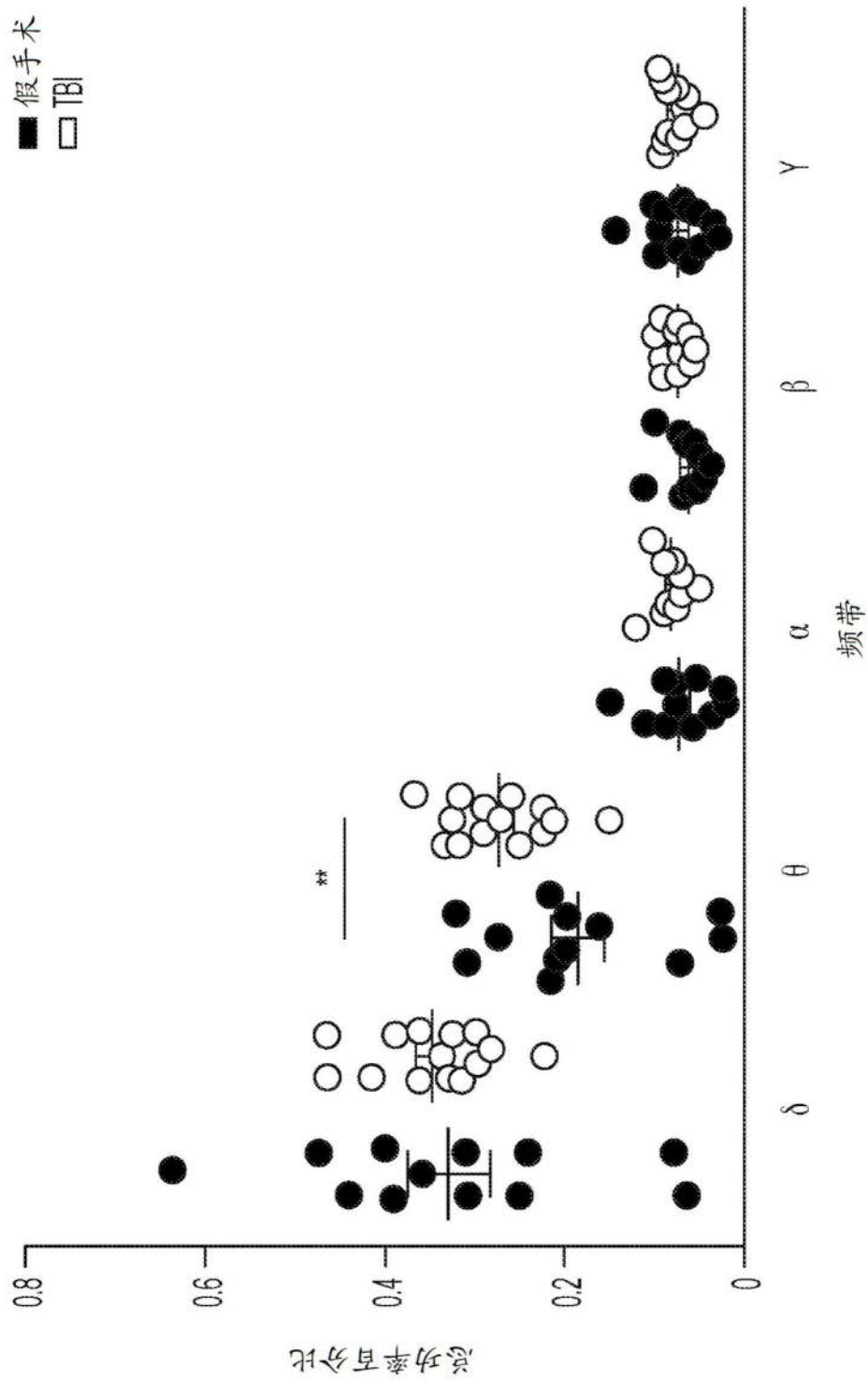


图14C

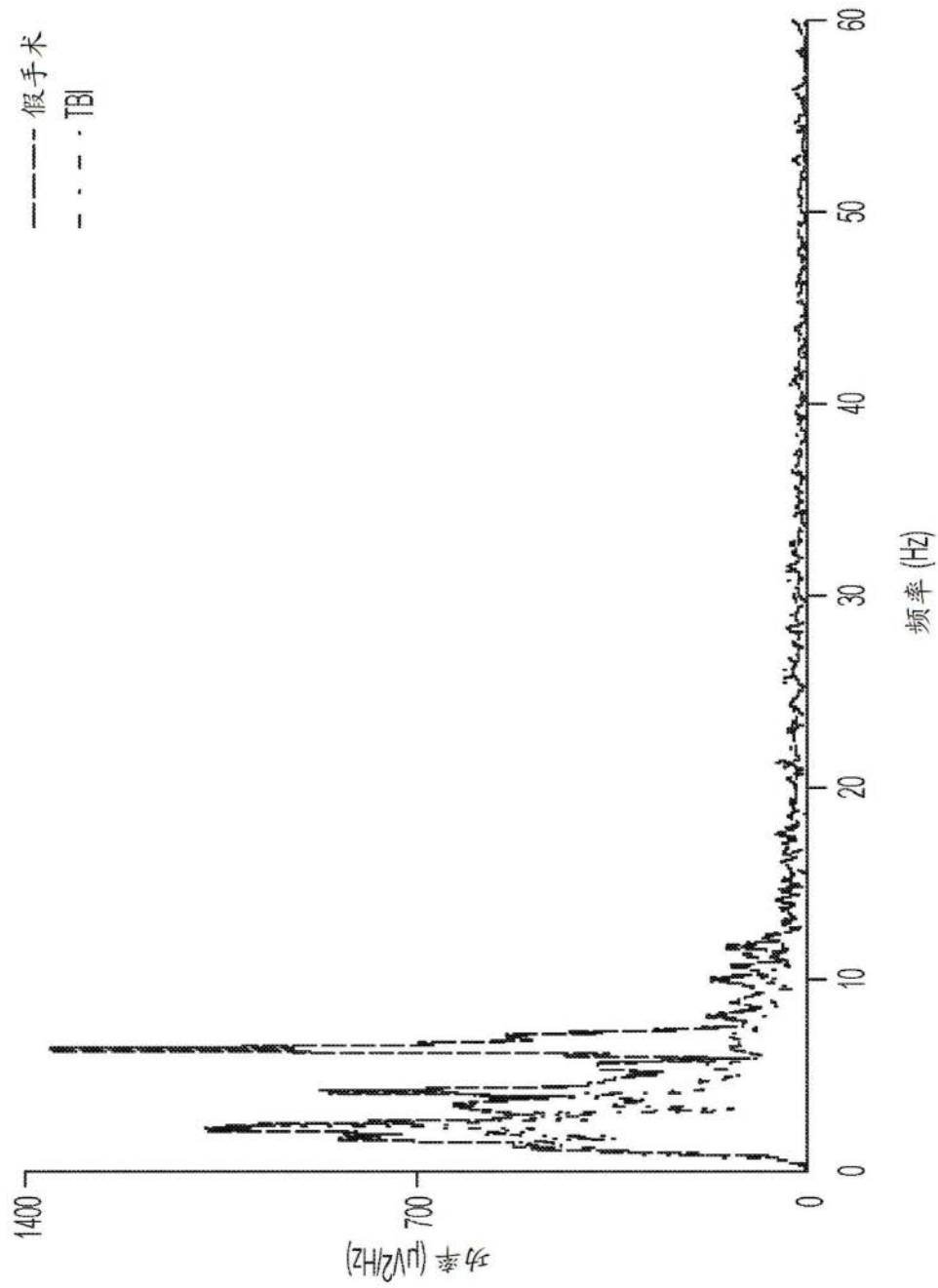


图14D

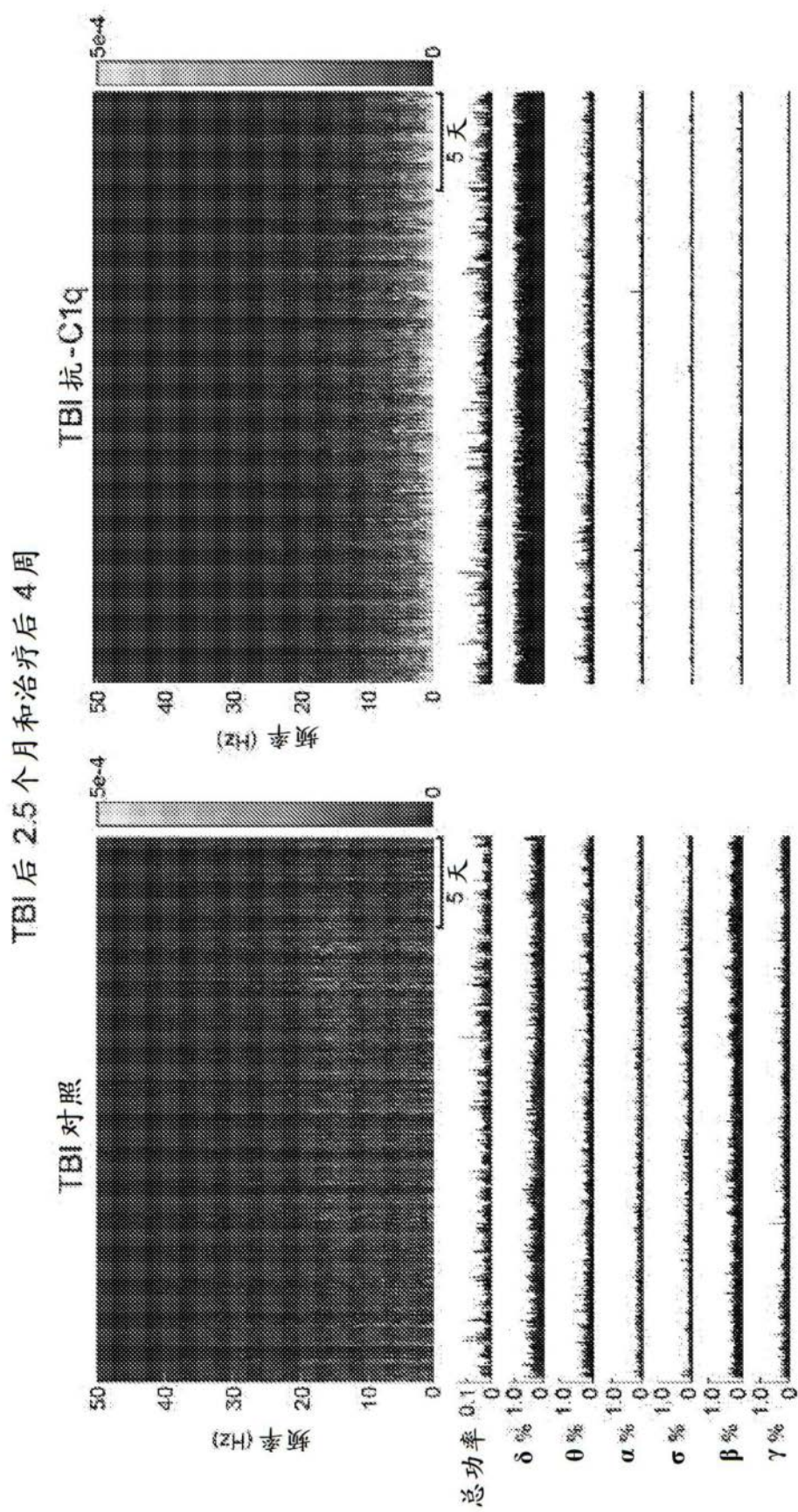


图15A

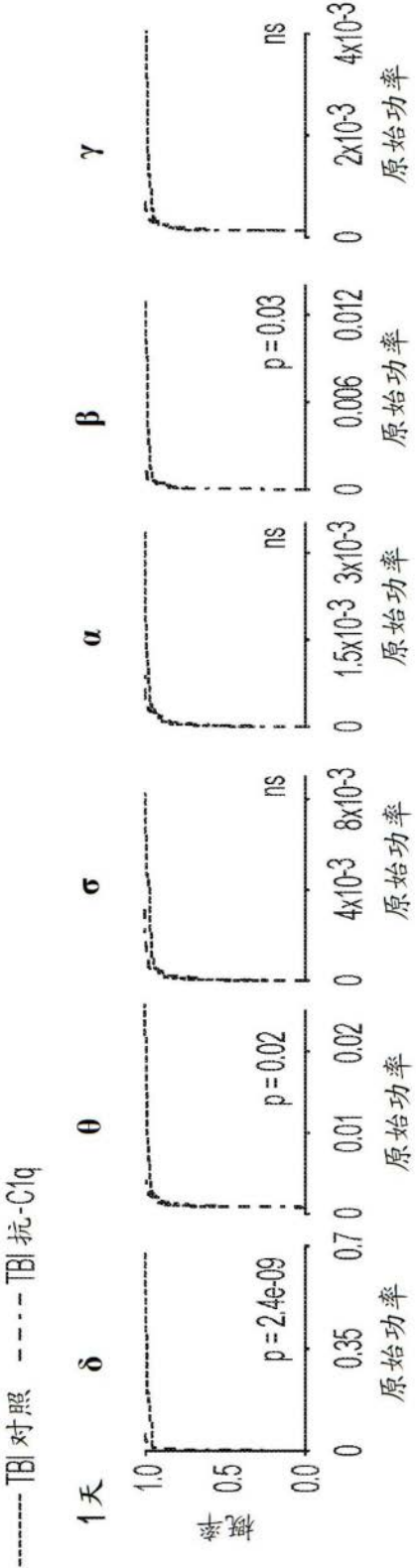


图15B

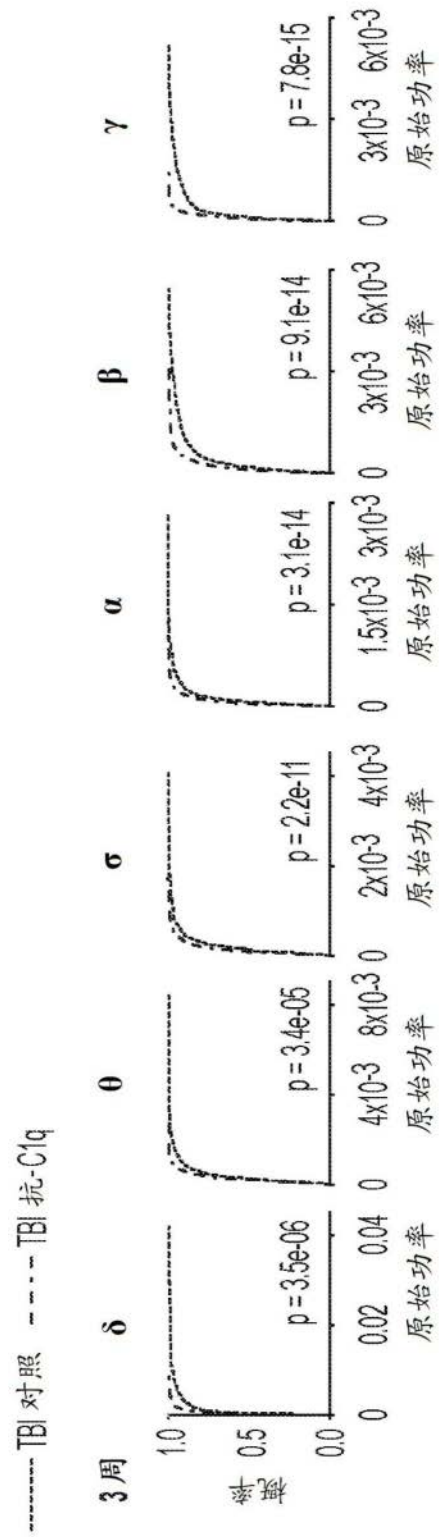


图15C

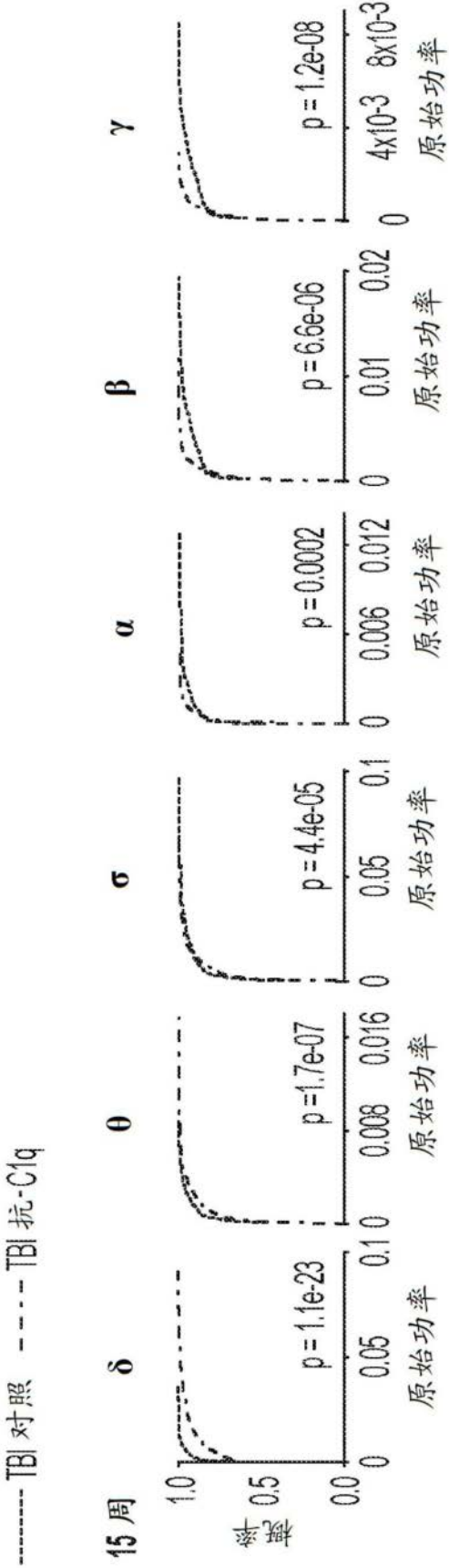


图15D

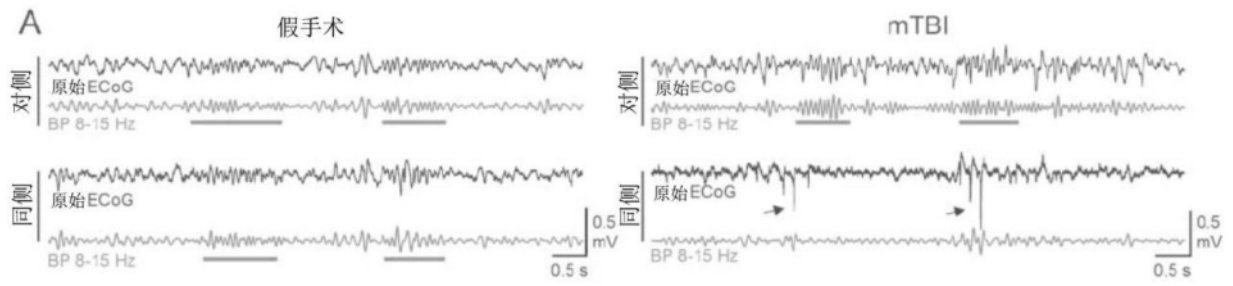


图16A

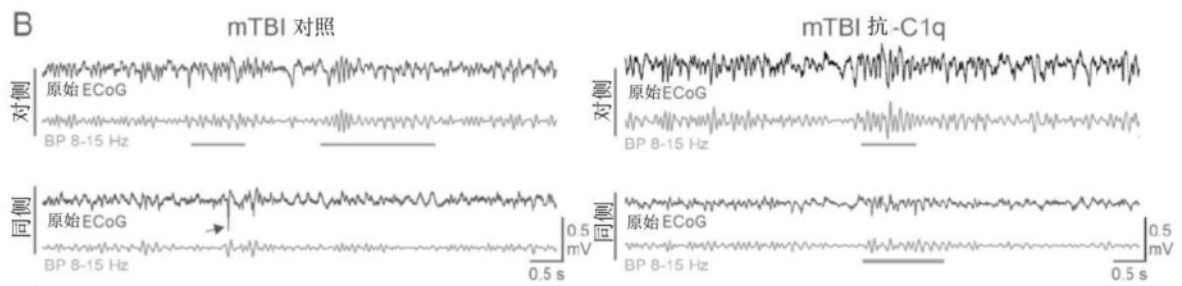


图16B

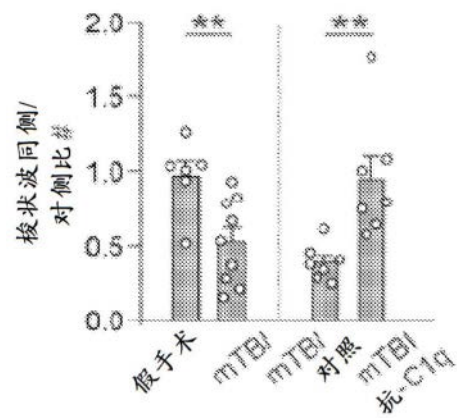


图16C

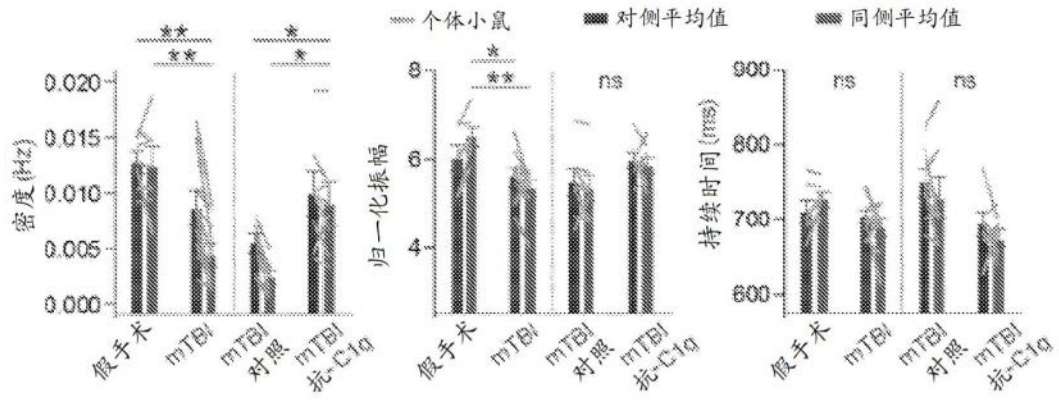


图16D

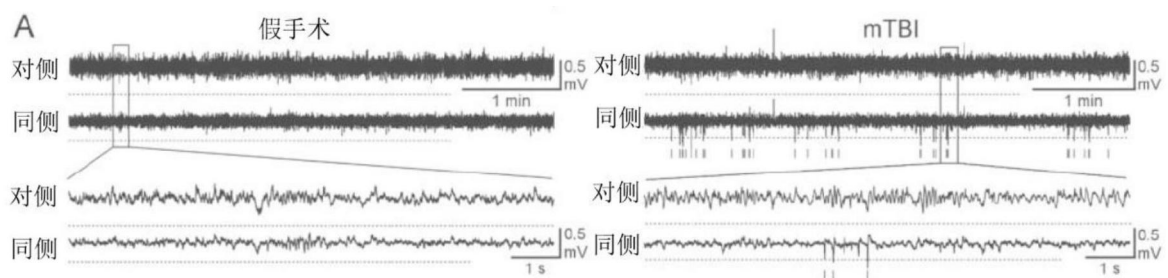


图17A

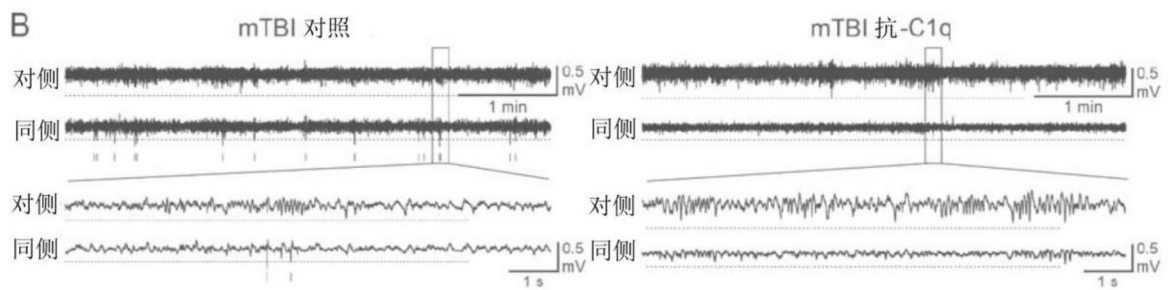


图17B

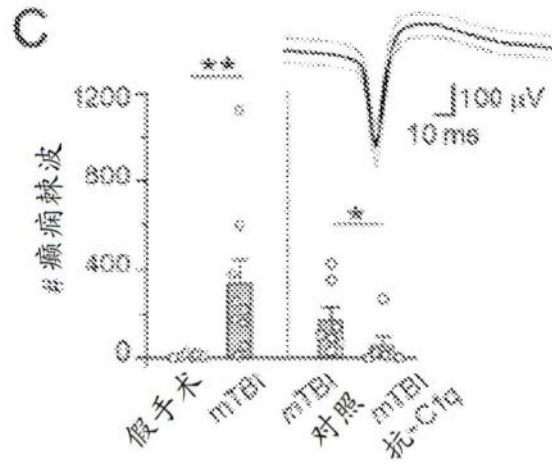


图17C

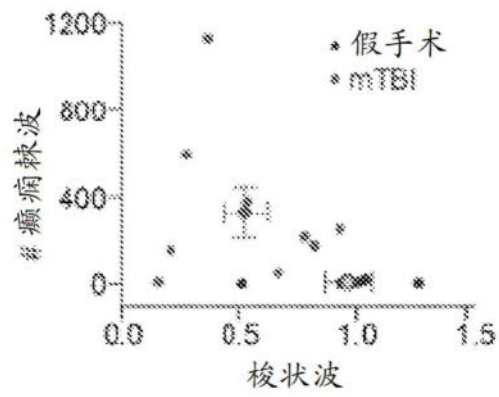


图17D

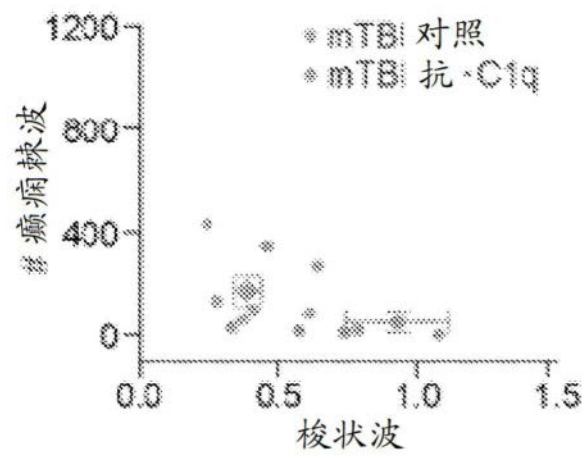


图17E

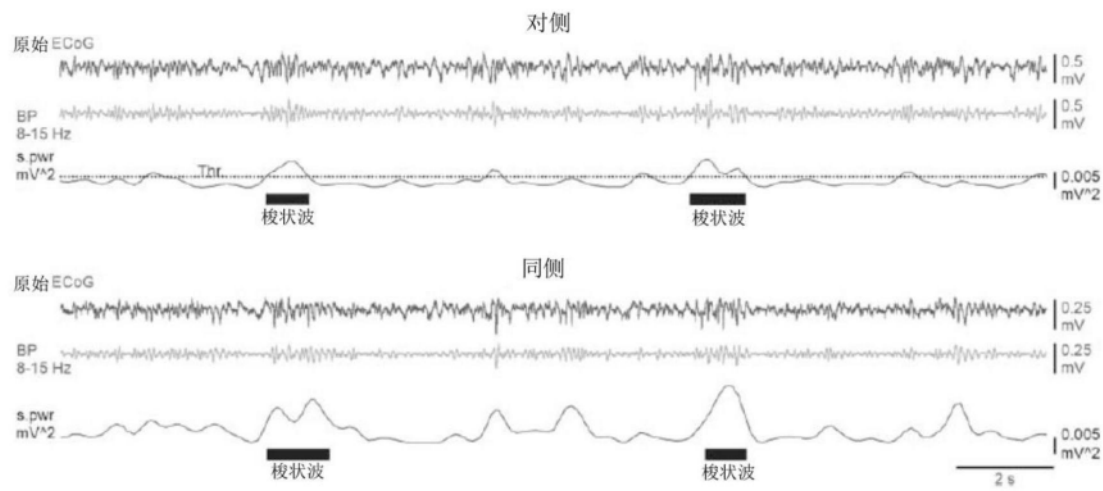


图18